



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO
FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM
ISOLADOS DE *Candida* spp DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE
BOTUCATU, UNESP.

ARIANE CRISTINA MENDES DE OLIVEIRA BRUDER NASCIMENTO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Microorganismos*.

Prof. Dr. Eduardo Bagagli



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO
FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM
ISOLADOS DE *Candida* spp DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE
BOTUCATU, UNESP.**

ARIANE CRISTINA MENDES DE OLIVEIRA BRUDER NASCIMENTO

EDUARDO BAGAGLI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Microorganismos*.

BOTUCATU – SP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSANGELA APARECIDA LOBO**

Nascimento, Ariane Cristina Mendes de Oliveira Bruder.

Identificação molecular e caracterização fenotípica e genotípica da produção de biofilme em isolados de *Candida* spp do Hospital das Clínicas de Botucatu, UNESP / Ariane Bruder-Nascimento. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Eduardo Bagagli

Capes: 21201030

1. *Candida albicans*. 2. Biofilme. 3. Antifúngicos. 4. Infecção hospitalar.

Palavras-chave: Antifúngicos; Biofilme; *Candida albicans*; *Candida parapsilosis*; *Candida* spp; Genes ALS; Introns do grupo I.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho especialmente ao meu amado marido,
Thiago Bruder do Nascimento, meu maior incentivador,
amigo e companheiro, que sempre colaborou para a
realização dos meus sonhos,
e ao meu filho Inácio Nascimento, minha fonte de amor e o
motivo pelo qual eu procure sempre ser uma versão melhor
de mim mesma.*

*Dedico também a Profa. Terue Sadatsune, meu exemplo de
profissional e pessoa.*

AGRADECIMENTOS

Na nossa vida existem situações em que é fundamental o apoio, e a ajuda, de algumas pessoas. Para que este trabalho pudesse ser realizado (e concluído), tive a sorte de poder contar com várias pessoas importantes, as quais expresso meus mais sinceros agradecimentos:

Ao Professor Doutor Eduardo Bagagli, orientador deste trabalho, pela oportunidade, por compartilhar seus conhecimentos, sua atenção, seu tempo e principalmente sua confiança;

À Professora Doutora Terue Sadatsune, por me apresentar o mundo da microbiologia, pelos eternos ensinamentos e principalmente pelo encorajamento.

À agência de fomento FAPESP, processo número 2008/10835-4, pela oportunidade, suporte financeiro e científico;

À agência de fomento CAPES, processo número 0964/11-5, pelo suporte financeiro para desenvolver pequena parte deste trabalho no exterior e pela oportunidade de aprender técnicas inovadoras, conhecer laboratórios no exterior, além de nova cultura e pessoas, que realmente contribuíram para meu desenvolvimento profissional e pessoal;

Ao Professor Doutor Joshua D. Nosanchuk, pela oportunidade, disposição em me receber, confiança no meu trabalho e pela paciência;

Aos funcionários, e ex-funcionários, do departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, em especial a Sônia Faraldo, Ademival, Lula e Nice, pela cordialidade com que me receberam e

pela prestação de valiosos serviços que ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas, seção de Microbiologia, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela colaboração, dedicação e disposição em separar as amostras e dados, essenciais para a realização deste trabalho.

Aos colegas de trabalho e verdadeiros amigos Dr. Carlos Henrique Camargo, Profa. Vera Lucia Mores Rall e Dr. Augusto Cezar Montelli pela dedicação, cooperação científica e pessoal, amizade e excelente convivência durante todos esses anos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Micologia, em especial a Profa. Sandra de Moraes Gimenes Bosco, Tarsila Frankin, Dra. Virgínia Bodelão Richinni Pereira, Thales Domingos, Severino Assis Macoris, Juliana Rizzo, Mariana Fernandes e Gabriel Capela Machado, pelo “suporte técnico”, disposição, companheirismo, paciência, cervejas e, principalmente, pela amizade.

Aos colegas de trabalho do período do estágio em NY, David Sanches, Larissa Almeida, Rosana e Felipe Pereira, minha segunda família. Obrigada pela acolhida e amizade;

À minha querida família, meu porto seguro. Obrigada mãe, vó, tios, queridas irmãs, sobrinhas, primos, cunhados e, principalmente, meu marido e filho, sem vocês nada disso seria possível!

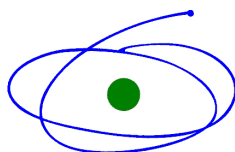
Suporte Financeiro



PROCESSO 2008/10835-4

Estágio Sanduíche no Exterior

Bolsa PDEE



C A P E S

PROCESSO BEX 0964/11-5

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo geral.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Origem das amostras.....	35
3.2. Seleção das amostras.....	35
3.3. Recuperação das amostras.....	35
3.4. Identificação morfológica e fisiológica.....	36
3.5. Identificação molecular.....	38
3.6. Caracterização da produção de biofilme.....	43
3.7. Testes de susceptibilidade a drogas antifúngicas.....	46
3.8. Introns do grupo I: genotipagem de <i>C. albicans</i>	51
3.9. Introns do grupo I: detecção de <i>C. dubliniensis</i>	52
3.10. Genética do biofilme: genes ALS1, ALS3 e HWP1 de <i>C. albicans</i> ..	53
3.11. Detecção de espécies do complexo “ <i>psilosis</i> ”.....	56
3.12. Genética do biofilme: genes ALS de <i>C. parapsilosis</i>	57
3.13. Análise estatística.....	61
4. RESULTADOS	
4.1. <i>Candida</i> spp.	65
4.2. <i>Candida albicans</i>	77
4.3. <i>Candida parapsilosis</i> – complexo “ <i>psilosis</i> ”.....	84
5. DISCUSSÃO.....	93
6. CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

1 RESUMO

2 Nas últimas décadas, a epidemiologia das infecções por *Candida* spp. e o perfil
3 de susceptibilidade a drogas vêm sofrendo importantes alterações. A emergência
4 dessas espécies, como agente de infecções invasivas, tem se destacado
5 principalmente entre pacientes imunocomprometidos. O principal objetivo desse
6 estudo foi avaliar a epidemiologia das infecções por *Candida* spp. no Hospital das
7 Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, e auxiliar no suprimento
8 de dados para o melhor controle da infecção hospitalar. Os objetivos específicos
9 incluíram a comparação entre as metodologias tradicional, automatizada e
10 molecular de identificação em nível de espécie atualmente disponíveis nesta
11 instituição, avaliar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos, bem como a
12 produção de biofilme por estes isolados e caracterizar, utilizando ferramentas de
13 biologia molecular, genes envolvidos na produção de biofilme de *C. albicans* e *C.*
14 *parapsilosis* e o emprego dos introns do grupo I para genotipagem de *C. albicans*.
15 Um total de 196 isolados de *Candida* spp. provenientes de hemocultura de
16 pacientes foram avaliados. As espécies mais frequentes foram *C. albicans* (39,3-
17 44,4%) e *C. parapsilosis* (33,2-42,3%). Foi observada boa correlação (>80%)
18 entre os métodos de identificação avaliados – fenotípico tradicional, automatizado
19 e molecular; e a caracterização dos introns do grupo I detectou predominância de
20 *C. albicans* genótipo A (74%). O método tradicional é o mais simples e de baixo-
21 custo, e o método automatizado mais rápido na liberação do resultado, quando
22 comparados às técnicas moleculares, as quais apresentam maior poder
23 discriminatório. Sugere-se a utilização do meio cromogênico, em paralelo ao
24 método de identificação selecionado, para auxiliar na interpretação dos
25 resultados, principalmente nas espécies mais frequentes. O método empregado

1 em laboratórios de rotina deve ser considerado quando se objetiva identificação
2 em nível de espécie. Os testes de susceptibilidade às drogas antifúngicas foram
3 realizados pela técnica da microdiluição (CLSI) e todos os isolados apresentaram
4 boa sensibilidade aos antifúngicos testados (fluconazol, voriconazol,
5 anidulafungina e anfotericina B). Não foram observadas diferenças quanto à
6 produção de biofilme entre as espécies estudadas. A avaliação dos genes ALS de
7 *C. albicans* revelou que o número de motifs por alelo do gene ALS3 pode estar
8 envolvido com a produção de biofilme. Entretanto, sugere-se que os genes ALS-
9 like de *C. parapsilosis* estejam envolvidos na defesa contra fagocitose e também
10 poderiam estar ausentes em alguns isolados.

1 ABSTRACT

2 Over the last decade, there have been important changes in
3 the epidemiology of *Candida* infections and antifungal agents used to treat these
4 infections. In recent years, *Candida* species have emerged as important causes of
5 invasive infections mainly among immunocompromised patients. The principal aim
6 of this study was to evaluate the epidemiology of infectious *Candida species*
7 isolated in our hospital and accordingly supply data for hospital infection control.
8 The other aims were to compare the traditional, automated and molecular
9 methods used to identify *Candida* isolates to the species level current available in
10 the Clinical Hospital of the Boucatu Medical School, UNESP, to evaluate the drug
11 susceptibility as well as to biofilm production by this yeasts and to characterize, by
12 molecular tools, several genes involved in biofilm production of *C. albicans* and *C.*
13 *parapsilosis* and the use of group I introns to genotype the species *C. albicans*. A
14 total of 196 *Candida* strains that were isolated from blood specimens of
15 hospitalized patients were included in the study. The most
16 common *Candida* species identified were *C. albicans* (39,3-44,4%) and *C.*
17 *parapsilosis* (33,2-42,3%). According to the insertion of group I introns, the
18 genotype A of *C. albicans* were the most frequent (74%). The evaluation of
19 traditional phenotypic methods, the automated and some molecular revealed good
20 agreement (>80%) and since both phenotypic methods were simple and cost
21 effective and automated were few time-consuming when compared to molecular
22 techniques, they should be considered in the routine lab identification
23 of *Candida* species. The chromogenic media must be employed to avoid
24 misinterpretations, independently of the method used. Antifungal susceptibility
25 testing was performed by the reference microdilution method (CLSI) and all strains

1 showed good susceptible against the drugs evaluated (fluconazole, voriconazole,
2 anidulafungin and amphotericin B). There were no differences among biofilm
3 production by different species. The evaluation of *C. albicans* ALS genes revealed
4 that the number of ALS3 motifs could be involved in biofilm production. On the
5 other hand, the *C. parapsilosis* ALS-like genes showed to be more involved in
6 defense against phagocytes and can be absent in some isolates.

1. INTRODUÇÃO

As espécies de *Candida* são leveduras que pertencem à ordem Saccharomycetales, da classe dos Ascomycetes. Nos últimos 20 anos, essas leveduras vêm sendo intensamente estudadas devido principalmente à sua importância na clínica, e também têm despertado interesse no campo da biotecnologia e como potencial agente de controle biológico (PAPON et al., 2012).

Leveduras desse gênero são ubiqüitárias e algumas espécies podem estar presentes como parte da microbiota humana e animal. Entretanto, cerca de apenas 10% das espécies descritas encontram-se relacionadas a infecções no ser humano (EGGIMANN et al., 2003; COOPER, 2011). Muitas espécies de *Candida* spp são parte da microbiota endógena da pele e trato geniturinário e gastrointestinal, neste último a colonização temporária ou permanente por esses micro-organismos ocorre em 40 a 50% dos humanos. A colonização pode ser o início para o desenvolvimento de infecção. Alterações na microbiota da pele e mucosas, bem como perda da integridade da barreira do trato gastrointestinal podem proporcionar condições de crescimento excessivo ou a translocação dos micro-organismos através do intestino (FRIDKIN & JARVIS, 1996; EGGIMANN et al., 2003).

Na medicina humana, esses agentes vêm sendo descritos como patógenos emergentes capazes de causar desde infecções superficiais até infecções mais invasivas, praticamente em qualquer sítio anatômico (PAPPAS, 2006; KOURKOUMPETIS et al., 2010). Os quadros de candidíase hematogênica (ou invasiva) estão sempre relacionados com altas taxas de mortalidade (KOURKOUMPETIS et al., 2010; KREUSCH & KARSTAEDT, 2013). As leveduras

1 do gênero *Candida* têm sido consideradas como um dos principais agentes
2 causadores de infecção sistêmica de origem hospitalar e representam o principal
3 fungo causador de infecção de corrente sanguínea, sendo o quarto micro-
4 organismo mais frequente isolado em hemoculturas totalizando 8 a 17% de todas
5 as infecções de corrente sanguínea de origem hospitalar (EGGIMANN et al.,
6 2003; GALBÁN & MARISCAL, 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2007). Já se
7 considera que as infecções mais invasivas podem estar relacionadas com os
8 atuais avanços técnico-científicos da medicina e das ciências farmacêuticas
9 (EGGIMANN et al., 2003; BUTLER et al., 2009).

10 Nos últimos 20 anos, diversos fatores têm contribuído para o aumento
11 da incidência de infecções por *Candida* spp., os mais importantes incluem:
12 aumento da população imunodeprimida, utilização de antimicrobianos de amplo
13 espectro e de agente citotóxicos, e aumento do número de transplantes
14 (EGGIMANN et al., 2003; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; PFALLER &
15 DIEKEMA, 2007).

16 Pacientes imunossuprimidos devido à terapia imonossupressora,
17 principalmente os pacientes oncológicos ou transplantados, e
18 imunocomprometidos devido à infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida
19 (HIV) constituem um grupo de pacientes altamente susceptíveis às infecções por
20 espécies que até então, eram consideradas pouco patogênicas ou mesmo não
21 patogênicas (KÖSE et al., 2012; PATEL et al., 2012; CHAVES et al., 2013;
22 JOHNSTON et al., 2013; KREUSCH & KARSTAEDT, 2013; KWAMIN et al.,
23 2013).

24 A epidemiologia das candidíases hematogênicas vem sofrendo
25 alterações no decorrer das últimas duas décadas, com particular aumento na

1 incidência das espécies de *Candida* não-*albicans* (BUTLER et al., 2009;
2 FAROOGI et al. 2012; PATEL et al., 2012). Embora a espécie *Candida albicans*
3 seja considerada a principal espécie do gênero, o aumento da incidência de
4 outras espécies vem se tornando frequente em muitos centros médico-
5 hospitalares em todo o mundo (NUCCI et al., 2013; TORTORANO et al., 2013).
6 Aproximadamente 90% das infecções por *Candida* spp. são atribuídas as
7 espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, embora
8 a espécie *C. albicans* venha apresentando redução em sua frequência em
9 determinadas regiões geográficas (PFALLER & DIEKEMA, 2007; MONTAGNA et
10 al., 2010; ERICSSON et al., 2013; NUCCI et al., 2013; MONTAGNA et al., 2013;
11 TORTORANO et al., 2013).

12 Na literatura são encontrados estudos epidemiológicos com as mais
13 variadas taxas de frequência das espécies, sempre dependendo da casuística e
14 região geográfica de cada centro avaliado. Nos Estados Unidos, Reino Unido,
15 França, Alemanha e Noruega, *C. glabrata* foi a espécie de *Candida* não-*albicans*
16 mais frequente causando candidíase hematogênica, enquanto que, na Espanha,
17 Israel e em muitos países da América Latina, foi a *C. parapsilosis* (PFALLER &
18 DIEKEMA, 2007; MARCHETTI et al., 2004; TORTORANO et al., 2004; MALLIÉ et
19 al., 2005; PÉMAN et al., 2005; PFALLER & DIEKEMA, 2007; BORG-VON
20 ZEPELIN, 2008; GONZÁLEZ et al., 2008; NUCCI et al., 2013). Em algumas
21 regiões do Brasil, *C. parapsilosis* também é a principal espécie causando esse
22 tipo de infecção (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010, NUCCI et al., 2013).
23 Assim como a etiologia das infecções por *Candida*, as taxas de mortalidade
24 também são variáveis, sendo superiores em infecções por *C. krusei* e *C. glabrata*
25 e inferiores em *C. parapsilosis*. Muitos fatores, tanto do hospedeiro como do

1 agente etiológico, podem estar associados a essas taxas, como por exemplo,
2 idade e gravidade de comorbidades, ausência ou demora na administração de
3 tratamento e presença de dispositivos médicos, como uso de cateteres
4 (EGGIMANN et al., 2003; PFALLER & DIEKEMA, 2007; NUCCI et al., 2013).

5 Integrante da microbiota humana, *C. albicans* é um patógeno oportunista
6 capaz de causar infecções tanto superficiais como invasivas (EGGIMANN et al.,
7 2003; SIDRIM & ROCHA., 2004; COOPER, 2011). Essa espécie é considerada a
8 mais patogênica do gênero, o que a torna melhor estudada em termos de
9 patogênese. Os fatores de virulência mais importantes incluem a produção de
10 adesinas e enzimas extracelulares e capacidade de se alternar da forma
11 leveduriforme para filamentosa (crescimento em forma de hifas), (HOYER, 2001;
12 NIEWERTH & KORTING, 2001; NAGLIK et al., 2003; SUDBERY et al, 2004).
13 Ambas as formas morfológicas são importantes na virulência, as hifas estão mais
14 envolvidas nos processos de adesão, invasão e formação de biofilme enquanto
15 que as células leveduriformes são mais importantes para a disseminação e
16 colonização inicial no hospedeiro (FINKEL & MITCHELL, 2011). Em 1995, foi
17 identificada uma nova espécie causando infecção orofaríngea, em pacientes
18 portadores de HIV (SULLIVAN et al., 1995), denominada *Candida dubliniensis*,
19 que possui características fenotípicas anteriormente consideradas exclusivas à
20 espécie *C. albicans*, como produção de hifas e clamidósporos (SULLIVAN et al.,
21 1995; SULLIVAN & COLEMAN 1998; SULLIVAN et al., 2005; CITIULO et al.,
22 2009). Filogeneticamente, *C. dubliniensis* apresenta-se muito próxima à *C.*
23 *albicans*, o que torna ainda mais difícil a diferenciação destas espécies em
24 amostras clínicas (GILFILLAN et al., 1998; MCMANUS et al., 2008). *C.*
25 *dubliniensis* é a única espécie de *Candida* não-*albicans* capaz de formar hifas

1 (SULLIVAN et al., 1995; SULLIVAN & COLEMAN, 1998). Embora, haja
2 proximidade entre as duas espécies, *C. albicans* é muito mais prevalente que *C.*
3 *dublinskiensis*, sendo *C. albicans* presente em mais de 50% dos casos de infecção
4 sistêmica e *C. dublinskiensis* em cerca de 2 a 3% (KIBBLER et al., 2003; ODDS et
5 al., 2007; PFALLER & DIEKEMA, 2007). Estudos compararam as duas espécies
6 quanto à habilidade de causar infecção, e *C. albicans* apresentou-se
7 significativamente mais patogênica que *C. dublinskiensis*, em todos os modelos de
8 infecção avaliados (GILFILLAN et al., 1998, VILELA et al., 2002; STOKES et al.,
9 2007; ÁSMUNSDÓTTIR et al.; 2009; SPIERING et al., 2010; KOGA-ITO et al.,
10 2011). Por outro lado, estudos *in-vitro*, para avaliação de padrões fenotípicos,
11 demonstraram que *C. dublinskiensis* apresenta níveis mais elevados de atividade
12 proteolítica e aderência a células do epitélio bucal, além de maior taxa de
13 alteração de fenótipo (transição levedura-hifa) (MCCULLOUGH et al., 1995;
14 GILFILLAN et al., 1998, HANNULA et al., 1997; DE REPENTIGNY et al., 2000).
15 Como suas características morfológicas e fisiológicas são extremamente similares às
16 de *C. albicans*, diversos laboratórios têm concentrado esforços na tentativa de
17 diferenciação dessas duas espécies. *C. dublinskiensis* encontra-se associada a
18 infecções de orofaringe, principalmente em pacientes acometidos pelo HIV,
19 porém já foi relatada causando candidíase hematogênica em pacientes
20 oncológicos e pediátricos (SILVA et al., 2003; KALKANCI et al., 2005; PFALLER
21 & DIEKEMA, 2007).

22 *Candida parapsilosis* faz parte da microbiota da pele e mucosas,
23 apresenta potencial capacidade de formar biofilme em superfícies bióticas e
24 abióticas, como células do tecido epitelial e cateteres ou outros dispositivos
25 médicos, e apresenta afinidade por soluções parenterais, soluções de uso na

1 hemodiálise e muitas áreas do ambiente hospitalar. Por este motivo, é facilmente
2 isolada causando infecções invasivas em pacientes pediátricos e neonatos ou
3 que fazem uso dos materiais acima (FRIDKIN & JARVIS, 1996; PFALLER &
4 DIEKEMA, 2007; TROFA et al., 2008). Também já foi demonstrado o isolamento
5 de leveduras dessa espécie das mãos de profissionais da saúde e aparelhos por
6 eles manuseados (STRAUSBAUGH et al., 1994; HUANG et al. 1999; LUPETTI et
7 al., 2002). Desde a década de 1990, *C. parapsilosis* é conhecida por apresentar
8 três grupos, ou genótipos, distintos, que a partir de 2005, com auxílio de técnicas
9 moleculares, foram mais bem caracterizados e classificados então como três
10 espécies crípticas distintas (TAVANTI et al., 2005). As espécies foram nomeadas
11 como *C. parapsilosis* (antigo grupo I), *C. metapsilosis* (grupo II) e *C. orthopsilosis*
12 (grupo III). Ainda não foram descritas técnicas não moleculares para a
13 diferenciação das espécies do grupo “*psilosis*”. Estudos de melhor caracterização
14 dessas espécies estão começando a despontar na literatura, até o momento
15 sabe-se que a susceptibilidade antifúngica e produção de biofilme são diferentes
16 (LATTIF et al., 2010; MELO et al., 2011; TOSUN et al., 2012; RUIZ et al., 2013).
17 Estudos recentes descrevem a presença de *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* em
18 menos de 10% de isolados previamente descritos como *C. parapsilosis*, e já foi
19 reportado que as espécies *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* podem apresentar
20 menor susceptibilidade aos azóis, maior susceptibilidade às equinocandinas e
21 igual susceptibilidade para anfotericina quando comparadas a *C. parapsilosis*
22 (LOCKHART et al., 2008a, SILVA et al., 2009; CANTÓN et al., 2010; CANTÓN et
23 al., 2011). Em 2008, a levedura da espécie *Lodderomyces elongisporus* foi
24 também descrita causando infecções invasivas, e se caracteriza por ser capaz de
25 formar ascósporos e ser fenotipicamente muito similar, e filogeneticamente

1 próxima a *C. parapsilosis*, o que pode acarretar em erros de identificação
2 (LOCKHART et al., 2008b; BUTLER et al., 2009).

3 Já a espécie *C. tropicalis* tem apresentado maior frequência causando
4 infecções em pacientes hemato-oncológicos e neutropênicos. A infecção por essa
5 espécie está associada ao longo período de internação em unidades de terapia
6 intensivas (UTIs), sendo que já foi também relatado casos de mialgia e miosite
7 grave nestes grupos de pacientes (EGGIMANN et al., 2003; PFALLER &
8 DIEKEMA, 2007; NUCCI et al., 2013; FAROOGI et al., 2013).

9 Infecções por *C. glabrata* podem estar relacionadas aos pacientes com
10 idades mais avançadas, período de utilização de antimicrobianos de amplo
11 espectro, uso profilático de fluconazol, uso de cateter venoso central e
12 administração de nutrição parenteral. O uso profilático do fluconazol pode ser um
13 fator decisivo no aumento da frequência de isolamento dessa espécie, uma vez
14 que ela pode apresentar-se resistente a este antifúngico (MARCHETTI et al.,
15 2004; PFALLER & DIEKEMA, 2007; TORTORANO et al., 2013). A espécie *C.*
16 *glabrata* é haplóide e filogeneticamente mais próxima do clado de *S. cerevisiae*,
17 diferentemente das demais espécies do gênero *Candida* que pertencem ao
18 mesmo clado de *C. albicans* (BUTLER et al., 2009; SHERWOOD & BENNETT,
19 2009). Outras espécies menos frequentes e fenotipicamente similares a *C.*
20 *glabrata*, como *C. nivariensis* e *C. bracarensis*, já foram descritas causando
21 infecções (LOCKHART et al., 2009a).

22 *C. krusei*, tem maior relevância em algumas populações de pacientes
23 oncológicos devido ao uso profilático do fluconazol, mas sua incidência tem se
24 mantido estável nos últimos anos e é considerada baixa, em relação às demais
25 espécies, em casuísticas brasileiras (FRIDKIN & JARVIS, 1996; EGGIMANN et

1 al., 2003; COLOMBO et al., 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2007; BRUDER-
2 NASCIMENTO et al., 2010; SCORZONI et al., 2013). *C. norvegensis* e *C.*
3 *inconspícua* são espécies pouco frequentes, porém são morfológica e
4 fisiologicamente semelhantes à *C. krusei* e possivelmente também apresentam
5 resistência intrínseca ao fluconazol (DE HOOG et al., 2000; FLEISCHMANN &
6 SRIPUNTANAGOON, 2011; KURTZMAN et al., 2011). Alguns estudos já
7 descreveram casos de infecção causada por *C. inconspícua* em pacientes HIV
8 positivos e hemato-oncológicos. *C. norvegensis* já foi isolada causando infecção
9 em pacientes da Noruega, Japão e Holanda (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

10 *C. guilliermondii* pode estar associada a endocardites em pacientes que
11 fazem uso de drogas intravenosas, possivelmente devido à necessidade do uso
12 prolongado de dispositivos invasivos. Já foi sugerida hipótese de associação
13 dessa espécie com cirurgias cardiovasculares e/ou abdominais (PFALLER &
14 DIEKEMA, 2007; DIEKEMA et al., 2012). Já foram demonstrados isolados de *C.*
15 *fermentati* identificados erroneamente como *C. guilliermondii* devido à
16 similaridade entre essas duas espécies (LOCKHART et al., 2009b).

17 *C. rugosa* pode estar associada à candidemia na presença de cateteres
18 intravenosos ou pacientes queimados (FRIDKIN & JARVIS, 1996; PFALLER &
19 DIEKEMA, 2007; DIEKEMA et al., 2009). Tanto *C. rugosa* quanto *C. guilliermondii*
20 são mais comumente descritas na América Latina, relatadas em 4 a 5% das
21 infecções (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

22 Espécies menos frequentes como *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. zeylanoides*,
23 *C. sake*, *C. valida*, *C. intermedia*, *C. humicola*, *C. pelliculosa*, *C. viswanathii*, *C.*
24 *pulcherrima*, *C. lipolytica* e *C. haemulonii* também já foram relatadas causando
25 infecções em humanos (EGGIMANN et al., 2003; PFALLER et al., 2007;

1 DIEKEMA et al., 2009). Recentemente, a utilização de técnicas de biologia
2 molecular permitiu, ainda, identificar novas espécies responsáveis por infecções
3 no ser humano (LOCKHART et al., 2008a; LOCKHART et al., 2008b; TROFA et
4 al., 2008; DIEKEMA et al., 2009).

5 A identificação acurada do agente causador de infecções fúngicas
6 invasivas pode ter impacto no prognóstico, já que o tratamento deve ser ajustado
7 de acordo com cada espécie, e, do ponto de vista de saúde pública, o
8 conhecimento dos agentes pode nortear o tratamento empírico na
9 indisponibilidade dos testes laboratoriais. Assim, diferentes abordagens para
10 identificação desses micro-organismos são propostas.

11 Devido à grande similaridade fenotípica dentre as espécies deste
12 gênero, os laboratórios têm de lançar mão de técnicas atuais e nem sempre de
13 custo acessível para garantir diagnóstico acurado. Atualmente, são utilizados
14 meios de cultura diferenciais como alternativas menos onerosas na prática
15 laboratorial. Os meios cromogênicos, como o CHROMagar *Candida*®,
16 apresentam boa sensibilidade e especificidade na identificação presuntiva de
17 determinadas espécies. Porém a identificação presuntiva, apesar de rápida e
18 prática, deve ser complementada com outros testes, seja pela metodologia
19 tradicional com provas bioquímicas e fisiológicas, sendo os testes automatizados
20 uma boa opção para uma rotina diagnóstica (PINCUS et al., 2007)

21 Com os avanços da biologia molecular, principalmente no campo do
22 diagnóstico molecular, novas técnicas estão sendo empregadas, com sucesso, na
23 detecção e identificação do agente etiológico, sejam eles fungos, bactérias, vírus,
24 protozoários, entre outros, inclusive sem a necessidade de cultivo do mesmo.
25 (ERLICH & SAIKI, 1988). Espécies mais raras puderam ser mais facilmente

1 identificadas, além do relato de novas espécies, que na maioria das vezes são
2 indistinguíveis fenotipicamente (SATO et al., 2007; SATO & MURAKAMI, 2008;
3 TOJU et al., 2012). Regiões do genoma fúngico, como as regiões de DNA
4 ribossômico (rDNA) são de grande utilidade para a identificação rápida pela
5 reação da PCR, pois apresentam, simultaneamente regiões constantes, não-
6 variáveis, que estão presentes em todos os fungos e também sequências
7 variáveis únicas para cada espécie ou grupo de espécies próximas (WHITE et al.,
8 1990; GARDES & BRUNS, 1993; SATO et al., 2007; SATO & MURAKAMI, 2008;
9 SCHOCH et al., 2012; TOJU et al., 2012). Até o presente, mais de 90.000
10 sequências da região ITS (Internal Transcribed Spacer) de fungos estão
11 depositadas em bases de dados de acesso público (HIBBETT et al., 2011), o que
12 faz dessa região gênica a mais importante e amplamente utilizada para fins de
13 identificação (SEIFERT 2009; HENRIK-NILSSON et al., 2011; SCHOCH et al.,
14 2012). Primers universais, sugeridos por White et al. (1990) e Gardes & Bruns
15 (1993) vêm sendo empregados, com sucesso, para amplificação e
16 sequenciamento da região ITS de diversos fungos (WHITE et al., 1990; GARDES
17 & BRUNS, 1993; EGGER, 1995; MARTIN & RYGIEWICZ 2005). Embora em
18 menor proporção, outras regiões de rDNA, como a região D1/D2, também têm
19 sido utilizadas. Linton et al., (2007), utilizaram o sequenciamento da região
20 hipervariável D1/D2 para identificação de mais de 3.000 isolados, além da boa
21 correlação com os dados de identificação fenotípica, o sequenciamento de D1/D2
22 foi capaz de identificar algumas novas espécies potencialmente patogênicas. O
23 emprego das regiões ITS1-5.8S-ITS2 e D1/D2, vem sendo considerado “padrão
24 ouro” em termos de diagnóstico molecular, desde que o CLSI (Clinical Laboratory
25 Standards Institute), publicou uma normativa, o MM18-A, que padroniza a técnica

1 para laboratórios de diagnóstico molecular (IWEN et al., 2002; PINCUS et al.,
2 2007; CLSI, 2008).

3 Atualmente, as técnicas de biologia molecular são consideradas mais
4 fidedignas para identificação e diferenciação das espécies (BRITO-GAMBOA et
5 al., 2006), e embora a implementação dessas técnicas seja onerosa, a
6 manutenção do serviço não é considerada de alto custo.

7 Considerando que cada espécie pode apresentar diferentes padrões de
8 infecção, virulência, frequência, susceptibilidade às drogas, entre outros, torna-se
9 importante o conhecimento das principais espécies causadoras de infecção, bem
10 como características pertinentes a cada uma dessas espécies. Para a utilização
11 de qualquer que seja o método existe o consenso de que nenhuma metodologia,
12 por mais inovadora que seja, não substitui o profissional capacitado.

13 Em paralelo aos métodos de identificação molecular, métodos de
14 tipagem molecular para a diferenciação e detecção dos genótipos de uma mesma
15 espécie vêm evoluindo muito em leveduras e micro-organismos em geral.
16 Técnicas como a do cariótipo obtido por eletroforese com alternância do campo
17 elétrico (PFGE, *Pulsed field gel electrophoresis*), com análise de polimorfismo de
18 DNA gerado pela amplificação de fragmentos com uso de *primers* arbitrários
19 (RAPD, *Random amplified polymorphic DNA*), entre outras, estão sendo
20 frequentemente empregadas na genotipagem destes micro-organismos, e vários
21 genes e/ou regiões genômicas podem ser empregados nestes estudos
22 (WILLIAMS et al., 1990; MALONE et al., 1993; WRESTLER et al., 1996; BASIM &
23 BASIM, 2001).

24 Algumas regiões gênicas em particular, como os introns do grupo I,
25 comuns em genomas de algumas organelas celulares, como na mitocôndria, e

1 em alguns genes do núcleo, como o rRNA, vêm sendo particularmente
2 estudadas por apresentarem aspectos evolutivos peculiares. Os introns do grupo I
3 apresentam características especiais: eles próprios realizam sua remoção do pré-
4 mRNA e ligam os éxons, fenômeno denominado *self-splicing*. Alguns introns
5 desse grupo são elementos móveis, capazes de se transferir para alelos que não
6 os contêm, pelo processo denominado *homing*, iniciado com o corte do DNA por
7 uma endonuclease codificada pelo próprio intron (GILBERT, 1985; CECH, 1990;
8 HARRIS & ROGERS, 2008). Além da transferência vertical, onde um intron do
9 grupo I mobiliza de um alelo para outro que não o continha, já são conhecidos
10 também casos de transferência horizontal, onde os introns do grupo I podem
11 transferir de uma espécie para outra, como o observado no gene COX1 do
12 genoma mitocondrial da planta vascular *Peperomia polybotrya*, a qual teria
13 adquirido um intron do grupo I a partir de um fungo (CHO et al.; 1998; HAUGEN
14 et al., 2005).

15 Técnicas para detectar a presença ou tamanho destes introns na região
16 25S de rDNA são particularmente de fácil execução, e podem ser facilmente
17 adaptadas para uso em laboratórios de rotina para rápida caracterização de um
18 grande número de isolados (MCCULLOUGH et al. 1999; TAMURA et al., 2001;
19 ZHANG & LEIBOWITZ et al., 2001; DISNEY et al., 2004; XIAO et al., 2005), e
20 além de auxiliar na identificação, também são importantes para genotipagem
21 desses isolados (MCCULLOUGH et al., 1999; KARAHAN et al., 2004). Tamura et
22 al. (2001) caracterizaram um novo genótipo de *C. albicans* e detectaram novos
23 isolados de *C. dubliniensis*, em 301 isolados previamente identificados
24 fenotipicamente como *C. albicans*, e também discutiram a possível origem dos
25 introns do grupo I em *C. albicans* e sua associação com a susceptibilidade

1 antifúngica. Isolados com fragmentos maiores de intron do grupo I seriam
2 possivelmente mais susceptíveis aos antifúngicos.

3 A frequência com que o DNA é transferido de uma espécie para outra é
4 uma das principais implicações ligadas aos introns do grupo I, tanto no campo da
5 microbiologia, devido à possível aquisição de resistência a drogas, como na
6 botânica, devido aos transgênicos (CHO et al., 1998; HARRIS & ROGERS 2008).
7 Tendo em vista que o fragmento de DNA representado pelo intron do grupo I
8 obrigatoriamente necessita ser excisado do RNA transcrito para que o gene onde
9 o mesmo esteja inserido não seja inativado, novas terapias para inibição do
10 *splicing* desses introns vêm sendo estudadas na tentativa de desenvolver
11 tratamentos clínicos para as infecções fúngicas pela simples inibição da produção
12 do rRNA nestes micro-organismos (HARRIS & ROGERS 2008).

13 O intron do grupo I presente em *C. albicans* (Ca.LSU, *C. albicans large*
14 *subunit*) vem sendo apontado como um novo alvo para desenvolvimento de novas
15 drogas para combater a infecção por esse micro-organismo, uma vez que esses
16 introns não estão presentes em células de mamíferos (JAYAGURU et al., 2007).
17 Diversos agentes estão sendo estudados, com sucesso, para inibir ou alterar o
18 funcionamento adequado desse intron, como por exemplo, as drogas bleomicina,
19 a pentamidina, 5-flurouracila e 5-fluorocitosina (MERCURE et al., 1993; MILETTI
20 & LEIBOWITZ, 2000; ZHANG et al., 2002; JAYAGURU et al., 2007) e pequenos
21 oligonucleotídeos (DISNEY et al., 2004). O intron Ca.LSU apresenta 379 bases e
22 sua estrutura secundária permite que os nucleotídeos localizem-se de acordo
23 com as posições específicas para que ocorra o *self-splicing* (MERCURE et al.,
24 1997). Além da espécie críptica *C. dubliniensis*, *C. albicans* apresenta ainda
25 quatro diferentes genótipos A, B, C e E, este último descrito uma única vez no

1 Japão por Tamura et al. (2001). A diferenciação e/ou identificação desses
2 genótipos pode ser fator determinante na comprovação de um surto hospitalar. O
3 uso dos introns do grupo I, como ferramenta para a detecção de surtos, ainda é
4 pouco explorada, embora algumas características peculiares a estes elementos já
5 estejam bem descritas, como, por exemplo, a sua forma de apresentação. A
6 presença destes introns pode variar de acordo com a sua apresentação no
7 genoma, uma vez que *C. albicans* e *C. dubliniensis* são leveduras diplóides, os
8 introns do grupo I, quando presentes, podem apresentar-se em heterozigose ou
9 homozigose.

10 O genótipo A de *C. albicans* não apresenta o intron do grupo I; o
11 genótipo B apresenta o intron do grupo I (390 pb), em um único alelo,
12 heterozigose; o genótipo C apresenta em ambos os alelos, homozigose; e o
13 genótipo E apresenta o intron do grupo I em ambos os alelos, porém com 950pb.
14 Em *C. dubliniensis* o intron do grupo I apresenta 630 nucleotídeos, 240 a mais
15 que em *C. albicans*, em ambos os alelos (MCCULLOUGH et al. 1999; TAMURA
16 et al., 2001; ZHANG & LEIBOWITZ et al., 2001; DISNEY et al., 2004; XIAO et al.,
17 2005).

18 O emprego dos introns do grupo I de *C. albicans* em estudos de tipagem
19 molecular é bastante promissor, pois auxilia tanto na diferenciação das espécies
20 crípticas de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, quanto na caracterização dos diferentes
21 genótipos de *C. albicans*, além de, eventualmente, estar associado à maior ou
22 menor susceptibilidade aos antifúngicos. Recentes estudos epidemiológicos têm
23 sido fundamentais no conhecimento dos perfis de susceptibilidade de *Candida*
24 spp. e têm também direcionado, clínicos e pesquisadores, quanto ao uso da
25 droga adequada no tratamento dessas infecções (COLOMBO et al., 2006;

1 MESSER et al., 2006; MOKADDAS et al., 2007; PFALLER et al., 2007; MESSER
2 et al., 2009; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010).

3 A anfotericina B é a droga que apresenta melhor atividade no tratamento
4 de infecções por leveduras do gênero *Candida spp.*, embora já tenha sido
5 observado o isolamento de algumas cepas resistentes (STERLING & MERZ
6 1998; PFALLER & DIEKEMA, 2007; DIEKEMA et al., 2009; BRUDER-
7 NASCIMENTO et al., 2010). A avaliação da resistência a anfotericina B apresenta
8 dificuldades, pois o CLSI, não apresenta pontos de corte definidos para esta
9 droga (M27-A3, CLSI). O Etest®, por sua vez, foi demonstrado conduzir a
10 resultados mais correlacionados com o que ocorre *in-vivo* (PAREDES, 2009). A
11 anfotericina B se liga ao ergosterol da membrana celular do fungo, que resulta em
12 mudança na permeabilidade de membrana. Infelizmente, membranas de células
13 de mamíferos também contêm esteróis, tais como o colesterol ao qual a
14 anfotericina B também pode se ligar, porém com menor afinidade. Por outro lado,
15 pode conduzir a peroxidação lipídica, com aumento da permeabilidade da
16 membrana celular fúngica, ou a extravasamento de Ca^{2+} . Estes mecanismos
17 podem justificar parcialmente a toxicidade da anfotericina B no ser humano
18 (BRAJTBURG & BOLARD, 1996; DUPONT, 2002; ADLER-MOORE & PROFFITT,
19 2008). Os mecanismos de resistência do gênero *Candida* à anfotericina B ainda
20 não estão claramente demonstrados. Alguns autores já observaram resistência à
21 anfotericina B em cepas deficientes para ergosterol (SANGLARD et al., 2003).
22 Alguns genes, como SOD2, YHB1, AOX1, AOX2, CTA1, GSH1, ERG3, ERG6 e
23 ERG11, podem estar envolvidos nos mecanismos de resistência a anfotericina B,
24 mas ainda necessitam maior investigação (SANGLARD et al.2003; LIU et al;
25 2005; VANDEPUTTE et al., 2007; VANDEPUTTE et al 2009).

1 As equinocandinas, também empregadas mais recentemente em
2 hospitais brasileiros, apresentam excelente atividade frente às espécies de
3 *Candida* (PFALLER et al., 2012). Alguns pesquisadores detectaram isolados de
4 *C. parapsilosis* resistentes às equinocandinas e triazóis, considerados
5 multirrestentes. As espécies *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* apresentam níveis
6 de concentração inibitória mínima (CIM) mais elevados para os antifúngicos do
7 grupo das equinocandinas (PFALLER & DIEKEMA. 2007). As equinocandinas
8 atuam na β -1,3-glucano sintetase, responsável por garantir a integridade da
9 parede celular fúngica. Se essa enzima for inibida, acarretará em prejuízos à
10 parede celular levando a instabilidade osmótica e lise celular (CUENCA-
11 ESTRELLA, 2010). Os genes envolvidos na síntese da β -1,3-glucano sintetase
12 são os da família FKS, mais precisamente o FKS1, FKS2 e FKS3 (GARCIA-
13 EFFRON et al., 2009). Em alguns casos em que a caspofungina foi ineficaz no
14 tratamento foram identificadas mutações, polimorfismos, nesses genes
15 (ARENDRUP et al, 2007; GARCIA-EFFRON et al. 2010; MUNRO, 2010;
16 BAIXENCH et al., 2011).

17 Os derivados azólicos, como o fluconazol e o voriconazol, apresentam
18 atividade contra o citocromo P-450 do fungo, inibindo a síntese de ergosterol, o
19 que interrompe a síntese da membrana celular do fungo (SANGLARD et al., 2003;
20 CUENCA-ESTRELLA, 2010). A reação de biossíntese de ergosterol pode ser
21 variável entre as diferentes espécies de *Candida* spp.. Existem mecanismos de
22 resistência aos azóis em leveduras do gênero *Candida*, principalmente para o
23 fluconazol, como por exemplo, a alteração da enzima responsável pela síntese do
24 ergosterol e ativação de bombas de efluxo de fluconazol (FIDEL et al., 1999).
25 Alguns genes já foram demonstrados estar envolvidos nesses fenótipos, como os

1 da família ERG, os genes CDR e os MDR (VANDEPUTTE et al., 2009; CUENCA-
2 ESTRELLA, 2010).

3 O fluconazol é droga mais frequentemente empregada no tratamento de
4 infecções por *Candida* spp. e tem se mostrado bastante eficaz, com taxas de
5 susceptibilidades superiores a 90%. No início, a ampla utilização dessa droga na
6 prática clínica, seja para tratamento de infecções ou uso profilático, foi alvo de
7 preocupação em relação à emergência de isolados resistentes e/ou resistência
8 cruzada com outros azóis, como itraconazol, posaconazol e voriconazol, mas até
9 o momento a hipótese não foi confirmada (MESSER et al., 2006, PFALLER et al.,
10 2006; PFALLER et al., 2007; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; WESTBROOK
11 et al., 2010; CATALDO & PETROSILLO, 2011; LINGEGOWDA et al., 2011).

12 Nem todas as espécies são sensíveis ao fluconazol, *C. krusei* apresenta
13 resistência intrínseca e outras espécies como *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C.*
14 *rugosa*, podem apresentar sensibilidade diminuída (MOKADDAS ET AL., 2006;
15 PFALLER et al., 2006; MESSER et al., 2009). Já foram detectados isolados de *C.*
16 *glabrata* resistentes ao fluconazol (PFALLER & DIEKEMA, 2007). O voriconazol,
17 mais recentemente introduzido nos hospitais brasileiros, foi avaliado em
18 comparação ao fluconazol em um estudo epidemiológico global e foi demonstrado
19 apresentar susceptibilidade superior para as principais espécies, como *C.*
20 *albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, exceto *C.*
21 *tropicalis*. Por outro lado, a susceptibilidade ao voriconazol foi menor frente às
22 espécies que apresentaram resistência ao fluconazol, como alguns isolados de *C.*
23 *albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. rugosa* (PFALLER et al., 2007). Na França,
24 Mallié et al. (2005) utilizaram o Etest® (AB Biodisk) para determinar a
25 concentração inibitória mínima frente ao fluconazol e voriconazol e verificaram

1 que espécies com menor susceptibilidade ao fluconazol apresentam taxa de
2 susceptibilidade de 99% ao voriconazol, enquanto que espécies resistentes ao
3 fluconazol apresentaram taxa de susceptibilidade de aproximadamente 71% ao
4 voriconazol.

5 Desde 1992 existe a preocupação em padronizar os testes de
6 susceptibilidade a drogas antifúngicas. O CLSI elaborou um protocolo que deveria
7 ser seguido por todos os laboratórios na tentativa de padronizar os testes
8 empregados para determinação da concentração inibitória mínima de fungos
9 leveduriformes aos antifúngicos. O primeiro documento, o M27-A foi aprovado em
10 1997 (M27-A, CLSI). Concomitantemente, o EUCAST (*European Committee on*
11 *Antimicrobial Susceptibility Testing*) desenvolveu um protocolo equivalente ao
12 publicado pelo CLSI, atualmente considerado uma metodologia alternativa, com
13 diferenças sutis. Atualmente já existe a terceira versão do documento do CLSI, o
14 M27-A3, com mínimas modificações na metodologia e inclusão de novas drogas
15 (M27-A3, CLSI).

16 Além das técnicas que empregam meios líquidos para determinação da
17 CIM, o CLSI também padronizou um método de difusão em discos para fungos
18 leveduriformes (M44-A, CLSI). Este método é relativamente simples, bastante
19 similar ao empregado em bacteriologia, porém o documento só apresenta os
20 pontos de corte para o fluconazol e voriconazol.

21 Outros métodos, relativamente mais simples, têm sido empregados na
22 prática diária. A técnica que apresenta maior concordância com o método
23 padronizado de microdiluição é o método comercial Etest®, utilizado para
24 determinação de CIMs de fungos leveduriformes e filamentosos (DÓCZI et al.,
25 2004; JOHNSON, 2008). Sensititre YeastOne® e o ATB Fungus 2® são outros

1 métodos comerciais disponíveis, porém apresentam menor aceitação quando
2 comparados ao Etest® (JOHNSON, 2008; PAREDES, 2009). O VITEK®, método
3 automatizado, que utiliza espectrofotometria para leitura da CIM, embora
4 apresente maior custo, demonstrou boa concordância com o método padronizado
5 pelo CLSI (PINCUS et al., 1999; PINCUS et al., 2007; PETERSON et al., 2011).
6 Embora existam inúmeras técnicas para detecção da susceptibilidade às
7 principais drogas antifúngicas disponíveis, características do micro-organismo,
8 como por exemplo, a capacidade de adesão e formação de biofilme, podem
9 reduzir o poder de ação das drogas.

10 Biofilmes são agregados de micro-organismos unicelulares formando
11 estruturas multicelulares que aderem às superfícies. Esta formação pode ocorrer
12 em resposta a vários fatores incluindo alta densidade celular, privação de
13 nutrientes e estresse físico-ambiental (O'TOOLE et al., 2000; HALL-STOODLEY
14 *et al*, 2004). Bactérias e fungos patogênicos são capazes de formar biofilme
15 (HAWSER & DOUGLAS, 1994; TUNNEY et al., 1996; DONLAN, 2001).
16 Considerando que os biofilmes, geralmente, são mais resistentes aos
17 mecanismos de defesa do hospedeiro e às drogas antimicrobianas do que as
18 células dispersas, eles representam um fator predisponente de infecção para
19 muitos pacientes (BAILLIE & DOUGLAS, 1998; BAILLIE & DOUGLAS, 2000;
20 DONLAN, 2001; KONTOYIANNIS & LEWIS, 2002; RAMAGE *et al.*, 2002;
21 SANGLARD & ODDS, 2002),

22 Em síntese, biofilmes utilizam um sistema sofisticado de comunicação
23 intercelular, o *quorum-sensing* (WATERS & BASSLER, 2005, ALBUQUERQUE &
24 CASADEVALL, 2012), que envolve a formação de uma matriz polimérica
25 extracelular, dependente da adesão célula-substrato e célula-célula, e pode ser

1 composta de múltiplos tipos celulares. Muitas dessas características são
2 compartilhadas com tecidos de eucariotos superiores, e esta analogia desperta a
3 hipótese de que o biofilme formado por micro-organismos pode representar o
4 primeiro passo da evolução da multicelularidade em eucariotos superiores (SOLL,
5 2008). A presença de biofilme em dispositivos médicos está geralmente
6 associada à infecção de corrente sanguínea, o que chegou a causar, só nos EUA,
7 mais de 10 milhões de mortes associadas a cateter por ano (DONLAN &
8 COSTERTON, 2002; KOJIC & DAROUICHE, 2004).

9 Espécies de *Candida*, em geral, são capazes de aderir a superfícies
10 bióticas e abióticas, podendo levar a formação de biofilme, que se comporta como
11 potente fator de virulência desses micro-organismos (CALDERONE & BRAUN,
12 1991, REX, 1996). Esses biofilmes podem se formar em superfícies inertes de
13 dispositivos implantados como cateteres, próteses de válvulas cardíacas, de
14 substituições de articulações, entre outros materiais médicos e não-médicos
15 (BRANCHINI *et al.*, 1994; HAWSER & DOUGLAS, 1994; TUNNEY *et al.*, 1996;
16 KUMAR & ANAND, 1998; DONLAN, 2001). Biofilmes de *Candida* têm recebido
17 considerável atenção devido à alta prevalência em superfícies de cateteres
18 (BRANCHINI *et al.*, 1994) e à notória resistência aos antifúngicos
19 (KONTOYIANNIS & LEWIS, 2002; SANGLARD & ODDS, 2002).

20 Uma vez que nenhuma terapia é capaz de erradicar por completo o
21 biofilme de *Candida*, a colonização dos dispositivos médicos por esse micro-
22 organismo frequentemente resulta em sua perda funcional e na maioria dos casos
23 é necessária a remoção e/ou a substituição do dispositivo (EERENSTEIN *et al.*,
24 1999). As células liberadas do biofilme podem migrar para a corrente sanguínea e
25 causar infecções sistêmicas (RAMAGE *et al.*, 2002).

1 A formação do biofilme em *C. albicans* vem sendo descrita como um
2 processo gradual que se inicia com a aderência a um substrato, seja o próprio
3 tecido do hospedeiro, dispositivo médico ou outra superfície inerte, resultando na
4 formação de uma confluyente camada basal de células que se dividem e produzem
5 hifas, como projeções tubulares direcionadas para a região superior do biofilme
6 (SOLL, 2008). Células do biofilme desenvolvem uma estável matriz extracelular de
7 substâncias poliméricas de composição muito variável (CHANDRA *et al.*, 2001
8 DOUGLAS, 2003; SOLL, 2008). O estágio final do desenvolvimento do biofilme é
9 o estágio de maturação, quando ocorre menor crescimento das leveduras,
10 elevado crescimento das hifas, e o envolvimento do biofilme pela matriz
11 extracelular. A estimulação da produção da matriz extracelular em *C. albicans*
12 durante o desenvolvimento do biofilme ainda é de causa desconhecida, o que se
13 conhece, no entanto, é que a composição da matriz inclui: carboidratos,
14 proteínas, fósforo, glicose e hexosaminas, mas a maior parte desse conteúdo
15 ainda não foi identificada (BAILLIE & DOUGLAS, 2000; BLANKENSHIP &
16 MITCHELL, 2006). Além de *C. albicans*, outras espécies de *Candida* também são
17 capazes de formar biofilme, sendo as espécies de interesse médico as mais
18 estudadas. Biofilmes formados pelas principais espécies isoladas de materiais
19 biológicos, como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, também
20 estão associados a altas taxas de morbidade e mortalidade quando comparados
21 com os de isolados que não formam biofilme (KUMAMOTO, 2002).

22 Em *C. parapsilosis*, a produção de biofilme tem sido considerada um
23 importante fator de virulência. *C. parapsilosis* é bem conhecida como causadora
24 de fungemia e candidíase invasiva associada à hiperalimentação parenteral,
25 dispositivos intravasculares e soluções oftálmicas contaminadas (PLOUFFE *et al.*,

1 1977; SOLOMON *et al.*, 1984; O'DAY *et al.*, 1987; WEMMS *et al.*, 1987; WEMMS,
2 1992). Vários fatores dão a *C. parapsilosis* uma vantagem seletiva, incluindo a
3 proliferação em altas concentrações de glicose e aderência a materiais protéticos
4 (CRITCHLEY & DOUGLAS, 1985; WEMMS *et al.*, 1987). Assim como *C.*
5 *parapsilosis*, as espécies relacionadas, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* também
6 são capazes de formar biofilme (LATTIF *et al.* 2010).

7 Em *C. tropicalis*, o biofilme é considerado um dos principais fatores que
8 contribuem para a disseminação e alta taxa de mortalidade relacionada a esta
9 espécie (KRCMERY, 1999; NEGRI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2012).

10 A base molecular da formação e do desenvolvimento do biofilme deste
11 grupo de fungos não está completamente compreendida, porém, já está bem
12 estabelecida que a interação da *C. albicans* com as células do hospedeiro ou
13 superfícies inertes resulta em alterações na expressão de diferentes genes.
14 Diferentes estudos têm descrito mudanças nos níveis de expressão gênica
15 durante o desenvolvimento do biofilme (MARCHAIS *et al.*, 2005, MURILLO *et al.*
16 2005). Os avanços na biologia molecular e genômica têm contribuído para melhor
17 entendimento das bases genéticas da produção de biofilme, particularmente em
18 *C. albicans*, que foi a primeira espécie do gênero a ter o genoma completamente
19 sequenciado (JONES *et al.*, 2004; ODDS *et al.*, 2004; BRAUN *et al.*, 2005).

20 Em *C. albicans*, espécie mais frequentemente estudada, sabe-se que a
21 base molecular da formação do biofilme é muito complexa, com envolvimento de
22 vários genes e reguladores, mas nos últimos anos esse assunto vem sendo
23 melhor compreendido (NOBILE *et al.*, 2006). O desenvolvimento do biofilme está
24 associado com a transição do crescimento celular leveduriforme para a forma de
25 pseudo-hifas, e já foi demonstrado que cepas nocauteadas para os genes

1 responsáveis por essa transição apresentam produção de biofilme extremamente
2 diminuída em relação à cepa selvagem (LEWIS et al., 2002). A regulação de
3 adesinas e de proteínas de parede celular também é considerada importante para
4 o processo de desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* (VERSTREPEN &
5 KLIS, 2006), sendo que as principais proteínas envolvidas no biofilme são as da
6 família ALS (*agglutinine-like sequence*). As als são glicoproteínas de adesão
7 codificadas pelos genes da família ALS, constituída de oito genes nomeados em
8 sequência de ALS1 a ALS7 e ALS9 (HOYER, 2001).

9 Os genes ALS foram inicialmente demonstrados estarem com a
10 expressão aumentada durante a formação do biofilme (CHANDRA et al., 2001;
11 GREEN et al., 2004; GARCIA-SANCHEZ et al., 2004; O'CONNOR et al., 2005).
12 Cada gene da família ALS apresenta uma estrutura similar composta por três
13 domínios: um domínio 5', na extremidade N, composto por 1299 a 1308pb, que
14 apresenta 55-90% de similaridade entre os diferentes genes da família; um
15 domínio central variável com *motifs* de 108pb que se repetem ao longo do
16 domínio; e um domínio 3', extremidade C, que é relativamente variável em
17 tamanho e sequência de nucleotídeos entre os genes da mesma família (HOYER,
18 2001). Os genes da família ALS estão localizados em três cromossomos distintos:
19 ALS1, ALS2, ALS4, ALS5 e ALS9 estão localizados no cromossomo 6, ALS6 e
20 ALS7 estão localizados no cromossomo 3, e ALS3 no cromossomo R (HOYER et
21 al., 1995, HOYER et al., 1998a; HOYER et al., 1998b; HOYER, 2001).

22 O tamanho de um mesmo gene ALS frequentemente varia dentro de
23 uma mesma espécie e entre alelos de uma mesma cepa devido a diferenças no
24 número de cópias dos *motifs* de 108pb, repetidos em tandem, presentes no
25 domínio central de cada gene (HOYER, 2001). É comum, por exemplo, uma

1 mesma cepa apresentar padrões diferentes para o gene ALS1 devido à
2 variabilidade do número de repetições dos *motifs* na região do domínio central em
3 cada alelo (HOYER et al., 1998a). Estudos moleculares sobre a expressão de
4 genes de ALS demonstraram que os mesmos são regulados e expressos
5 diferentemente em função de processos fisiológicos celulares, tais como o estágio
6 de crescimento e morfologia da célula, ou seja, predominantemente leveduriforme
7 ou na forma de hifas e pseudo-hifas (HOYER et al., 1995; HOYER et al.,
8 1998a,b).

9 Dentre os genes dessa família destacam-se o ALS1 e ALS3, principais
10 responsáveis pela produção de biofilme em *C. albicans* (NOBILE & MITCHELL,
11 2005, NOBILE et al, 2006; SOLL, 2008), sendo que o ALS3 também contribui
12 para a fusão das pseudo-hifas que formam um arcabouço, garantindo integridade
13 à estrutura do biofilme (SOLL, 2008). O papel do ALS3 no desenvolvimento do
14 biofilme de *C. albicans* já está bem descrito, estudos utilizando nocaute para esse
15 gene já comprovaram sua importância nesse processo (NOBILE et al, 2006;
16 NAILIS et al., 2009; LIU & FILLER, 2011). Em um estudo com a utilização de
17 nocautes ALS3 foi observado que o biofilme era frágil e apresentava alterações
18 na arquitetura das hifas (GARCIA-SANCHEZ et al., 2004).

19 Desde a descoberta do gene ALS1 em *C. albicans*, pesquisadores vêm
20 tentando entender sua relação com o restante da família ALS, pela caracterização
21 de suas proteínas e funções. Os genes ALS exibem diversos níveis de
22 variabilidade, incluindo espécie-específica e alelo-específica, diferenças de
23 tamanho para um mesmo gene, diferenças na regulação gênica espécie-
24 específica, ausência de um gene ALS particular em certos isolados, e regiões
25 codificadoras adicionais em outros (HOYER, 2001). Constatou-se que destes

1 genes, o ALS1, que codifica glicoproteínas de superfície celular, apresenta-se
2 com expressão aumentada em células do biofilme de *C. albicans* (GARCÍA-
3 SÁNCHEZ et al., 2004). O gene ALS3 também mostrou alta expressão, porém,
4 aparentemente associado à produção de hifas de *C. albicans* (HOYER et al.,
5 1998).

6 Nailis et al. (2006) compararam a expressão gênica de ALS1 e ALS3
7 entre as células do biofilme de *C. albicans*, formadas sobre superfície de silicone,
8 e as células planctônicas, e constataram um significativo aumento da expressão
9 de ALS1 nas células do biofilme, e uma diminuição da expressão de ALS3. Por
10 outro lado, Nobile et al. (2008) concluíram, após vários testes com mutantes
11 ALS1/ALS1 ALS3/ALS3, que ALS3 e ALS1 são essenciais para a formação do
12 biofilme *in-vivo* e a redução na expressão dessas proteínas acarreta na formação
13 de um biofilme de estrutura frágil.

14 O papel do produto do gene ALS1 na aderência das *C. albicans* às
15 células humanas ainda não está completamente compreendido. Segundo Fu et al.
16 (2002), o gene ALS1 codifica uma proteína de superfície celular responsável pela
17 aderência nas células endoteliais e epiteliais. O rompimento de ambas as cópias
18 deste gene em *C. albicans* é associado com uma redução para 35% na aderência
19 às células endoteliais, e o aumento da expressão de ALS1 aumenta a aderência
20 em 125%.

21 Outro gene que comprovou ser importante na formação do biofilme de
22 *C. albicans* é *HWP1* (*hyphal wall protein1*), codificador de uma proteína de
23 superfície (NOBILE et al., 2008). Mutantes ALS1/ALS3/*HWP1* desenvolveram um
24 biofilme com padrão bastante irregular em cateteres em modelo de infecção, *in-*
25 *vivo* e *in-vitro*. Provavelmente *HWP1*, ALS1 e ALS3 tenham funções

1 complementares, pois a expressão de *HWP1* em *S. cerevisiae* permite a
2 aderência a uma cepa selvagem de *C. albicans*, mas o mesmo não ocorre numa
3 cepa mutante ALS1/ALS3 (NOBILE et al., 2008). Alguns autores sugeriram que a
4 função das proteínas ALS3 e *HWP1* está ligada ao estágio de aderência, uma vez
5 que a expressão das ALS3 e *HWP1* ocorre somente durante o estágio de hifa
6 (STAAB et al., 1996; HOYER et al., 1998a). Essas proteínas podem ser as
7 mediadoras da aderência célula-hifa ou hifa-hifa (BLANKENSHIP & MITCHELL,
8 2006).

9 Nobile et al. (2008), sugeriram que a função de ALS1 e de ALS3 possam
10 ser complementares à função de *HWP1* das células vizinhas. Essas observações
11 sugerem uma analogia entre as adesinas de *C. albicans* com as *mating*-
12 aglutininas de *S. cerevisiae*, particularmente devido à similaridade estrutural de
13 ALS1 e ALS3 com as α -aglutininas de *S. cerevisiae*. Parte da estrutura da ALS,
14 incluindo a porção N-terminal, é similar à estrutura das α -*mating*-aglutininas
15 (*SAG1*) de *S. cerevisiae*. As proteínas ALS apresentam especificidades diferentes
16 da *Sag1*, porém afinidades similares ao análogo *a-mating*-aglutinina de *S.*
17 *cerevisiae*. Também foi observada similaridade entre *HWP1* e *a-mating*-aglutinina
18 (*Aga1* e *Aga2*) do *S. cerevisiae* (NOBILE et al., 2008; SOLL, 2008). As funções
19 complementares de *HWP1*, ALS1 e ALS3 na formação do biofilme são análogas
20 às funções das aglutininas sexuais durante a reação de *mating* (SOLL, 2008)..

21 Essa associação entre biofilme e *mating* já havia sido sugerida por
22 Daniels et al., (2006) os quais observaram que o fator *mating* pode simular a
23 formação do biofilme em um correspondente genético de *C. albicans*, e por Soll
24 (2008), o qual também especulou que este processo pode estar presente também
25 em outros organismos, como em *E. coli* na qual a conjugação (*mating*) ocorre

1 com frequência 1.000 vezes maior durante o biofilme do que em condições de
2 células dispersas, planctônicas (GHIGO, 2001).

3 Tais dados sugerem que a complementaridade pode ser uma relíquia
4 evolutiva que reflete a reorganização do produto gênico de um ancestral
5 “sexualmente mais ativo” que a *C. albicans* de hoje. Essa complementaridade das
6 adesinas sugere a importância da presença de uma única espécie no biofilme,
7 uma vez que o biofilme depende do contato intraespecífico (NOBILE et al., 2008).

8 Diferentemente do que acontece com *C. albicans*, *C. parapsilosis* não
9 forma hifa, embora seu biofilme pareça ser constituído de células alongadas
10 (LAFHEY & BUTLER, 2005). Análises genéticas de *C. parapsilosis* são
11 dificultadas pela ausência de dados moleculares adequados. Sabe-se que essa
12 espécie apresenta genoma diploide (FUNDYGA et al., 2004; LASKER et al.,
13 2006) e ausência de ciclo sexuado ou ainda não observado (LOGUE et al., 2005).
14 Com a publicação do genoma de *C. parapsilosis*, sabe-se que homólogos do
15 gene ALS de *C. albicans* estão presentes em *C. parapsilosis*, porém apenas cinco
16 genes da família estão presentes ALS1 ao ALS5 (BUTLER et al., 2009). Desde a
17 publicação do genoma, protocolos altamente eficientes para transformação
18 genética e clonagem em vetores vêm sendo desenvolvidos (NOSEK et al., 2002;
19 ZEMANOVA et al., 2004; GACSER et al., 2007b). No entanto, até o momento,
20 poucos estudos para geração de cepas nocauteadas de *C. parapsilosis* foram
21 descritos (DING & BUTLER, 2007; GÁCSEK et al. 2007; NGUYEN et al., 2011a,
22 b) e nenhum que envolvesse os genes ALS.

23 O concomitante crescimento da frequência das infecções por *Candida*
24 spp. e da resistência aos antifúngicos, demanda o conhecimento da
25 epidemiologia local para tomadas de medidas de práticas de controle e manejo

1 dessas infecções. Isso requer um aprimoramento constante na capacidade de se
2 fazer uma correta identificação e caracterização molecular das espécies
3 envolvidas. Da mesma forma, o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos
4 nos fatores de virulência desses micro-organismos, como a produção de biofilme,
5 poderá também contribuir para o desenvolvimento e aprimoramento de novos
6 alvos terapêuticos no combate a estes agentes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a população de espécies de leveduras do gênero *Candida* causadoras de infecções invasivas, obtidas de hemoculturas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, em relação às suas identidades taxonômicas, produção de biofilme, e perfis moleculares e de sensibilidades às drogas antifúngicas.

2.2. Objetivos específicos

- *Candida spp.* (todos os isolados)

-Realizar a identificação por método molecular de sequenciamento de regiões de rDNA e comparar com a metodologia clássica de identificação.

-Avaliar a produção de biofilme *in vitro*.

-Caracterizar o perfil de susceptibilidade às principais drogas antifúngicas.

- *C. albicans*

-Realizar a genotipagem em relação aos seus padrões de presença do intron do grupo I visando também detectar a possível ocorrência da espécie *C. dubliniensis*.

-Caracterizar os padrões de polimorfismos dos genes ALS1 e ALS3 e investigar a presença do gene HWP1, e suas associações com a produção de biofilme;

- *C. parapsilosis* (Complexo "*psilosis*")

- 1 -Diferenciar as três espécies do complexo *C. parapsilosis* pelo
- 2 método do gene SADH e comparar com a metodologia de identificação molecular
- 3 por sequenciamento de rDNA.
- 4 -Avaliar a expressão dos genes ALS-like e seu papel na produção
- 5 de biofilme.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Origem das amostras

As leveduras empregadas nesse estudo são parte da Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia Médica “Dr. Augusto Cezar Montelli” (LMM), do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP (IBB).

Foram avaliadas 196 amostras de leveduras isoladas de hemocultura de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (HC-FMB).

3.2. Seleção das amostras

Foram selecionadas amostras de leveduras isoladas no período de 2000 a 2006, com base na previa identificação pelo Laboratório de Microbiologia do setor de Análises Clínicas do HC-FMB. Para a seleção das amostras, consideraram-se dois fatores: i) identificação do micro-organismo, incluindo apenas leveduras pertencentes ao gênero *Candida sensu lato*; ii) número do registro hospitalar do paciente, para evitar que se trabalhasse com isolados repetidos. A identificação das amostras foi realizada por método automatizado: MicroScan WalkAway system (Dade MicroScan) para as amostras isoladas até 2003 e o Vitek system (bioMerieux Vitek) para isolados de 2004 a 2006.

3.3. Recuperação das amostras

Os micro-organismos pertencentes à Coleção de Culturas do LMM estão mantidos em criopreservação, em freezer -80°C. Para a recuperação das

1 amostras, os criotubos contendo as leveduras selecionadas foram descongelados
2 em temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as leveduras foram inoculadas
3 em tubos contendo meio de cultura líquido *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB, BD).
4 Após incubação a 37°C por até 72h, uma alçada de cada suspensão foi semeada
5 em placas contendo meio cromogênico (BBL CHROMagar *Candida*, BD) para
6 certificação da pureza da cultura e possível confirmação da prévia identificação.

7

8 **3.4. Identificação morfológica e fisiológica**

9 Amostras que apresentaram discordância e/ou dúvidas quanto à
10 identificação preliminar e amostras que não estavam identificadas em nível de
11 espécie, foram submetidas à identificação por meio de métodos clássicos de
12 identificação, baseados no perfil fisiológico e características morfológicas. O
13 principal método empregado foi o auxanograma, e em alguns casos também foi
14 necessária a realização de zimograma e micro-cultivo (Figura 1).

15 O teste do auxanograma consiste em avaliar a capacidade de
16 assimilação de carboidratos como fonte de energia. Foram utilizados os seguintes
17 carboidratos: glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose, rafinose, trealose,
18 melezitose, ramnose, dulcitol, inositol, celobiose, melibiose, manitol, xilose e
19 arabinose.

20 Realização do auxanograma: uma única colônia de levedura foi
21 semeada em meio *Sabouraud Dextrose agar* (SDA, Difco) acrescido de 1% de
22 *Extrato de Levedura* (Difco) e incubada overnight a 35°C. Todas as células
23 crescidas na superfície do meio foram suspensas em solução salina 0,85% e
24 inoculadas em meio fonte C, livre de carboidratos (0,5% sulfato de amônio, 0,1%
25 fosfato potássio, 0,5% sulfato magnésio, 2% ágar). Logo após, os carboidratos a

1 serem testados foram adicionados ao meio, e a placa (150x15mm) permaneceu
2 incubada a 35°C por até 72h (Figura 1B). Quando há assimilação do carboidrato
3 ocorre formação de um halo de crescimento em torno do mesmo.

4 O zimograma foi realizado nos casos em que a identificação não foi
5 possível através do CHROMagar e auxanograma. O zimograma consiste em
6 avaliar a capacidade de fermentação de alguns carboidratos como fonte de
7 energia. Os carboidratos empregados foram: glicose, galactose, lactose, sacarose
8 e maltose.

9 Realização do zimograma: uma única colônia, de cada amostra, foi
10 tocada e ressuspensa em solução salina 0,85% e inoculadas nos tubos
11 contendo meio de cultura líquido (0,3% extrato de carne, 0,5% cloreto de sódio,
12 1% peptona, 0,08% azul de bromotimol, 2% de cada açúcar), já contendo a
13 respectivas fontes de carboidratos. Os tubos ficaram incubados a 25°C por até 15
14 dias. Cada tubo também contém um tubo de *Durham*, invertido para captação do
15 gás formado pelo processo de fermentação do açúcar presente no meio. São
16 considerados positivos quando há presença de gás no interior do tubo de *Durham*
17 (Figura 1C).

18 A técnica de micro-cultivo também foi empregada nos casos em que a
19 identificação não foi possível através dos testes descritos acima.

20 Realização do micro-cultivo: uma única colônia, de cada amostra, foi
21 tocada e ressuspensa em solução salina 0,85% e uma alçada desta suspensão
22 foi utilizada para fazer três estrias em uma placa, ou lâmina, contendo meio *Corn*
23 *Meal Agar* (Difco) com 1% de Tween 80, uma lamínula foi colocada sobre as
24 estrias e a placa foi incubada a 25°C por até 96h. A micro-morfologia de cada
25 isolado foi avaliada em microscópio convencional (Figura 1D-G).

1 Os achados dos métodos morfofisiológicos acima descritos foram
 2 analisados por comparação com tabelas e figuras de publicações tradicionais da
 3 área, utilizadas pelos laboratórios de microbiologia, com algumas adaptações
 4 (CHAMPE et al., 2008; DE HOOG et al., 2000; KURTZMAN et al., 2011; SIDRIM
 5 & ROCHA, 2004; TRABULSI & ALTERTHUM, 2008; WINN et al., 2008).
 6

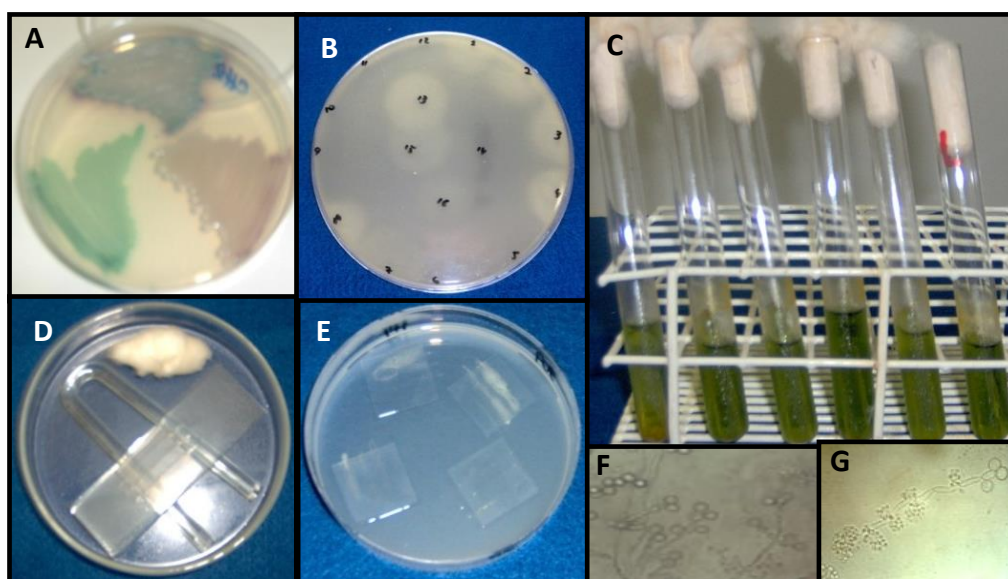


Figura 1. Etapas da identificação morfo-fisiológica de *Candida* spp..
A: CHROMagar *Candida* – identificação preliminar; **B:** Auxanograma
 – assimilação de fontes de carbono; **C:** Zimograma – fermentação de
 fontes de carbono; **D-G:** Microcultivo – micromorfologia.

7
 8
 9

10 3.5. Identificação Molecular

11 A identificação molecular das leveduras foi realizada pela técnica de
 12 sequenciamento de regiões de rDNA. Para tal foram realizados os procedimentos
 13 de extração de DNA, quantificação do DNA, reações de PCR para amplificação
 14 das regiões alvo, visualização em gel do material amplificado, reações de
 15 sequenciamento e análise das sequências obtidas.

1 Extração do DNA: após crescimento overnight em meio SDB, as células
2 foram concentradas por centrifugação a 13000g/5min, o sobrenadante foi
3 descartado e as células ressuspensas em 1ml de solução 1M sorbitol e 125mM
4 EDTA e 500mg *glass beads*. Os tubos foram agitados em vórtex por 2min para
5 ruptura das células. Os tubos foram então centrifugados a 13000g/5min, o
6 sobrenadante descartado e o material ressuspensado em 500µl de tampão de
7 extração (100mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 2% SDS e 2% β-mercaptoetanol) e 20µl
8 de proteinase K (Invitrogen). Após incubação overnight, foram adicionado 500µl
9 de solução 5M de acetato de potássio, os tubos foram homogeneizados por
10 inversão e incubados em gelo por 2h. Os tubos foram centrifugados a
11 13000g/10min/4°C e o sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para um
12 novo *ependorf*. Para “limpeza” do DNA, foram acrescentados 500µl de
13 isopropanol gelado, os *ependorfs* foram centrifugados a 13000g/10min/4°C, o
14 sobrenadante descartado e o *pellet* lavado novamente com 1ml de 70% de etanol
15 gelado. Os *ependorfs* foram então centrifugados, o etanol sobrenadante
16 descartado e o *pellet* deixado para secar a temperatura ambiente. Após
17 evaporação de todo etanol restante, o DNA foi ressuspensado em 100µl de água
18 MiliQ esterilizada. Esse protocolo foi adaptado de McCoulloch et al. (2000).

19 Quantificação do DNA extraído: todo DNA extraído foi submetido à
20 corrida eletroforética em gel de agarose a 1%. O marcador DNA Low Mass
21 (Invitrogen) foi empregado para estimativa da concentração de DNA presente em
22 cada amostra, por comparação da intensidade das bandas. Depois de
23 quantificado, o DNA de cada amostra foi diluído a uma concentração de 10ng/µl e
24 quantificado, por espectrofotometria, no equipamento NanoVue (GE).

1 Armazenamento do DNA: os *ependorfs* contendo DNA das amostras,
2 já na concentração ideal para uso nas reações de PCR, permaneceram mantidos
3 em freezer -20°C até o momento do uso.

4 Amplificação de regiões de rDNA: foi realizada amplificação por PCR da
5 região ITS1-5.8S-ITS2 de rDNA de todas as amostras. Os primers empregados
6 foram ITS4 e ITS5 (Quadro 1) que permitem amplificação de toda a região alvo
7 (Figura 2A). As concentrações de cada reagente empregado seguiram sempre a
8 indicação do fabricante, presente na bula da enzima Taq polimerase. Foram
9 empregadas as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial de 92-
10 98°C/4min, seguido por 35 ciclos de 92-98°C/2min, 55°C/2min, e 72°/2min e
11 72°C/10min; a temperatura de denaturação foi ajustada de acordo com as
12 especificações do fabricante da enzima Taq polimerase empregada na reação. O
13 material amplificado foi analisado por meio de corrida eletroforética em gel de
14 agarose a 0,8%. A concentração do produto amplificado de cada amostra foi
15 estimada pela comparação da intensidade das bandas em relação ao marcador
16 LowMass (Invitrogen).

17 Tratamento do material amplificado: os produtos amplificados foram
18 tratados com a enzima ExoSap-IT (USB) para remoção dos Dntps e primers não
19 incorporados durante a reação de PCR. Para tal, foram adicionados 2µl de
20 enzima ExoSap-IT para cada 5µl de material amplificado, a reação foi realizada
21 em termociclador com um ciclo de 37°C/15min para degradação do material não
22 desejado seguido de um ciclo de 80°C/15min para inativação da enzima. Após a
23 inativação, o material foi armazenado em freezer -20°C para posterior
24 sequenciamento.

25

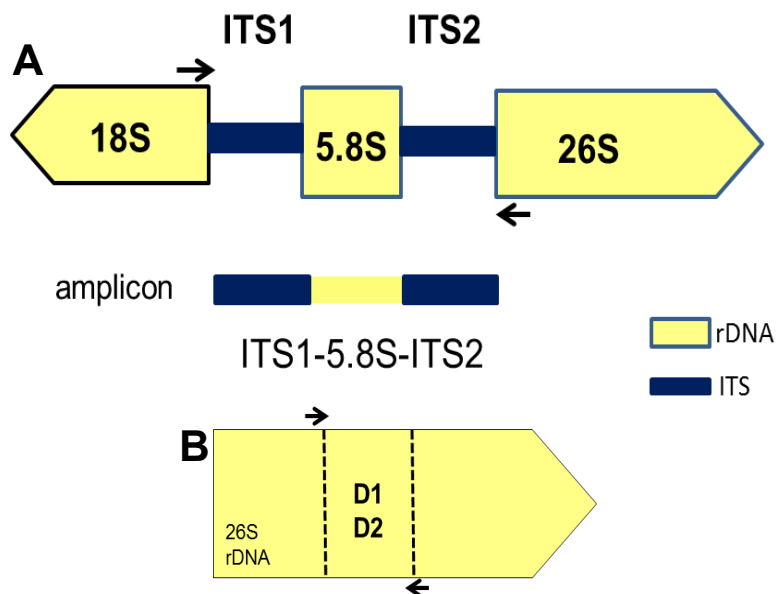


Figura 2. Amplificação de regiões de rDNA. Esquema de anelamento dos primers para identificação pela amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 (A) e região D1/D2 (B).

1

2

3

Reações de sequenciamento: as concentrações foram ajustadas para

4 aproximadamente 20ng/μl. Para as reações de sequenciamento foram

5 preparados dois tubos para cada amostra, um contendo 5 μl da amostra a 20ng/μl

6 e 2,5 μl de primer *forward* a 5μM e outro contendo 5 μl da amostra a 20ng/μl e 2,57 μl de primer *reverse* a 5 μM. Os tubos, devidamente identificados, foram então

8 enviados ao Centro de Estudos do Genoma Humano da USP ou, mais

9 recentemente, para o Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de

10 Microbiologia e Imunologia do IBB. Para cada *amplicon*, realizou-se o11 sequenciamento em ambos os sentidos, ou seja, fitas *forward* e *reverse*. Os

12 cromatogramas obtidos foram comparados visualmente e as sequências

13 alinhadas com o auxílio dos softwares CHROMAS, MEGA 4.0 e BioEdit, de forma

14 a obter a sequência consenso entre as fitas *forward* e *reverse* para cada isolado.

- 1 A sequência consenso de cada cepa foi então comparada pela ferramenta *Blastn*
- 2 do *NCBI*, *Broad Institute* ou *Sanger Institute*. Para a identificação, consideraram-
- 3 se os alinhamentos que apresentaram maior identidade/similaridade com as
- 4 sequências depositadas, preferencialmente as provenientes de trabalhos já
- 5 publicados ou cepas de referência, ATCC ou CBS (Figura 3).

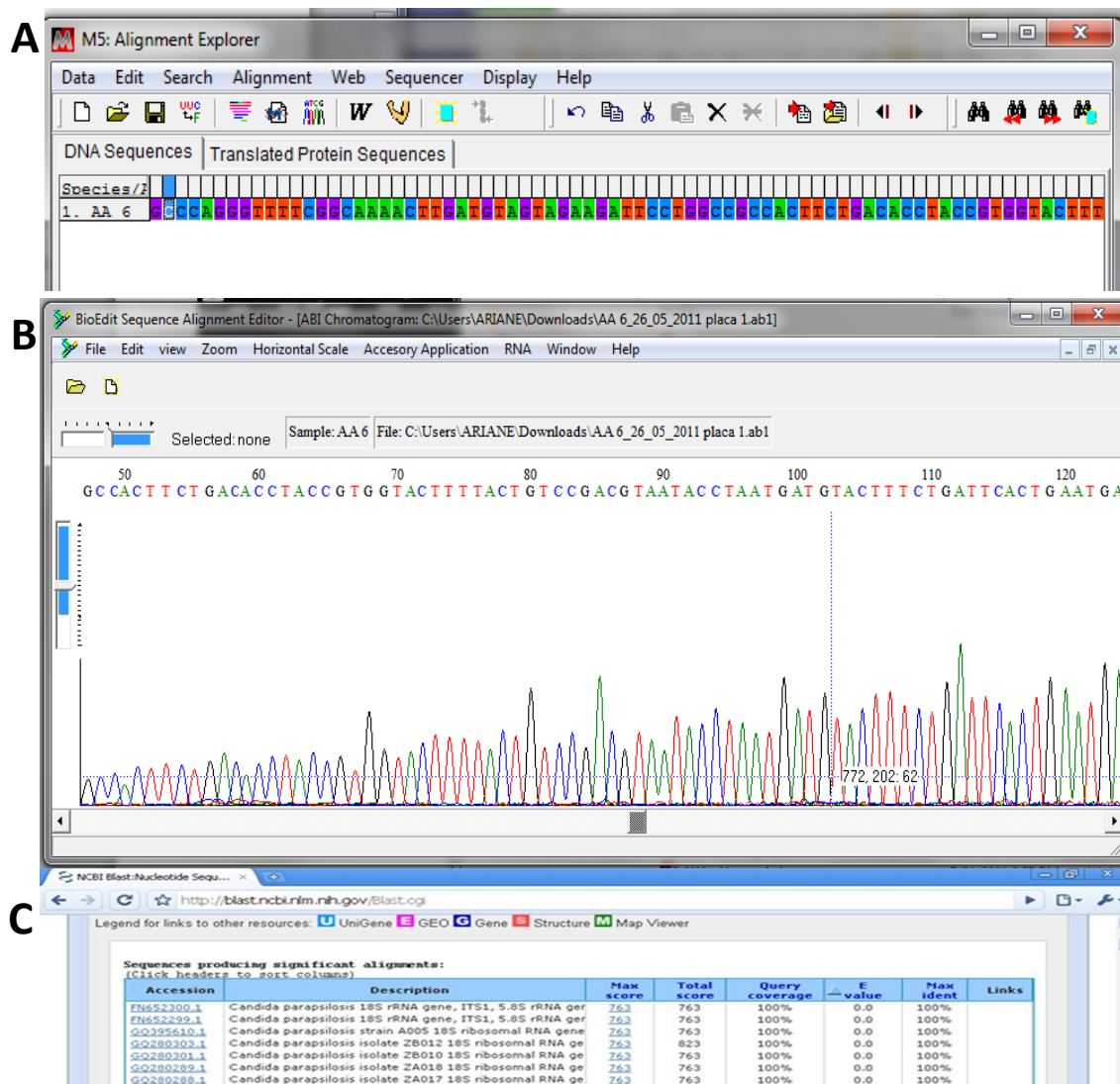


Figura 3. Softwares utilizados para análise da sequência. (A) Mega 5.05: análise das sequências sense e anti-sense e obtenção das sequências consenso; (B) BioEdit: análise dos cromatogramas das sequências obtidas; Blastn: ferramenta do NCBI para comparação das sequências com outras depositadas no banco de dados - genbank.

6

7

1 Amplificação da região D1D2 de rDNA: nos casos em que a sequência
2 obtida apresentou incoerência no alinhamento ou porcentagem de similaridade
3 baixa em relação às sequências depositadas nos bancos de dados, foi realizada a
4 amplificação da região D1/D2, também de rDNA (Figura 2B), bem como repetição
5 da amplificação da região ITS11-5.8S-ITS2. Foram utilizados os primers D1D2, as
6 condições de ciclagem foram exatamente as mesmas utilizadas para amplificação
7 com *primers* ITS4 e ITS5. Todos os procedimentos empregados, após a
8 amplificação por PCR, são os mesmos descritos acima.

9

10 **3.6. Caracterização da produção de biofilme**

11 A produção de biofilme foi avaliada utilizando como substrato discos de
12 silicone, produzidos com o mesmo material que a maioria dos cateteres
13 hospitalares, seguindo metodologia proposta por Chandra et al. (2008). Para
14 caracterizar a produção de biofilme das 196 amostras de *Candida spp.*, avaliadas
15 no presente estudo foram realizados procedimentos de quantificação,
16 visualização por microscopia óptica de fluorescência e por microscopia eletrônica
17 de varredura do biofilme formado sobre a superfície do substrato de silicone.

18 Condições de crescimento: uma única colônia de cada amostra foi
19 semeada em placas contendo SDA (Difco) e incubados por 24h/35°C, a seguir as
20 leveduras foram inoculadas em meio líquido Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco)
21 contendo glicose (50mM) e incubadas sob agitação, por 24h/35°C. Os tubos
22 foram centrifugados a 3000rpm/5min/4°C, o sobrenadante descartado e tampão
23 fosfato (PBS) foi utilizado para lavagem das células por três vezes. A
24 concentração foi ajustada para 10^{-7} células/ml em meio YNBD (YNB + 50mM

1 glicose), para então serem utilizadas como inóculo inicial para a produção do
2 biofilme no substrato de silicone (Figura 4).

3 Formação do biofilme: os discos de silicone (Kinner®), previamente
4 lavados, esterilizados e tratados com soro fetal bovino (FBS), foram depositados
5 nos poços de placa de cultura de tecido (TPP) com 12 poços, sendo um único
6 disco por poço da placa. Em cada poço, 4ml de inóculo contendo células na
7 concentração de 10^{-7} cel/ml foram inoculadas e as placas foram então incubadas,
8 sob agitação, por 90min/37°C para adesão das células nos discos.
9 Posteriormente o disco de cada poço foi transferido para uma nova placa,
10 contendo 4ml de YNBD fresco em cada poço e as placas ficaram incubadas, sob
11 suave agitação, por 48h/37°C. Os discos foram cuidadosamente transferidos para
12 poços de uma nova placa contendo apenas 4ml de tampão PBS por poço (Figura
13 4A-B).

14 Quantificação do biofilme: o biofilme produzido foi quantificado, pela
15 reação de redução do tetrazólio, adicionando 50µl de uma solução de XTT (2,3-
16 Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt)
17 (Sigma-Aldrich) e 4µl de solução 1mM de menadione (Sigma-Aldrich) em cada
18 poço da placa que foi coberta por papel alumínio e incubada por 5h/37°C, sob
19 agitação. O XTT e menadione, na presença de metabolismo reagem gerando a
20 formazina, deixando o meio com uma coloração alaranjada. Para a quantificação
21 do biofilme produzido, as células aderidas no disco foram descoladas com auxílio
22 de uma ponteira e foram transferidas, juntamente com o líquido de cada poço
23 para tubos de centrifuga. Os tubos foram centrifugados a 3000rpm/5min/4°C e a
24 coloração alaranjada de cada amostra foi quantificada por meio de leitura

1 espectrofotométrica em filtro de 450nm, como descrito por Chandra *et al.* (2008).

2 Os experimentos foram realizados em quadruplicata em todas as amostras.

3 Microscopia de fluorescência: em 32 amostras, selecionadas
4 randomicamente, foi realizada visualização em microscopia de fluorescência,
5 utilizando o Fluorescente Brightener 28 (“calcoflúor”, Sigma-Aldrich). O disco foi
6 colocado no centro de uma lamina, uma gota de solução 0.05 % de Calcoflúor foi
7 aplicada em cada disco e uma lamínula foi colocada sobre o disco (Figura 4C-D).
8 As lâminas foram incubadas por 5min/TA no escuro e analisadas em
9 Fotomicroscópio (System Microscope BX60, Olympus) com sistema de captura de
10 imagem digital (Microscope Digital Camera DP72, Olympus) e processamento de
11 imagem pelo programa (DP2-TWAIN Software).

12 Microscopia eletrônica de varredura: 21 amostras, randomicamente
13 selecionadas, foram submetidas à visualização por microscopia eletrônica de
14 varredura. Esta fase foi desenvolvida no Centro de Microscopia Eletrônica (CME)
15 do IBB. Resumidamente, as células aderidas nos discos de silicone foram fixadas
16 em solução de glutaraldeído e enviadas ao CME. Os discos foram lavados com
17 PBS, pH7,2 e pós-fixadas com tetróxido de ósmio e 0,1M cacodilato (contendo
18 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5mM cloreto de cálcio. As amostras foram
19 desidratadas em etanol, secas no ponto crítico com CO₂, e cobertas com ouro. As
20 imagens foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura Quanta 200
21 (Fei Company).

22

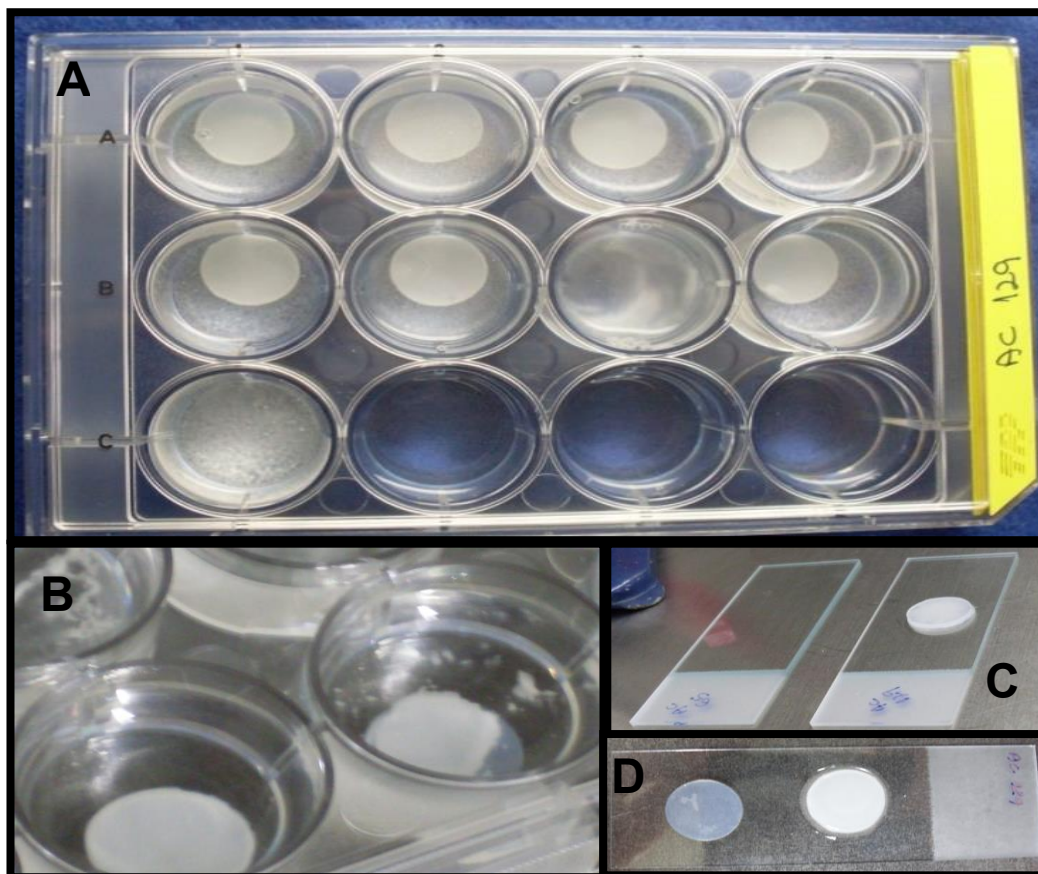


Figura 4. Metodologia para avaliação da produção de biofilme. (A) Placas contendo os discos de silicone com biofilme aderido, os 3 últimos poços representam o controle negativo. (B) Poços da placa após lavagem e remoção das células não aderentes, nota-se a formação de uma película (leveduras em biofilme) sobre o disco. (C) Preparo das laminas para microscopia de fluorescência. (D) Exemplos de disco limpo (controle negativo) e com as células aderidas (biofilme).

1

2

3

3.7. Testes de susceptibilidade a drogas antifúngicas

4

5

6

7

A determinação do perfil de sensibilidade das amostras de leveduras aos antifúngicos foi realizada pelo método da microdiluição, de acordo com o método publicado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* – Documento M27-A3 (CLSI, 2008).

8

Drogas antifúngicas: foram utilizados os seguintes agentes antifúngicos:

9

Fluconazol (Pfizer Inc. USA), Voriconazol (Pfizer), Anidulafungina (Pfizer) e

1 Anfotericina B (Sigma Chemical, St. Louis-USA). Cada antifúngico foi avaliado em
2 10 concentrações diferentes. Inicialmente, foram preparadas soluções-mãe,
3 conforme recomendação de M27-A3 (CLSI, 2008).

4 Diluição das drogas: a solução mãe de fluconazol na concentração de
5 128µg/ml foi preparada em água destilada, as de Voriconazol e Anfotericina B a
6 32µg/ml e de Anidulafungina a 16µg/ml em dimetilsulfóxido (DMSO). Foram
7 realizadas nove diluições seriadas 1:1 das soluções mãe em tubos contendo meio
8 de cultura líquido sintético RPMI 1640 (Sigma Chemical, St. Louis-USA) com 2%
9 de glicose, tamponado com MOPS (Usb), com pH final 7,0 e esterilizado por
10 filtração.

11 Preparo das placas: cada concentração do antifúngico foi distribuída em
12 placa de microtitulação com 96 orifícios e fundo chato (TPP) em alíquotas de
13 100µl/poço, até a coluna 10, cada coluna correspondeu a uma concentração. A
14 coluna 1 correspondeu à maior concentração e à 10 a menor concentração da
15 droga por ml. Todos os orifícios, das linhas A a H, foram preenchidos com
16 soluções dos antifúngicos, exceto as colunas 11 e 12, reservadas para os
17 controles de crescimento e de esterilidade, respectivamente. Cada poço
18 apresentou soluções de droga duas vezes mais concentradas devido à posterior
19 diluição com a adição do inóculo (Figura 5). Todas as placas contendo as
20 diferentes concentrações de antifúngicos foram tampadas, cobertas com filme
21 plástico aderente e congeladas a -80°C até o momento do uso, conforme
22 recomendado no M27-A3 (CLSI, 2008).

23 Condições de crescimento: as leveduras foram semeadas em meio
24 Sabouraud dextrose ágar a 35°/24h e, cinco colônias de cada amostra foram
25 colocadas em 5ml de salina estéril. A suspensão resultante foi homogeneizada

1 em vórtex, e a densidade celular ajustada para a escala de 0,5 McFarland,
2 correspondendo de $1,0$ a $5,0 \times 10^6$ células/ml.

3 Preparo do inóculo: foi preparado fazendo-se a diluição 1:20 e depois
4 1:50 em meio de cultura líquido sintético RPMI, tamponado e esterilizado, para se
5 obter o inóculo duas vezes mais concentrado usado no teste. O inóculo (2X) foi
6 diluído a 1:1 quando os poços foram inoculados, obtendo então a concentração
7 final de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ células/ml (Figura 6).

8 Deteccção dos MICs: as placas foram descongeladas a temperatura
9 ambiente e após o descongelamento, 100µl da suspensão de leveduras foram
10 inoculados em cada orifício da placa com as diferentes concentrações de
11 antifúngico, respeitando sempre os orifícios disponibilizados para controle de
12 crescimento e controle de esterilidade. As placas foram incubadas por 48h a
13 35°C.

14 Leitura dos resultados: o crescimento em cada poço foi comparado ao
15 controle do crescimento da respectiva amostra com auxílio de um espelho para
16 facilitar a visualização do fundo da placa. O MIC, valor da concentração inibitória
17 mínima, para a Anfotericina B foi definido como a menor concentração onde se
18 observa ausência de crescimento, e o MIC dos azóis e equinocandina foi definido
19 como a menor concentração em que se observa uma diminuição proeminente da
20 turbidez correspondente à aproximadamente 50% da inibição do crescimento
21 (Figura 7).

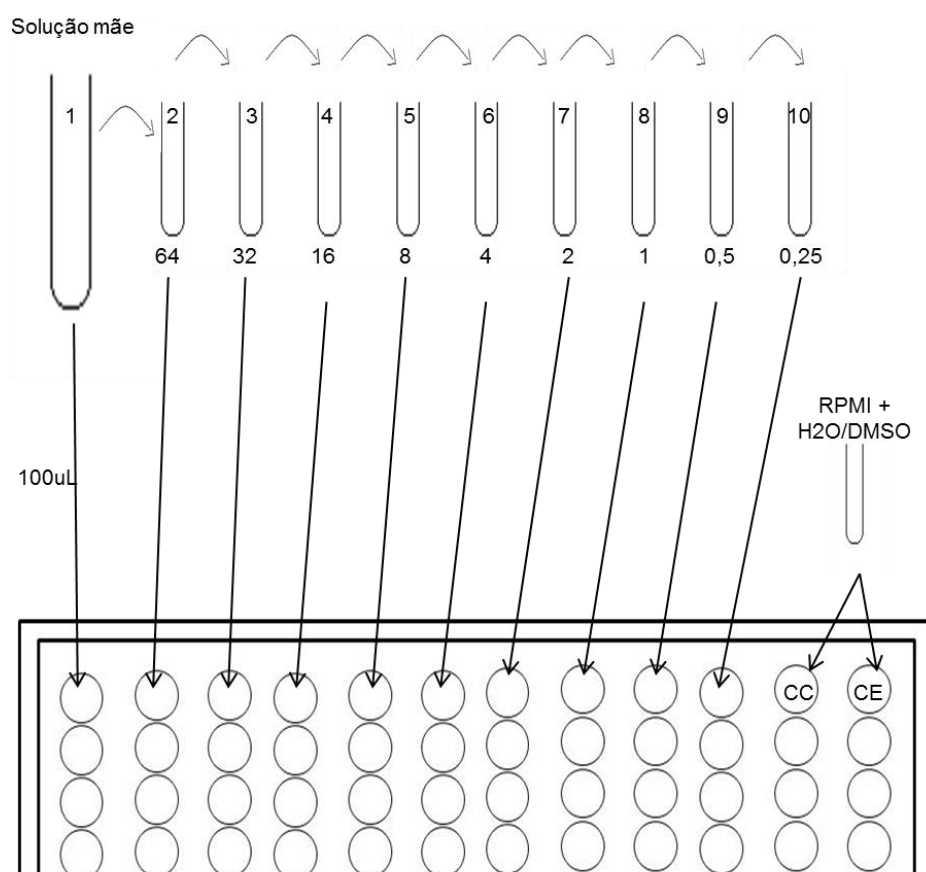
22 Controle de crescimento: foi realizado na coluna 11 que foi preenchida
23 com 100µl de meio RPMI e 100µl de inóculo de cada amostra.

24 Controle de esterilidade: foi feito na coluna 12 de cada placa, todos os
25 orifícios dessa coluna receberam apenas o meio RPMI, 200µl em cada orifício,

1 sem adição de antifúngico e sem inóculo. Esse controle serviu para testar se
2 ocorreu contaminação do meio durante o preparo das placas.

3 Controle de qualidade: cepas controle *American Type Culture Collection*
4 (ATCC), foram utilizadas para acompanhar a qualidade de reprodução da técnica.
5 Foram usadas as cepas padrões de referência *Candida parapsilosis* ATCC 22019
6 e *Candida krusei* ATCC 6258.

7 Interpretação dos resultados: os pontos de corte para a interpretação
8 dos valores de MIC para cada uma das quatro drogas fungistáticas foi de acordo
9 com os valores preconizados pelo CLSI no M27-A3 e para anfotericina B foi
10 considerado sensível MIC < 2 µg/ml (NGUYEN et al., 1998).



11

Figura 5. Esquema de preparo das placas de microdiluição. Cada droga foi testada em 10 concentrações, a partir de diluições seriadas. Os poços CC e CE representam os controles de crescimento e esterilidade, respectivamente.

12

1

2

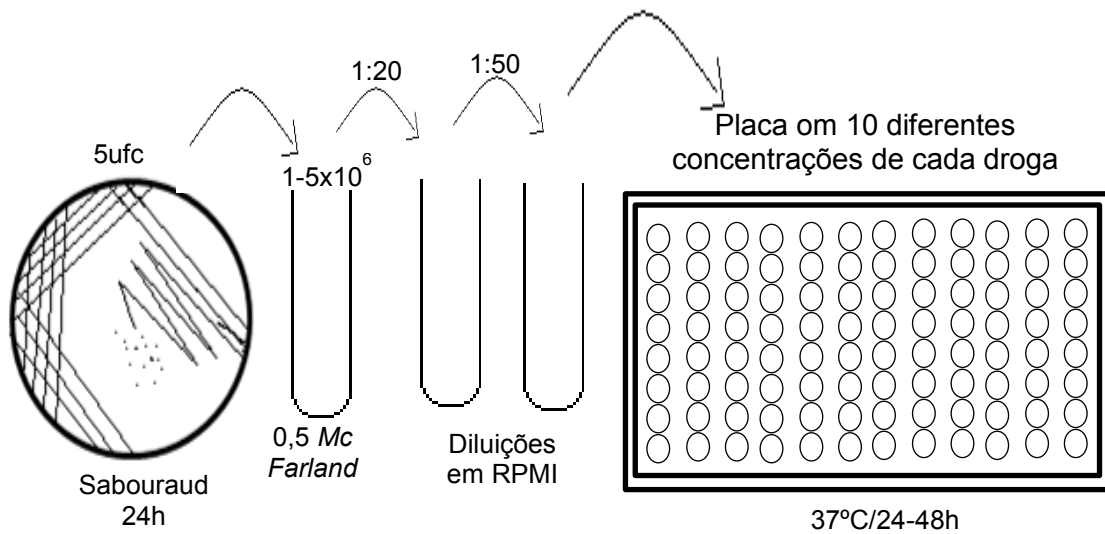


Figura 6. Esquema de preparo do inóculo para microdiluição. Cada amostra foi testada em 10 concentrações diferentes de cada droga.

3

4

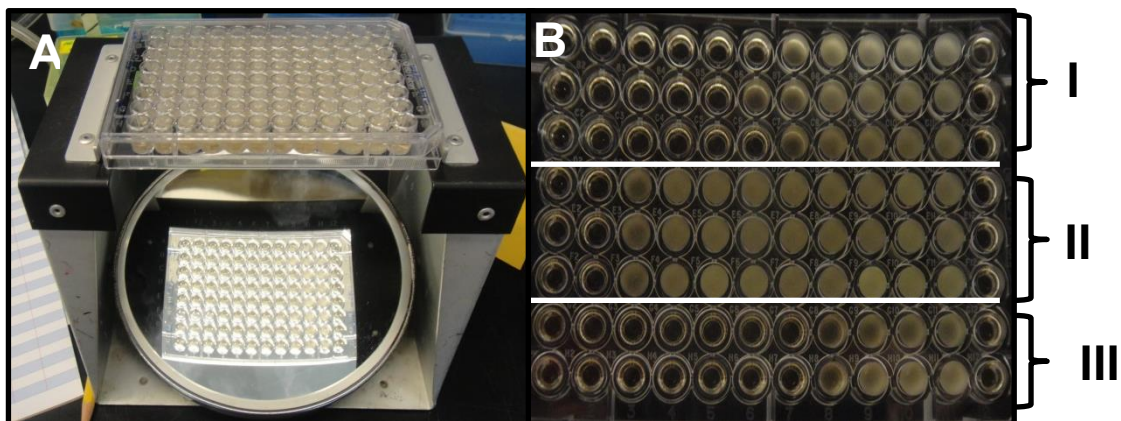


Figura 7. Esquema de leitura das placas de microdiluição. A: Leitura das placas com auxílio de um espelho. B: Visualização da inibição do crescimento de acordo com a concentração da droga (concentração diminui da esquerda para a direita); I. Cepa ATCC 22019 *C. parapsislosis*; II. Cepa ATCC6258 *C. krusei*; III. Cepa isolada de paciente.

5

6

7

3.8. Introns do grupo I: genotipagem de *C. albicans*

Para a caracterização molecular dos diferentes genótipos de *C. albicans*, foi realizada a amplificação, por reação de PCR, da região de inserção do intron do grupo I, em amostras identificadas como *C. albicans* (Figura 8).

Reações de PCR: a amplificação do sítio de inserção do intron do grupo I na região 26S de rDNA foi realizada utilizando os primers CA-INT-L e CA-INT-R (Quadro 1), descritos por McCullough *et al.* (1999), e as seguintes condições de ciclagem: 92-98°C/4min, seguido por 35 ciclos de 92-98°C/2min, 55°C/2min, e 72°C/2min e 72°C/10min, de acordo com o fabricante da enzima Taq polimerase. O tamanho do *amplicon* de cada amostra foi analisado por meio de corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% por 2 a 3h a 90v, seguido de coloração com Brometo de Etídio (Sigma) e visualização em transiluminador. O tamanho da banda de cada amostra foi determinado para classificação dos diferentes genótipos de *C. albicans*, sendo que genótipo apresenta aproximadamente 450pb, o genótipo B apresenta aproximadamente 840pb, o genótipo C apresenta duas bandas com aproximadamente 450pb e 840pb, e o genótipo E apresenta aproximadamente 1400pb.

18

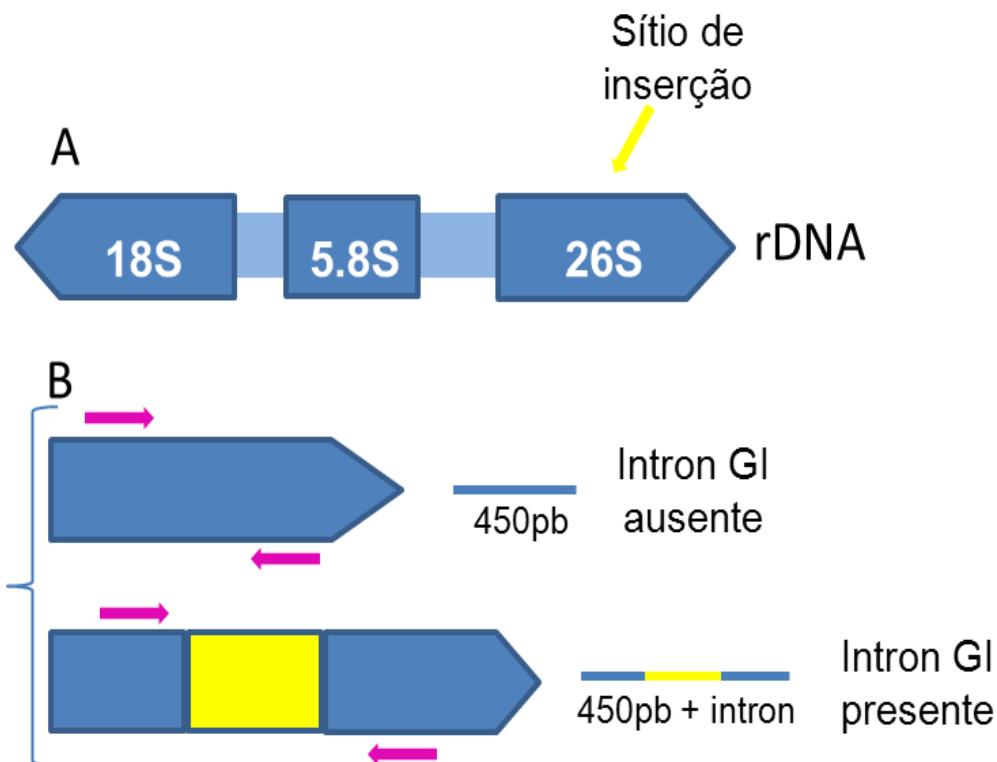


Figura 8. Região de inserção e esquema de anelamento dos primers para amplificação dos introns do grupo I de *C. albicans*. (A) Sítio de inserção do intron na porção 26S de rDNA. (B) Esquema de anelamento dos primers (setas rosas) e tamanho dos amplicons com (traço azul) e sem (traço azul e amarelo) o intron inserido.

1

2

3.9. Introns do grupo I: detecção de *C. dubliniensis*

4

A avaliação de introns do grupo I também foi realizada com o objetivo de

5

identificar isolados de *C. dubliniensis* possivelmente identificados como *C.*

6

albicans devido à similaridade fenotípica e genotípica. Assim como descrito

7

anteriormente, a reação de PCR para amplificação da região de inserção dos

8

introns do grupo I foi realizada em 77 amostras previamente identificadas como *C.*

9

albicans. Os padrões de polimorfismos de tamanho, devido à presença de introns

10

do grupo I também puderam ser utilizados para detecção da espécie *C.*

11

dubliniensis, por apresentar *amplicon* com aproximadamente 1080pb.

12

1 **3.10. Genética do biofilme: genes ALS1, ALS3 e HWP1 de *C.***
2 ***albicans***

3 Para avaliar os padrões de polimorfismos dos genes ALS1 e ALS3 de *C.*
4 *albicans* foi realizada a estimativa do número de *motifs* de cada alelo de cada
5 amostra identificada como *C. albicans*, pois podem ser variáveis, em
6 heterozigose, devido à condição diplóide desta espécie. Por tratar-se de um gene
7 bastante polimórfico, o anelamento dos primers nem sempre ocorre, ou ocorre
8 inespecificamente, o que exigiu maior cuidado para a amplificação deste gene, de
9 forma a detectar seus diversos variantes. A estrutura dessa família de genes
10 (ALS) é composta por três domínios: o domínio 5', o domínio central e o domínio
11 3'. As regiões dos domínios 5' e 3' são consideradas mais conservadas entre
12 indivíduos da mesma espécie, embora apresentem polimorfismos intraespecíficos
13 de tamanho e sequência, e a região do domínio central, é bastante variável, e é
14 formada por *motifs* de ~108pb que se repetem ao longo do domínio (Figura 9). O
15 principal objetivo da avaliação de polimorfismos desses genes (ALS1 e ALS3) foi
16 tentar correlacionar o perfil polimórfico de cada amostra com a capacidade de
17 produção de biofilme, *in-vitro*. Na tentativa de iniciar estudos mais aprofundados
18 sobre a genética de formação do biofilme por este micro-organismo, o gene
19 HWP1 também foi amplificado por PCR para detectar presença desse gene nas
20 amostras avaliadas no presente estudo, bem como correlacionar os dados
21 obtidos com a produção de biofilme por estas amostras.

22 Para avaliação dos genes, possivelmente envolvidos na produção de
23 biofilme de *C. albicans*, foram realizadas reações de PCR para amplificação dos
24 genes ALS1, ALS3 e HWP1 de *C. albicans* e avaliação do perfil de polimorfismos

1 dos genes ALS1 e ALS3 para análise de correlação com a produção de biofilme
2 *in-vitro*.

3 Amplificação de ALS1 de *C. albicans*: as reações de PCR foram
4 realizadas com os primers CaALS1f e CaALS1r (Quadro 1), nas seguintes
5 condições de ciclagem: cinco minutos a 94 °C seguido de 35 ciclos de 94 °C por
6 30 segundos, 57 °C por 30 s e 72 °C por três minutos e 10 minutos de extensão
7 final a 72 °C. O tamanho do *amplicon* de cada amostra foi analisado por meio de
8 corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% por 2 a 3h a 90v, seguido de
9 coloração com Brometo de Etídio (Sigma) e visualização em transiluminador. O
10 tamanho dos *amplicons* de cada alelo foi estimado utilizando o software
11 AlphaEaseR FC.

12 Amplificação de ALS3 de *C. albicans*: as reações de PCR foram
13 realizadas com os primers ALS3genoR/ALS3genoF, e
14 ALS3genoR2/ALS3genoF2, ambos descritos por Oh et al, 2005 (Quadro 1). As
15 melhores condições de ciclagem foram: cinco minutos a 94 °C seguido de 35
16 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 30 s e 72 °C por três minutos e 10
17 minutos de extensão final a 72 °C; e para os primers ALS3genoR2/ALS3genoF2
18 foram similares com exceção da temperatura de anelamento, 65°C. O tamanho
19 do *amplicon* de cada amostra foi analisado por meio de corrida eletroforética em
20 gel de agarose 0,8% por 2 a 3h a 90v, seguido de coloração com Brometo de
21 Etídio (Sigma) e visualização em transiluminador. O tamanho dos amplicons de
22 cada alelo foi estimado utilizando o software AlphaEaseR FC.

23

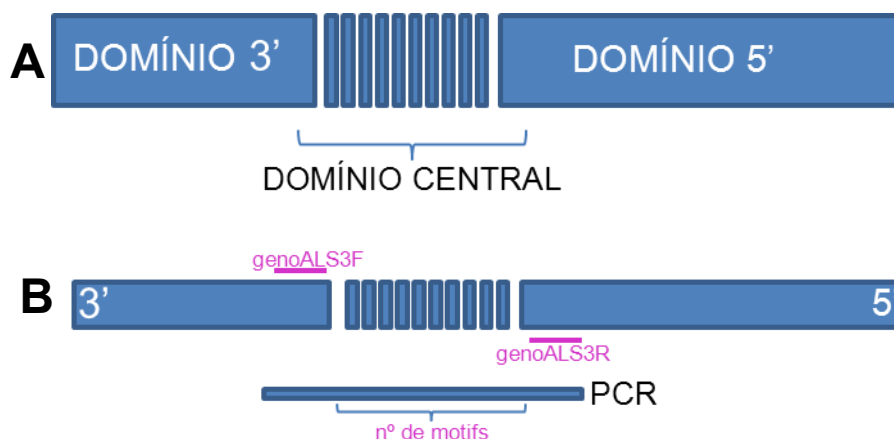


Figura 9. Genes ALS de *C. albicans*. A: Esquema da estrutura dos gene ALS1 e ALS3 de *C. albicans*; B: Esquema de anelamento dos primers para amplificação da reação dos domínios centrais (motifs) do gene ALS3 de *C. albicans*.

1

2

3 Perfil polimórfico de ALS1 e ALS3 e produção de biofilme: visando4 correlacionar o número de *motifs* com a maior e/ou menor produção de biofilme,

5 procedeu-se a obtenção de dois grupos de isolados, um com ausência e/ou

6 pouca produção de biofilme e outro contendo os isolados com alta produção de

7 biofilme. Para obtenção do valor do *cut-off*, empregou-se média mais o desvio

8 padrão dos valores de DO (triplicata) de um isolado (isolado AC-31) do grupo dos

9 negativos pelas análises microscópicas, porém com maiores valores de DOs em

10 relação ao demais possivelmente negativos pelas análises microscópicas.

11 Amplificação de HWP1: foram realizadas reações de PCR para

12 amplificação do gene HWP1, utilizando os primers CaHWP1f e CaHWP1r

13 (Quadro 1), nas seguintes condições de ciclagem: 30 segundos a 92°C, seguido

14 de 39 ciclos de 92°C por 30 segundos, 55°C por 30 s e 68°C por dois minutos e

15 10 minutos de extensão final a 68°C (FideliTaq, usb). Por tratar-se de um gene

16 pouco estudado, os primers foram desenhados visando amplificação de todo o

1 gene (1905pb) apenas com o objetivo de detectar presença ou ausência do
2 mesmo nas amostras isoladas no HC-FMB/UNESP e originar dados para
3 pesquisas futuras.

4

5 **3.11. Detecção de espécies do complexo “*psilosis*”**

6 As amostras de *C. parapsilosis* pela identificação molecular foram
7 submetidas à reação de PCR para amplificação do gene *SADH* (secondary
8 alcohol desidrogenase) presente nas três espécies do complexo, porém
9 apresentam polimorfismos de sequência que podem ser evidenciados após
10 digestão por enzimas de restrição. Para diferenciação das espécies, foi então
11 realizado reação de PCR para amplificação do gene *SADH* e digestão do material
12 amplificado.

13 Amplificação do gene *SADH*: a amplificação do gene *SADH* foi realizada
14 pela reação de PCR com os primers *SADH.f* e *SADH.r* (Quadro 1), descritos por
15 Tavanti et al (2005), nas seguintes condições de ciclagem: 94°C por 7min, 30
16 ciclos de 94°C por 1min, 50°C por 2min, e 72°C por 1,5min e extensão final a
17 74°C por 10min. Após amplificação, a reação foi visualizada por meio de corrida
18 eletroforética em gel de agarose 0,8% por 2h a 90v, seguido de coloração com
19 Blue Green (LGC) e visualização em transiluminador, apresentando uma única
20 banda de 716pb que corresponde ao gene alvo.

21 Reação de digestão: para diferenciação entre as espécies do complexo,
22 foi realizada reação de digestão pela enzima de restrição *BanI* (New England
23 Biolabs), complementar aos sítios polimórficos entre as espécies. Na reação de
24 digestão foram utilizados 20µl de produto de PCR de cada amostra, 2µl de 10X
25 buffer 4, 2U de enzima *BanI* e água MiliQ estéril para completar 30µl. As reações

1 de digestão permaneceram incubadas a 35°C/4h e a enzima foi inativada a
 2 65°C/20min. O material digerido foi mantido a 4°C até o momento da análise. O
 3 material foi analisado após corrida em gel de agarose 0,8%, para separação dos
 4 fragmentos, por 2,5 a 3h a 80v, seguido de coloração com Brometo de Etídio
 5 (Sigma), e visualização em transiluminador, com sistema de captura de imagens
 6 e software (SynGene) para determinação do tamanho dos fragmentos
 7 amplificados. As espécies do complexo “*psilosis*” apresentam diferentes perfis de
 8 polimorfismo, o que nos permitiu classificar as diferentes espécies de acordo com
 9 o tamanho da banda visualizada no gel (Figura 10).

10

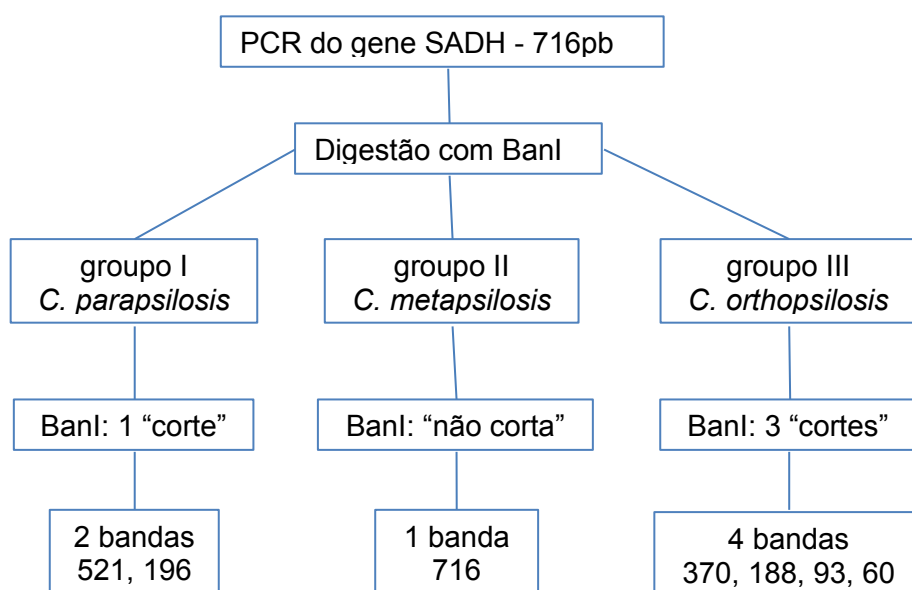


Figura 10. Identificação de espécies do complexo *Candida parapsilosis*. Amplificação e digestão do gene SADH pela enzima de restrição BanI.

11

12

13 **3.12. Genética do biofilme: genes ALS de *C. parapsilosis***

14 Essa fase do projeto foi desenvolvida em parceria com laboratório do
 15 Prof. Dr. Joshua D. Nosanchuck, Albert Einstein College of Medicine – Yeshiva
 16 University, New York, NY-USA, durante o estágio de doutorado no exterior

1 (sanduíche). O principal objetivo do estágio foi realizar estudos envolvendo os
2 genes ALS-like de *C. parapsilosis*, detectar o possível envolvimento de algum
3 desses genes na produção de biofilme por essa espécie e possível construção de
4 uma cepa nocaute. Para caracterização dos genes ALS foram realizadas reações
5 de PCR em tempo real, para avaliar a expressão dos genes ALS nas condições
6 de biofilme, planctônica e cultura de macrófagos. A cepa de *C. parapsilosis*
7 inicialmente empregada para caracterização dos genes ALS foi a GA1, isolada de
8 hemocultura proveniente de um hospital de Hamburgo, na Alemanha. Esse
9 isolado vem sendo utilizado em todos os estudos e publicações envolvendo *C.*
10 *parapsilosis* do laboratório do Prof. Dr. Joshua D. Nosanchuk.

11 Expressão dos genes ALS durante biofilme: a produção de biofilme para
12 análise de expressão gênica foi realizada de maneira simplificada, fazendo-se uso
13 de placa de cultura de tecido de 24 poços e meio mínimo (20 mg/ml thiamine, 30
14 mmol/L glucose, 26 mmol/L glycine, 20 mmol/L magnesium sulfate heptahydrate,
15 58,8 mmol/L potassium dihydrogen phosphate, pH 5.5), seguindo protocolo do
16 laboratório do Prof. Dr. Nosanchuk. Uma amostra de *C. parapsilosis* (GA1) foi
17 cultivada em meio líquido YPD e incubada overnight, sob agitação, a 30°C. As
18 células foram então concentradas por centrifugação e lavadas duas vezes com
19 PBS. A concentração de leveduras foi ajustada para 10^5 células/ml com utilização
20 de hematocítmetro (câmara de Neubauer). Em cada poço da placa foram
21 inoculados 4ml da cultura de levedura (10^5 cel/ml) e as placas foram incubadas a
22 37°C, sem agitação. Após 24 e 48h os poços foram lavados com PBS e as
23 células aderidas (biofilme) foram coletadas para extração de RNA. Como controle
24 negativo, foi realizada cultura do mesmo inóculo, também em meio mínimo
25 (50ml), em frasco erlenmeyer, incubado a 37°C sob agitação. Uma alíquota foi

1 retirada com 24h e outra com 48h de incubação para extração de RNA. Todo
2 RNA extraído foi quantificado e convertido para cDNA (DNA complementar),
3 conforme descrito abaixo, para reações de PCR em tempo real e análise de
4 expressão genica.

5 Expressão dos genes ALS durante fagocitose: para os ensaios de
6 fagocitose por macrófagos foi utilizada a linhagem J774.16. Os macrófagos foram
7 mantidos em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®) com 10% de
8 SFB inativado, 10% de meio NCTC-109 (Gibco®), 1% aminoácidos não
9 essenciais (Gibco®) e 1% de Penstrep (Gibco®), em placas de Petri (90x20mm) a
10 37°C e 10% CO₂. As culturas eram repicadas a cada dois a três dias ou assim
11 que formasse uma camada confluenta de células no fundo da placa. No dia
12 anterior ao desafio dos macrófagos com as células de leveduras, os macrófagos
13 foram cultivados na concentração de 10⁵ células por placa e incubados overnight.
14 Também foi realizada uma cultura de *C. parapsilosis* (isolado GA1) em meio YPD
15 líquido que ficou incubada, sob agitação, a 30°C/overnight para que se
16 trabalhasse com cultura jovem e células isoladas no momento do desafio dos
17 macrófagos. Assim que se deu a formação de uma camada confluenta de
18 macrófagos no fundo das placas (≥80% da placa), foram acrescentadas 10⁵
19 células de leveduras por placa. O material de cada placa foi coletado nos tempos
20 0, 15min, 30min, 1h e 6h, o RNA foi extraído, quantificado e convertido para
21 cDNA (DNA complementar), conforme descrito abaixo, para reações de PCR em
22 tempo real e análise de expressão genica.

23 Extração do RNA: as células foram coletadas por centrifugação, o *pellet*
24 obtido foi lavado uma vez com 3ml de água MiliQ estéril e transferidos para
25 *ependorf*. O material foi lavado duas vezes com AE buffer gelado (50mM NaOAc

1 pH 5.5, 10mM EDTA; tratado com DEPC: Diethylpyrocarbonate). Após as
2 lavagens, o *pellet* foi ressuspendido em 500µl de AE buffer, foram adicionados
3 40µl de 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate) e homogeneizado em vórtex. A
4 seguir, foram adicionados 500µl de fenol (equilibrado com AE buffer), o tubo foi
5 homogeneizado em vórtex e incubado a 65°C/4min. O *ependorf* foi resfriado em
6 banho de gelo seco e etanol, até o surgimento de cristais de fenol, e então
7 centrifugados a 13000g/2min/TA. O procedimento de aquecimento e resfriamento
8 foi repetido por três vezes ou até que fossem obtidas duas fases bem definidas
9 após a centrifugação. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo *ependorf*
10 e foi então acrescentado 1ml de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1),
11 homogeneizado em vórtex e centrifugados a 13000g/5min/TA. A fase aquosa foi
12 transferida para um novo tubo, foram adicionados 30µl de volume de 3M acetado
13 de potássio (pH5.3, tratado com DEPC) e 500µl de etanol gelado a 100%. Os
14 tubos foram incubados a -20°C/1h para precipitação do RNA. Após a
15 precipitação, o tubo foi centrifugado a 13000g/20min/4°C, o *pellet* foi lavado com
16 80% de etanol gelado, novamente centrifugado a 13000g/20min/4°C e deixado
17 para secar a temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspendido com 30µl de água
18 MiliQ estéril. O RNA foi mantido em freezer -80°C até o momento do uso. Esse
19 protocolo de extração de RNA foi adaptado de Schmitt et al. (1990). O RNA obtido
20 foi quantificado em equipamento nanodrop e as concentrações ajustadas
21 para ~10ng/µl. A conversão do RNA para cDNA foi realizada com o iScript cDNA
22 Synthesis (BioRad). O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento do
23 uso nas reações de PCR em tempo real.

24 Reações de PCR em tempo real: foram desenhados seis pares de
25 primers para uso nas reações de PCR em tempo real, sendo um par pra cada

1 gene da família ALS-like de *C. parapsilosis* (ALS1 a ALS5) e um par para o gene
2 da alfa-tubulina (TUB4) como controle interno (Quadro 1). As reações de PCR e
3 tempo real foram realizadas seguindo protocolo do kit iQ™ SYBR® Green
4 Supermix (BioRad) em placas de 384 poços. Os dados obtidos foram analisados
5 sempre considerando a expressão do gene controle.

6 Detecção dos genes ALS em *C. parapsilosis*: para tentar detectar a
7 presença dos genes ALS-like nos 85 isolados de *C. parapsilosis*, foram
8 desenhados primers para amplificação dos cinco genes dessa família (Quadro 1).
9 Os primers foram desenhados de modo a amplificar integralmente cada gene. Por
10 tratar-se de regiões relativamente grandes a serem amplificadas, as reações de
11 PCR foram realizadas fazendo-se uso da enzima FidelityTaq (usb) devido a sua
12 capacidade de amplificação de longas sequências (>10kb). As reações foram
13 realizadas nas seguintes condições de ciclagem: 92°C/30s, seguido por 35 ciclos
14 de 92°C/30s, 53°C/30s, e 68°C/2min e 68°C/10min. O material amplificado foi
15 analisado por corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8% e o marcador de
16 1kb (Promega) foi utilizado para estimativa de tamanho das bandas obtidas.

17

18 **3.13. Análise estatística**

19 Todos os experimentos foram realizados em replicatas. Quando houve
20 necessidade, os softwares utilizados para análise dos resultados foram: BioEstat
21 5.3, GraphPad Prism 5 e SPSS 20.0. Resultados de produção de biofilme foram
22 expressos através da média \pm desvio padrão e os testes de ANOVA, Brown-
23 Forsythe, Bartlett's, Brown-Forsythe e Tukey's. O teste Kolmogorov-Smirnov foi
24 empregado para a comparação entre a produção de biofilme e número de *motifs*
25 por alelo de *C. albicans*. Dados de expressão gênica, de *C. parapsilosis*, foram

- 1 analisados por ANOVA one-way e Tukey's. Em todos os casos em que foi
- 2 necessária análise estatística, foi considerado o valor significativo $p < 0,05$.

Quadro 1. Listagem dos pares de primers empregados no presente estudo.

Primer	Sequência 5'-3'	Alvo	Espécie	Referência
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS1-5.8S-ITS2	<i>Candida spp.</i>	White et al, 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG			
D1D2_f	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	28S rDNA	<i>Candida spp.</i>	Kurtzman & Robnett, 1997
D1D2_r	GGTCCGTGTTCAAGACGG			
CA-INT-F	ATAAGGGAAGTCGGCAAATAGATCCGTA	Intron grupo I	<i>C. albicans</i>	McCullough et al, 2005
CA-INT-R	CCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATAGTAGAT			
Ca_ALS1_f	TGCAAGTGCAAAGACAATCAC	ALS1	<i>C. albicans</i>	Este estudo
Ca_ALS1_r	TGTGATCAAACCGTACAACCA			
Ca_HWP1_f	TGAGATTATCAACTGCTCAACTTATTG	HWP1	<i>C. albicans</i>	Este estudo
Ca_HWP1_r	GATCAAGAATGCAGCAATACCA			
ALS3genoF	ACCTTACCATTTCGATCCTAACC	ALS3	<i>C. albicans</i>	Oh et al, 2005
ALS3genoR	GATGGGGATTGTGAAGTGG			
ALS3genoF2	CCACAACACATACTAATCCAACCTG	ALS3	<i>C. albicans</i>	Oh et al, 2005
ALS3genoR2	TGTAGACCACAAAGTTGTATGGTG			
SADH.f	GTTGATGCTGTTGGATTGT	SADH	<i>C. parapsilosis</i>	Tavanti et al, 2005
SADH.r	CAATGCCAAATCTCCCAA			
CpALS1_RT_f	TCAAGCTCTTCCAACCTCAGG	ALS1	<i>C. parapsilosis</i>	Este estudo
CpALS1_RT_r	TTCGGTAAGCTGGAGTTGTC			
CpALS2_RT_f	ATGGCTTGGCTCAACTACTG	ALS2	<i>C. parapsilosis</i>	Este estudo
CpALS2_RT_r	GAATTGGAACCTGAACAACG			
CpALS3_RT_f	ACCACAGCAAACCTTTCAAGG	ALS3	<i>C. parapsilosis</i>	Este estudo
CpALS3_RT_r	ACGATGGGACTACACGATTG			
CpALS4_RT_f	AACAATCCTTGTCTGAAGTGC	ALS4	<i>C. parapsilosis</i>	Este estudo
CpALS4_RT_r	GGCAGTGATTGTCTGATGTC			
CpALS5_RT_f	AGTGTTCAATCTGCCAGGAG	ALS5	<i>C. parapsilosis</i>	Este estudo
CpALS5_RT_r	ACCAGTCCAAACTCTGTCTG			

Primer	Sequência 5'-3'	Alvo	Espécie	Referência
<i>TUB4_f</i>	CAGAGCTGTTTGTATGTTGTCCA	alpha-tubulin	<i>C. parapsilosis</i>	Nguyen et al, 2009
<i>TUB4_r</i>	ATTCACCTTCTTCCATACCTTCAC			
<i>CpALS1_f</i>	GCGTTTATTGCCTTTGTGCT	ALS1	<i>C. parapsilosis</i>	Este estudo
<i>CpALS1_r</i>	TCGATAGGTCCATTTCTTCA			
<i>CpALS2_f</i>	GCGATATTGGTGGCCTTTAC	ALS2	<i>C. parapsilosis</i>	Este estudo
<i>CpALS2_r</i>	CAAGACTGTCAAGATTCCACTTG			
<i>CpALS3_f</i>	TTCATTTGTGGCCATTTTCA	ALS3	<i>C. parapsilosis</i>	Este estudo
<i>CpALS3_r</i>	TTGACTTGAACCTGATCCTTCA			
<i>CpALS4_f</i>	TGACGATATTGGTGGCCTTT	ALS4	<i>C. parapsilosis</i>	Este estudo
<i>CpALS4_r</i>	GGATGGAAATAGCGACGAAA			
<i>CpALS5_f</i>	GAATGCACATATGGGCTCAG	ALS5	<i>C. parapsilosis</i>	Este estudo
<i>CpALS5_r</i>	CCAAGAGAGGCAAGATCCAA			

1

2

4. RESULTADOS

4.1 *Candida* spp.

4.1.1 Identificação

A frequência das espécies, das 196 amostras avaliadas, foi variável conforme a metodologia empregada para a identificação. Dados obtidos nos três métodos avaliados, estão descritos abaixo.

Identificação automatizada: das 196 amostras analisadas, apenas seis amostras (3,1%) não puderam ser identificadas, em nível de espécie, pelo sistema automatizado de identificação, tendo sido considerado apenas o gênero para inclusão das mesmas no presente estudo. Por outro lado, o método foi capaz de identificar sete espécies diferentes. Quanto à frequência das espécies, *C. albicans* foi a mais frequente (87/196), seguida de *C. parapsilosis* (65/196) e *C. tropicalis* (20/196). Outras espécies como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* também foram identificadas, mas em menor frequência (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência das espécies avaliadas, segundo identificação automatizada^a realizada no HC-FMB.

IDENTIFICAÇÃO	N	%
<i>C. albicans</i>	87	44,4
<i>C. glabrata</i>	6	3,1
<i>C. guilliermondii</i>	6	3,1
<i>C. krusei</i>	1	0,5
<i>C. lusitaniae</i>	5	2,5
<i>C. parapsilosis</i>	65	33,2
<i>C. tropicalis</i>	20	10,1
<i>Candida sp</i>	6	3,1
Total	196	100

^aMicroscan ou Vitek

1

2 Identificação morfológica e fisiológica: a metodologia de identificação
 3 baseada nas características morfológicas e fisiológicas de cada espécie foi
 4 realizada para as 196 amostras. Por essa metodologia foram identificadas cinco
 5 diferentes espécies. Seis amostras (3,1%) não puderam ser identificadas. Das
 6 196 amostras estudadas, *C. parapsilosis* foi a espécie mais frequente (83/196),
 7 seguida de *C. albicans* (77/196). *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*
 8 também foram identificadas por esta metodologia, porém com menor frequência
 9 (Tabela 2).

10

Tabela 2. Frequência das espécies avaliadas, segundo identificação morfo-fisiológica.

IDENTIFICAÇÃO	N	%
<i>C. albicans</i>	77	39,3
<i>C. glabrata</i>	9	4,6
<i>C. guilliermondii</i>	4	2,0
<i>C. parapsilosis</i>	83	42,3
<i>C. tropicalis</i>	17	8,7
<i>Candida sp</i>	6	3,1
Total	196	100

11

12 Identificação molecular: realizada pelo sequenciamento de regiões de
 13 rDNA, para as mesmas 196 amostras. Este método foi capaz de identificar seis
 14 diferentes espécies do gênero *Candida*, além de uma amostra de *Saccharomyces*
 15 *cerevisiae* e duas amostras de *Cryptococcus neoformans*. Quanto à frequência
 16 das espécies, *C. parapsilosis* (81/196) e *C. albicans* (77/196) foram mais

1 frequentes, seguidas de *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C.*
 2 *orthopsilosis*, estas últimas com menor frequência (Tabela 3).

3

Tabela 3. Frequência das espécies avaliadas, segundo identificação molecular por amplificação e sequenciamento de rDNA.

Molecular	N	%
<i>C. albicans</i>	77	39,3
<i>C. glabrata</i>	8	4,1
<i>C. guilliermondii</i>	5	2,6
<i>C. neoformans</i>	1	0,5
<i>C. neoformans var. grubii</i>	1	0,5
<i>C. orthopsilosis</i>	4	2,0
<i>C. parapsilosis</i>	81	41,3
<i>C. tropicalis</i>	18	9,2
<i>S. cerevisiae</i>	1	0,5
Total	196	100

4

5 4.1.2 Comparação entre os métodos de identificação

6 Os três métodos de identificação empregados no presente estudo foram
 7 avaliados considerando a porcentagem de concordância entre os mesmos. O
 8 software SPSS (IBM SPSS Statistics) foi utilizado para análise comparativa dos
 9 dados de frequência de cada espécie, obtidos pelas diferentes metodologias.

10 Método automatizado versus método morfo-fisiológico: os dados de
 11 frequência de espécies, obtidos pelas metodologias automatizada e morfo-
 12 fisiológica, foram cruzados entre si e estão apresentados na Tabela 4. Das 196
 13 amostras avaliadas, 161 (82,1%) apresentaram concordância quanto à

1 identificação por ambas as metodologias, considerando concordantes também
 2 duas amostras que não puderam ser identificadas por nenhuma das metodologias
 3 empregadas. Trinta e cinco (17,9%) amostras foram discordantes, isto é, não
 4 foram identificadas como mesma espécie pelas duas metodologias.
 5

Tabela 4. Comparação entre métodos de identificação. Método automatizado (horizontal) versus método morfo-fisiológico (vertical).

IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	IDENTIFICAÇÃO POR MÉTODO AUTOMATIZADO (HORIZONTAL)						Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida sp</i>	
<i>C. albicans</i>	72	2	0	9	2	2	87
<i>C. glabrata</i>	0	6	0	0	0	0	6
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	4	2	0	0	6
<i>C. krusei</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>C. lusitaniae</i>	0	0	0	3	0	2	5
<i>C. parapsilosis</i>	1	0	0	63	1	0	65
<i>C. tropicalis</i>	3	0	0	3	14	0	20
<i>Candida sp</i>	1	0	0	3	0	2	6
Total	77	9	4	83	17	6	196

6

7 Método automatizado versus método molecular: na Tabela 5 estão
 8 apresentados os dados de frequência de espécies, obtidos pelas metodologias
 9 automatizada e molecular. Observou-se que das 196 amostras avaliadas, 157
 10 (80,1%) apresentaram concordância e 39 (19,9%) amostras foram discordantes
 11 quanto à comparação dos dados de identificação de ambas as metodologias.
 12 Considerou-se como concordante a ocorrência de três amostras de *C.*
 13 *orthopsilosis*, previamente identificadas como *C. parapsilosis* pelo método
 14 automatizado, devido a impossibilidade de diferenciação por técnicas não-
 15 moleculares entre as três espécies do complexo “*psilosis*”.

1

Tabela 5. Comparação entre métodos de identificação. Método automatizado (horizontal) *versus* método molecular (vertical).

IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neof. var. grubii</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Total
	<i>C. albicans</i>	72	2	0	1	0	0	10	2	
<i>C. glabrata</i>	0	5	0	0	0	0	0	0	1	6
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	3	0	0	0	3	0	0	6
<i>C. krusei</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>C. lusitaniae</i>	0	0	2	0	0	0	3	0	0	5
<i>C. parapsilosis</i>	1	0	0	0	0	3	60	1	0	65
<i>C. tropicalis</i>	3	0	0	0	0	1	2	14	0	20
<i>Candida sp</i>	1	0	0	0	1	0	3	1	0	6
Total	77	8	5	1	1	4	81	18	1	196

2

3

Método morfo-fisiológico *versus* método molecular: a distribuição dos

4

dados de frequência de espécies identificadas pelas metodologias morfo-

5

fisiológica e molecular, apresentaram 95,9% (188/196) de concordância quando

6

comparados entre si. Considerou-se como concordante a ocorrência de quatro

7

amostras de *C. orthopsilosis*, devido à impossibilidade de diferenciação por

8

técnicas não-moleculares entre as 3 espécies do complexo “*psilosis*”. Portanto, foi

9

observada discordância de 4,1% entre os métodos morfo-fisiológico e molecular

10

de identificação (Tabela 6).

11

Tabela 6. Comparação entre métodos de identificação. Método morfo-fisiológico (horizontal) *versus* método molecular (vertical).

IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES										Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neof. var. grubii</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
<i>C. albicans</i>	77	0	0	0	0	0	0	0	0	77
<i>C. glabrata</i>	0	8	0	0	0	0	0	0	1	9
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	3	0	0	0	1	0	0	4
<i>C. parapsilosis</i>	0	0	0	0	0	4	79	0	0	83
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	17	0	17
<i>Candida sp</i>	0	0	2	1	1	0	1	1	0	6
Total	77	8	5	1	1	4	81	18	1	196

1

2

3

4.1.3 Produção de biofilme

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

A produção de biofilme foi avaliada nos 196 isolados, sendo os resultados obtidos em DO. O método molecular de identificação foi considerado para avaliação e comparação da produção de biofilme entre as diferentes espécies, sendo considerada a média \pm desvio padrão dos valores de DO (triplicata) para análise dos dados. O software Prism (versão) foi utilizado para análise dos dados. Imagens obtidas a partir de microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura também foram avaliadas e estão apresentadas abaixo.

Quantificação do biofilme: os dados obtidos para a quantificação do biofilme das 196 amostras avaliadas estão apresentados na Figura 11. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na produção de biofilme entre diferentes espécies, quando comparadas entre si.

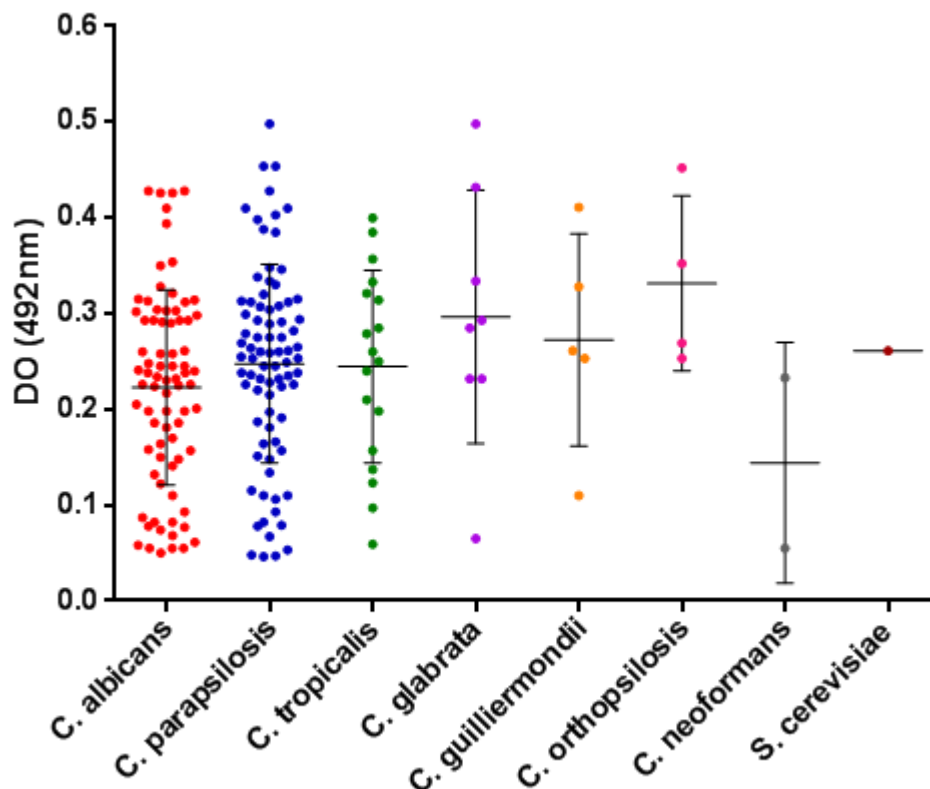


Figura 11. Quantificação da produção de biofilme. Cada ponto representa um amostra e a barra representa valores de média \pm desvio padrão de cada grupo de amostras de uma mesma espécie. Não foi observada diferença entre os grupos ($p > 0,05$; testes de ANOVA, Brown-Forsythe, Bartlett's test, Brown-Forsythe test, Tukey's). Amostras de *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae* não estão incluídas na análise estatística.

1

2 Microscopia de fluorescência: das 196 amostras avaliadas, 32 foram
 3 submetidas à microscopia de fluorescência. Independente da espécie, amostras
 4 com maiores valores de DO apresentaram-se como uma massa confluenta, e as
 5 com valores menores apresentaram-se como células dispersas. A Figura 12
 6 apresenta imagens de duas amostras, AC-129 *C. albicans* com DO média de
 7 0,350 e AC-31 *C. parapsilosis* com DO média de 0,047.

8

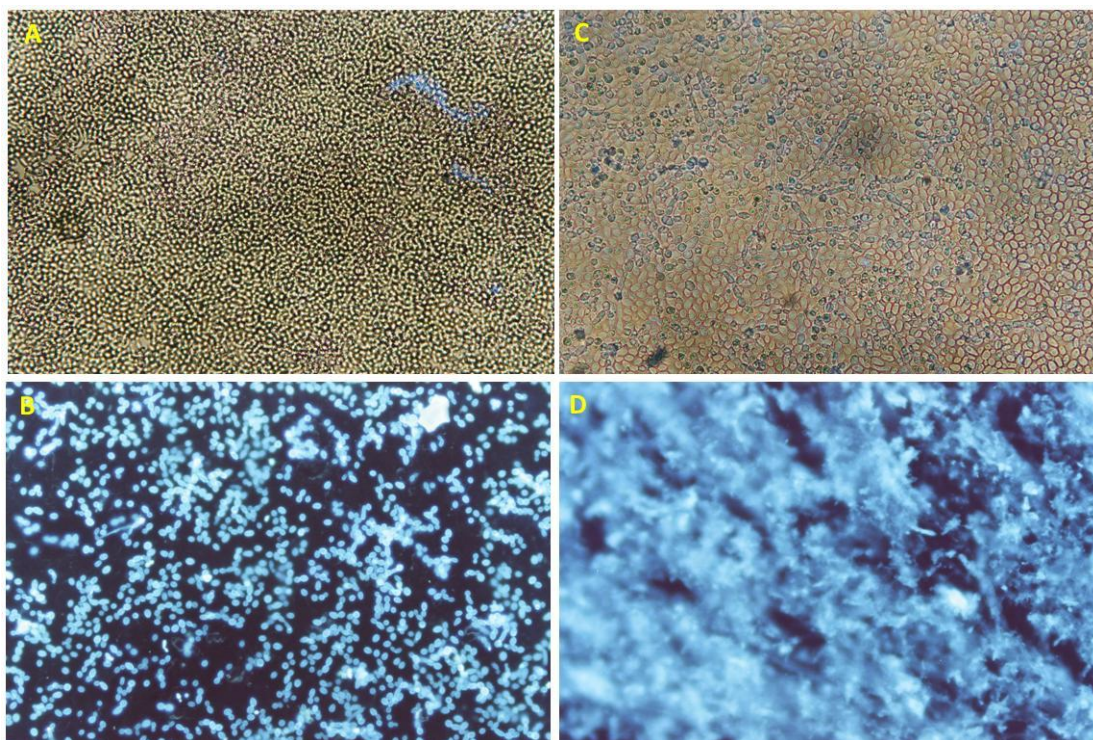


Figura 12. Microscopia de fluorescência. Discos de silicone após ensaio de produção de biofilme. (A) Microscopia óptica (luz branca) do isolado AC-31; (B) Microscopia de fluorescência do isolado AC-31; (C) Microscopia óptica (luz branca) do isolado AC-129; (D) Microscopia de fluorescência do isolado AC-129.

1

2

3 Microscopia eletrônica de varredura: das 196 amostras avaliadas, 21 foram
4 submetidas à microscopia eletrônica de varredura. Independente da espécie,
5 amostras com maiores valores de DO apresentaram estruturas não-celulares
6 (presença de matriz polimérica extracelular) aderidas a células. A Figura 13
7 apresenta imagens, em diferentes magnitudes, confirmando a presença de matriz
8 polimérica extracelular da amostra AC-129.

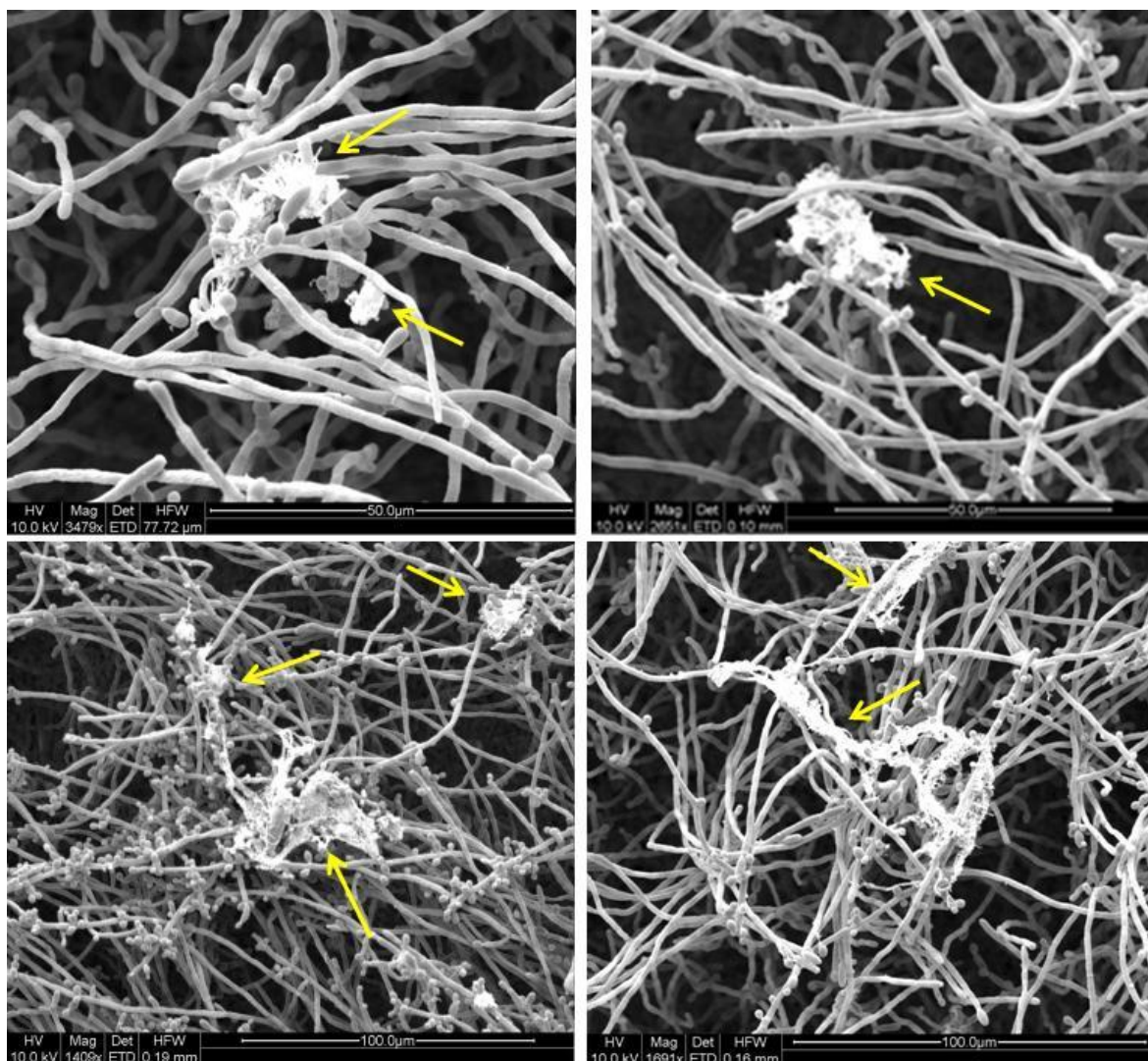


Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura. Produção de biofilme da amostra de *C. albicans* AC-129. As setas indicam possível produção de matriz polimérica extracelular.

1

2 4.1.4 Susceptibilidade a drogas antifúngicas

3 Testes de susceptibilidade frente à anfotericina B, anidulafungina, fluconazol
 4 e voriconazol foram realizados para os 196 isolados. As Tabelas 7 a 10
 5 apresentam a distribuição dos valores de MIC obtidos para cada espécie frente a
 6 cada uma das drogas avaliadas, bem como concentração que determina o MIC50

1 e MIC90, isto é, a concentração capaz de inibir o crescimento de pelo menos 50%
2 e 90% das amostras, respectivamente.

3 Não foi observada resistência frente às drogas avaliadas, com exceção da
4 anfotericina B, que embora não tenha um ponto de corte delimitado pelo CLSI,
5 apresentou 2,6% (5/196) de amostras resistentes quando considerado MIC
6 $\geq 2\mu\text{g/ml}$ (NGUYEN et al., 1998). Resistência a anfotericina B, foi detectada em
7 três das oito espécies avaliadas, sendo: 2,6% (2/77) de *C. albicans*, 2,5% (2/81)
8 de *C. parapsilosis* e 20% (1/5) de *C. guilliermondii*. Os valores de MIC das cepas
9 controle, ATCC 22019 de *C. parapsilosis* e ATCC 6258 de *C. krusei*, variaram,
10 respectivamente, de 0,25-1 $\mu\text{g/ml}$ e 16-64 $\mu\text{g/ml}$ para fluconazol, 0,03-0,25 $\mu\text{g/ml}$ e
11 0,12 a 1 $\mu\text{g/ml}$ para voriconazol, 0,25-2 $\mu\text{g/ml}$ e 0,03-0,12 $\mu\text{g/ml}$ para anidulafungina
12 e 0,25-1 $\mu\text{g/ml}$ e 0,25-1 $\mu\text{g/ml}$ para anfotericina B.

13

Tabela 7. Perfil de susceptibilidade a anfotericina B de 196 amostras de *Candida* spp. isoladas de hemoculturas do HC-FMB-UNESP de 2000 a 2006.

IDENTIFICAÇÃO	Concentração da droga em $\mu\text{g/ml}$ n(%)			
	0,25	0,5	1,0	2,0
<i>C. albicans</i> (77)	3 (3,9)	22 (28,6)	50 (64,9)	2 (2,6)
<i>C. glabrata</i> (8)	0	2 (25,0)	6 (75)	0
<i>C. neoformans</i> (2)	0	0	2 (100)	0
<i>C. orthopsilosis</i> (4)	0	1 (25,0)	3 (75)	0
<i>C. tropicalis</i> (18)	1 (5,6)	1 (5,6)	16 (88,9)	0
<i>S. cerevisiae</i> (1)	0	1 (100)	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (5)	0	1 (20,0)	3 (60)	1 (20)
<i>C. parapsilosis</i> (81)	0	7 (8,6)	72 (88,9)	2 (2,5)
Total (196)	4 (2,0)	35 (17,9)	152 (77,6)	5 (2,6)

Valores de MIC50 destacados em cinza e de MIC 90 em negrito.

14

15

16

17

18

Tabela 8. Perfil de susceptibilidade a anidulafungina de 196 amostras de *Candida* spp. isoladas de hemoculturas do HC-FMB-UNESP de 2000 a 2006.

IDENTIFICAÇÃO	Concentração da droga em µg/ml n(%)					
	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1,0
<i>C. albicans</i> (77)	15(19,5)	21(27,3)	9(11,7)	2(2,6)	30(39)	0
<i>C. glabrata</i> (8)	0	1(12,5)	1(12,5)	2(25)	4(50)	0
<i>C. guilliermondii</i> (5)	0	0	0	0	4(80)	1(20)
<i>C. neoformans</i> (2)	0	0	0	0	2(100)	0
<i>C. orthopsilosis</i> (4)	0	0	0	0	4(100)	0
<i>C. parapsilosis</i> (81)	1(1,2)	0	1(1,2)	6(7,4)	73(90,1)	0
<i>C. tropicalis</i> (18)	1(5,6)	3 (16,7)	2(11,1)	3(16,7)	9(50)	0
<i>S. cerevisiae</i> (1)	0	0	0	1(100)	0	0
Total (196)	17(8,7)	25(12,8)	13(6,6)	14(7,1)	126(64,3)	1(0,5)

Valores de MIC50 destacados em cinza e de MIC 90 em negrito.

1

2

Tabela 9. Perfil de susceptibilidade a fluconazol de 196 amostras de *Candida* spp. isoladas de hemoculturas do HC-FMB-UNESP de 2000 a 2006.

IDENTIFICAÇÃO	Concentração da droga em µg/ml n(%)								
	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0
<i>C. albicans</i> (77)	1 (1,3)	15 (19,5)	26 (33,8)	24 (31,2)	11 (14,3)	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i> (8)	0	0	0	3 (37,5)	0	0	2 (25)	2 (25)	1 (12,5)
<i>C. guilliermondii</i> (5)	0	0	0	2 (40)	1 (20)	0	1 (20)	1 (20)	0
<i>C. neoformans</i> (2)	0	0	0	1 (50)	0	0	1 (50)	0	0
<i>C. orthopsilosis</i> (4)	0	1 (25)	0	3 (75)	0	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (81)	0	4 (4,9)	0	58 (71,6)	17 (21)	1 (1,2)	0	1 (1,2)	0
<i>C. tropicalis</i> (18)	0	1 (5,6)	0	7 (38,9)	6 (33,3)	4 (22,2)	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)	0
Total (196)	1 (0,5)	21 (10,7)	26 (13,3)	98(50)	35 (17,9)	5 (2,6)	4 (2,0)	5 (2,6)	1 (0,5)

Valores de MIC50 destacados em cinza e de MIC 90 em negrito.

1

Tabela 10. Perfil de susceptibilidade a voriconazol de 196 amostras de *Candida* spp. isoladas de hemoculturas do HC-FMB-UNESP de 2000 a 2006.

IDENTIFICAÇÃO	Concentração da droga em µg/ml n(%)					
	0,03	0,06	0,12	0,025	0,5	1,0
<i>C. albicans</i> (77)	68 (88,3)	8 (10,4)	0	1 (1,3)	0	0
<i>C. glabrata</i> (8)	5 (62,5)	0	0	0	2 (25)	1 (17,5)
<i>C. guilliermondii</i> (5)	2 (40)	2 (40)	1 (20)	0	0	0
<i>C. neoformans</i> (2)	2 (100)	0	0	0	0	0
<i>C. orthopsilosis</i> (4)	3 (75)	1 (25)	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (81)	62 (76,5)	18 (22,2)	0	0	1 (1,2)	0
<i>C. tropicalis</i> (18)	3 (16,7)	11 (61,1)	1 (5,6)	2 (11,1)	0	1 (5,6)
<i>S. cerevisiae</i> (1)	0	0	1 (100)	0	0	0
Total (196)	145 (74)	40 (20,4)	3 (1,5)	3 (1,5)	3 (1,5)	2 (1)

Valores de MIC50 destacados em cinza e de MIC 90 em negrito.

4.2 *C. albicans*

4.2.1 Introns do grupo I

Das 77 cepas de *C. albicans* avaliadas, observou-se um predomínio do genótipo A com 57 isolados, seguido do genótipo B com 15 isolados e genótipo C com 5 isolados (Tabela 11). Não foi observada a ocorrência de *C. dubliniensis* na presente amostragem. A Figura 14 contém uma amostragem dos isolados avaliados, na qual se observou o polimorfismo desta região que possibilita a classificação dos diferentes genótipos de *C. albicans* e também a diferenciação (identificação) da espécie críptica *C. dubliniensis*.

Tabela 11. Genotipagem de 77 *C. albicans* isoladas de hemocultura do HC-FMB-UNESP de 2000 a 2006.

Genótipo	N	%	pb ^a
Genótipo A	57	74.0	450
Genótipo B	15	19.5	840
Genótipo C	5	6.5	450, 840
<i>C. albicans</i> gen.A	ATCC 36801 ^b		450
<i>C. albicans</i> gen.B	ATCC 36803 ^b		840
<i>C. dubliniensis</i>	ATCC MYA646 ^b		1080

^aTamanho da banda em pares de base; ^bCepas padrão ATCC.

12

13

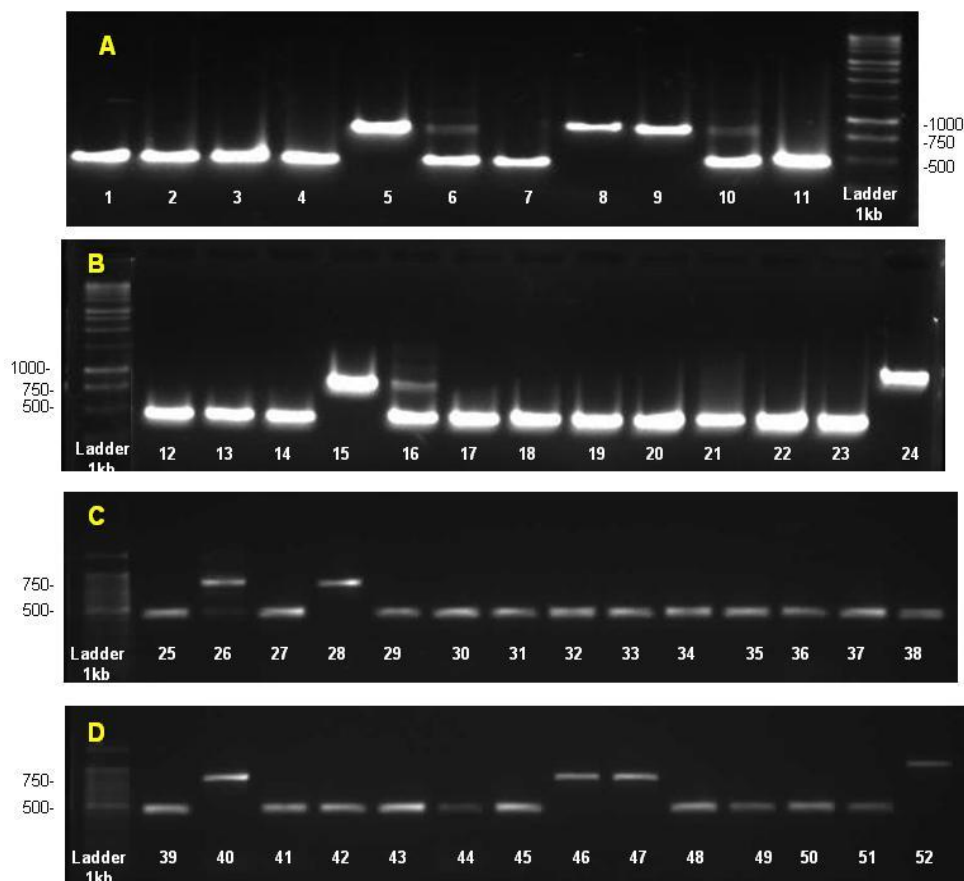


Figura 14. Produtos de PCR da região de intron do grupo I de *C. albicans*. Polimorfismos de tamanho dos fragmentos para caracterização do genótipo. Genótipo A: 1-4,7,11-14,17-22,25, 27, 29-39, 41-45, 48-50; Genótipo B: 5,8,9,15,26,28,40,46,47; Genótipo C: 6,10,16. Cepas padrão: ATCC 36801 *C. albicans* genótipo A: 23, 51; ATCC MYA646 *C. dubliniensis*: 24, 52. Marcador 1kb (Promega).

1

2

3 4.2.2 Genes ALS1 e ALS3

4 Para avaliação do número de motivos e produção de biofilme em *C.*
 5 *albicans*, as amostras analisadas foram divididas em dois grupos, de acordo com
 6 valores de DO obtidos pelo ensaio de quantificação do biofilme por XTT.
 7 Considerando as imagens obtidas pela microscopia e valores de DO, os grupos
 8 foram divididos em pouco ou não produtores de biofilme ($DO \leq 0,238$) e boas
 9 produtoras de biofilme ($DO > 0,238$). O software Prism (versão) foi empregado

1 para elaboração dos gráficos e análise estatística da distribuição do número de
2 motifs entre os grupos avaliados.

3 De um total de 77 amostras de *C. albicans* avaliadas, obteve-se
4 sucesso, com amplificação e resolução do número de *motifs* do gene ALS1, na
5 caracterização de 64 amostras. Destas, 38 (54,9%) apresentaram-se em
6 heterozigose e 26 (40,6%) em homozigose, evidenciando o genoma diploide
7 dessa espécie. O número de *motifs* por alelo variou de quatro a 24 (Figura 15 e
8 Tabela 12). Não houve relação da distribuição entre o número de *motifs* e a
9 produção de biofilme ($p>0,05$).

10

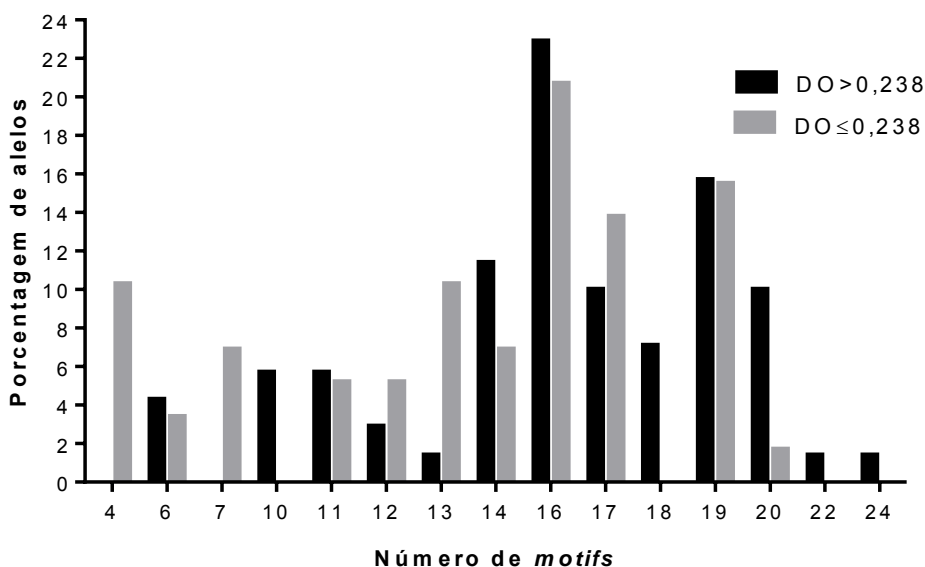


Figura 15. Gene ALS1 de *C. albicans*. Distribuição do número de motifs por alelo de 64 amostras (128 alelos) de *C. albicans*.

11

12 Quanto ao gene ALS3, das 77 amostras de *C. albicans* avaliadas,
13 obteve-se sucesso, com amplificação e resolução do número de *motifs* do gene
14 ALS3, na caracterização de 67 amostras. Destas, 42 (62,7%) apresentaram-se

1 em heterozigose e 25 (37,3%) em homozigose. O número de *motifs* por alelo
2 variou de 7 a 19 (Figura 16 e Tabela 13). Foi observada diferença entre a
3 distribuição do número de *motifs* em relação aos dois grupos de produção de
4 biofilme ($p < 0,05$).

5 Portanto, pôde-se observar que os polimorfismos de tamanho (número
6 de cópias) da região do domínio central do gene ALS3 de *C. albicans*, detectados
7 pelo número de *motifs*, podem estar relacionados à maior ou menor produção de
8 biofilme.

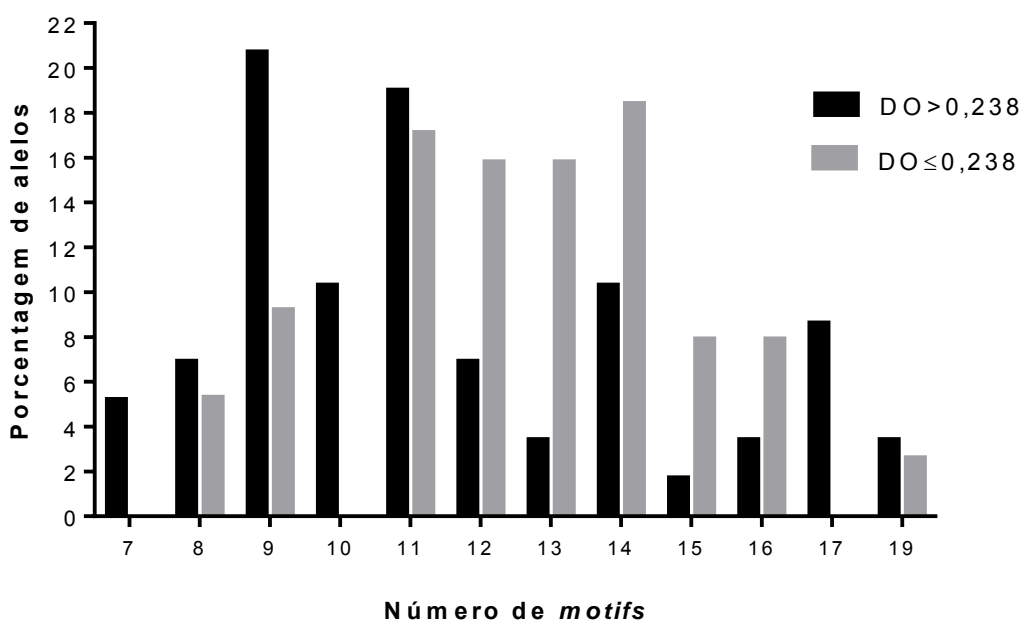


Figura 16. Gene ALS3 de *C. albicans*. Distribuição do número de *motifs* por alelo de 64 amostras (128 alelos) de *C. albicans*.

1

Tabela 12. Gene ALS1. Distribuição de alelos por número de *motifs* de 64 amostras de *C. albicans* isoladas de hemocultura do HC-FMB-UNESP de 2000 a 2006.

Produção de biofilme (n)	Porcentagem (n) de alelos para cada grupo de cópias repetidas														Med±DP ^{a,b}	
	4	6	7	10	11	12	13	14	16	17	18	19	20	22		24
DO≤0,238 (76)	10,3 (6)	3,4 (2)	6,9 (4)	0 (0)	5,2 (3)	5,2 (3)	10,3 (6)	6,9 (4)	20,7 (12)	13,8 (8)	0 (0)	15,5 (9)	1,7 (1)	0 (0)	0 (0)	13,6±4,9
DO>0,238 (58)	0 (0)	4,3 (6)	0 (0)	5,7 (4)	5,7 (4)	2,9 (2)	1,4 (1)	11,4 (8)	22,9 (16)	10,0 (7)	7,1 (5)	15,7 (11)	10,0 (7)	1,4 (1)	1,4 (1)	15,9±3,7

^aMédia do número de *motifs* repetidos por alelo ± desvio padrão. ^bTeste de Kolmogorov–Smirnov para análise da distribuição relativa entre o número de cópias repetidas por alelo: DO≤0,238 vs DO>0,238 (P=0,11).

2

Tabela 13. Gene ALS3. Distribuição de alelos por número de *motifs* de 67 amostras de *C. albicans* isoladas de hemocultura do HC-FMB-UNESP de 2000 a 2006.

Produção de biofilme (n)	Porcentagem (n) de alelos para cada grupo de cópias repetidas												Med±DP ^{a,b}
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	19	
DO≤0,238 (76)	0 (0)	5,3 (4)	9,2 (7)	0 (0)	17,1 (13)	15,8 (12)	15,8 (12)	18,4 (14)	7,9 (6)	7,9 (6)	0 (0)	2,6 (2)	12,6±2,3
DO>0,238 (58)	5,2 (3)	6,9 (4)	20,7 (12)	10,3 (6)	19 (11)	6,9 (4)	3,4 (2)	10,3 (6)	1,7 (1)	3,4 (2)	8,6 (5)	3,4 (2)	11,5±3,1

^aMédia do número de *motifs* repetidos por alelo ± desvio padrão. ^bTeste de Kolmogorov–Smirnov para análise da distribuição relativa entre o número de cópias repetidas por alelo: DO≤0,238 vs DO>0,238 (P=0,004).

3

4.2.3 Gene HWP1

As 77 amostras de *C. albicans* foram avaliadas quanto à presença e possíveis polimorfismos de tamanho do gene HWP1. A amplificação do gene HWP1 foi observada nas 77 amostras avaliadas e não foram observados polimorfismos de tamanho. A Figura 17 apresenta uma amostragem de 11 isolados, 10 amostras de hemocultura e uma cepa ATCC. Foi possível a amplificação do gene na totalidade das amostras.

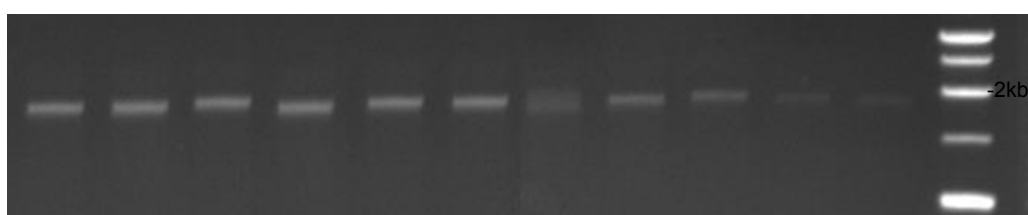


Figura 17. Amplificação do gene HWP1 de *C. albicans*. Amplificação de 10 amostras e 1 cepa padrão SC5314 de *C. albicans*. Marcador (Promega).

4.3 *C. parapsilosis* - Complexo “*psilosis*”

4.3.1 Identificação das espécies crípticas

As 85 amostras do complexo “*psilosis*”, isto é, identificadas como *C. parapsilosis* ou *C. orthopsilosis*, foram submetidas à reação de PCR para amplificação e digestão do gene SADH pela enzima *BanI* (Figura 18). Os dados obtidos foram analisados quanto ao padrão de tamanho das bandas observado em gel, após “cortes” pela enzima de restrição. Das 85 amostras do complexo “*psilosis*” (81 *C. parapsilosis* e 4 *C. orthopsilosis*), 82 mostraram ser *C. parapsilosis* e três *C. orthopsilosis*, estas últimas também foram identificadas como *C. orthopsilosis* pelo sequenciamento de ITS1-5.8S-ITS2. Apenas uma amostra mostrou-se discrepante quanto à identificação molecular, tendo sido

1 identificada como *C. orthopsilosis* pelo sequenciamento e *C. parapsilosis* pela
 2 reação de digestão do gene SADH. Portanto, foi observada concordância de
 3 98,2% (84/85) entre os métodos utilizados para identificação das espécies desse
 4 grupo.

5

6

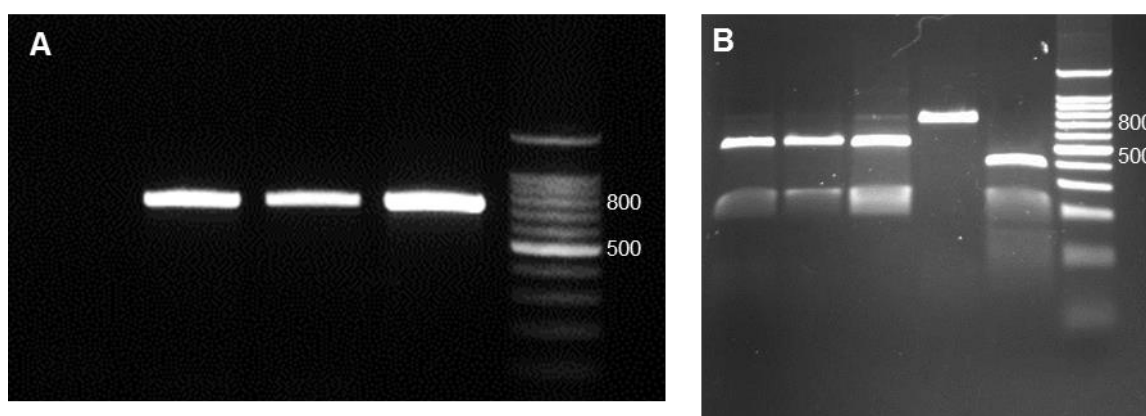


Figura 18. Gene SADH de *C. parapsilosis*. Detecção de espécies do complexo “*psilosis*”. (A) Amplificação do gene SADH - Controle negativo: 1 ; ATCC96144 *C. metapsilosis*: 2; ATCC96139 *C. orthopsilosis*: 3; ATCC22019 *C. parapsilosis*: 4; marcador de 100pb (Promega). (B) Digestão do produto amplificado, 1 e 2: amostras isoladas de pacientes AC-75 e AC-73; 3: cepa ATCC *C. metapsilosis*; 4: cepa ATCC *C. orthopsilosis*; 5: cepa ATCC *C. parapsilosis*; 6: marcador de 100pb (Promega).

7

8

9

10 4.3.2 Genes ALS

11 Para iniciar estudos sobre a genética da produção de biofilme por *C.*
 12 *parapsilosis*, os cinco genes ALS-like presentes em *C. parapsilosis* foram
 13 avaliados quanto a sua expressão em diferentes condições (biofilme e fagocitose
 14 por macrófagos). Essa fase do estudo foi realizada no Laboratório do Prof. Dr.
 15 Joshua D. Nosanchuk, como parte do estágio sanduiche no exterior.

1 Como os cinco genes ALS-like não não puderam ser detectados na
2 cepa avaliada inicialmente (GA1), foi necessária a sua substituição pela cepa
3 controle ATCC22019, na qual os 5 genes (pequenas sequências de cada gene)
4 puderam ser detectados pela amplificação por PCR (Figura 19).

5

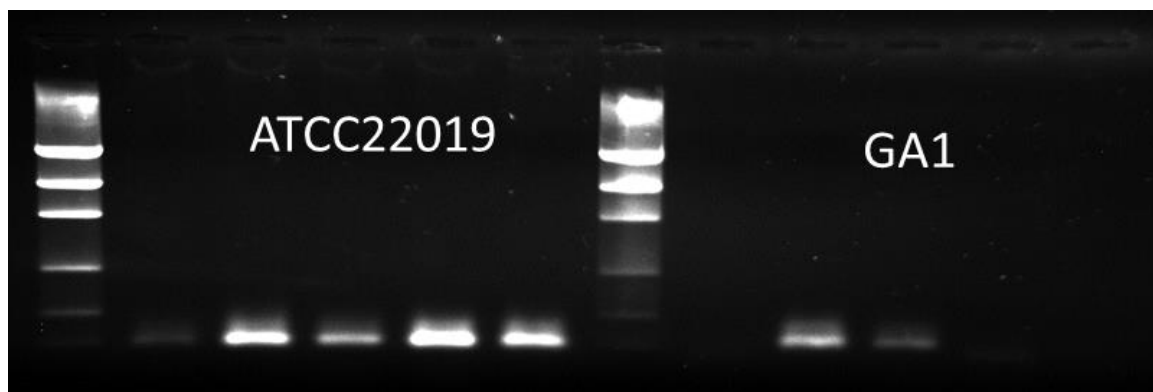


Figura 19. Amplificação dos genes ALS-like de *C. parapsilosis*. Detecção dos 5 genes da família ALS-like. Presença dos 5 genes na cepa ATCC22019 (ALS1, ALS2, ALS3, ALS4 e ALS5) e de 2 genes na cepa GA1 (ALS2 e ALS3).

6

7 4.3.2.1 Expressão dos genes ALS em condições de biofilme

8 Os cinco genes ALS-like de *C. parapsilosis* foram avaliados quanto à
9 sua expressão durante a formação de biofilme. A análise da expressão de cada
10 gene foi realizada por PCR em tempo real em dois tempos diferentes, 24 e 48
11 horas de incubação.

12 O gene ALS1-like apresentou expressão aumentada na condição de
13 biofilme quando comparado à condição de crescimento planctônico, em ambos os
14 tempos avaliados, 24 e 48 horas (Figura 20). Embora tenha sido observada
15 diferença, a expressão do gene foi muito baixa para ser considerada.

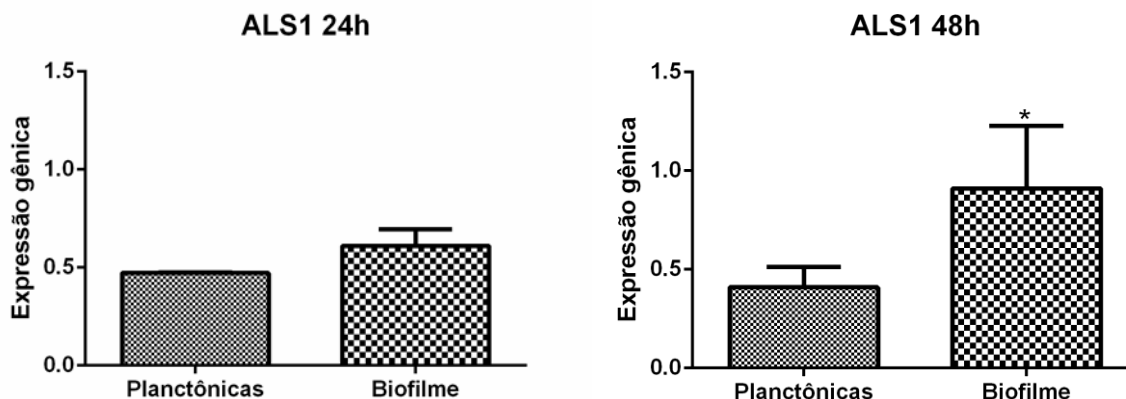


Figura 20. Expressão do gene ALS1 de *C. parapsilosis* durante biofilme. A expressão do gene ALS1 foi maior nas células do biofilme quando comparadas as células com crescimento planctônico, após incubação por 48h ($p < 0,05$).

1

2

3

4

5

Não foi observada diferença na expressão do gene ALS2-like quando se comparou as células do biofilme com as células de crescimento planctônico, em ambos os tempos avaliados, 24 e 48 horas (Figura 21).

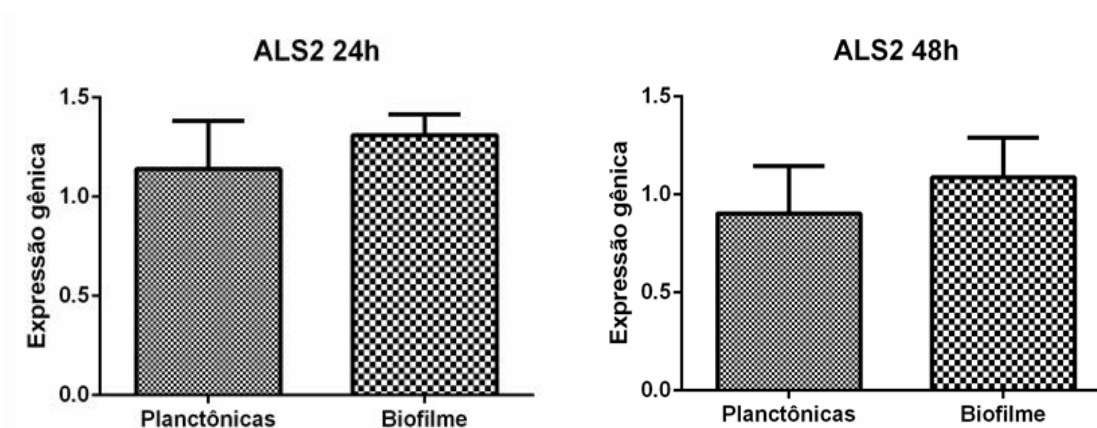


Figura 21. Expressão do gene ALS2 de *C. parapsilosis* durante biofilme. Não houve diferença estatística, quanto à expressão do gene ALS2, entre células com crescimento planctônico e células em biofilme ($p > 0,05$).

6

7

8

9

O gene ALS3-like apresentou expressão aumentada na condição de biofilme quando comparado à condição de crescimento planctônico após 48h de

1 incubação. Não foi observada diferença na expressão do gene ALS3-like no
2 tempo 24h (Figura 22). Embora tenha sido observada diferença, a expressão do
3 gene foi muito baixa para ser considerada.

4

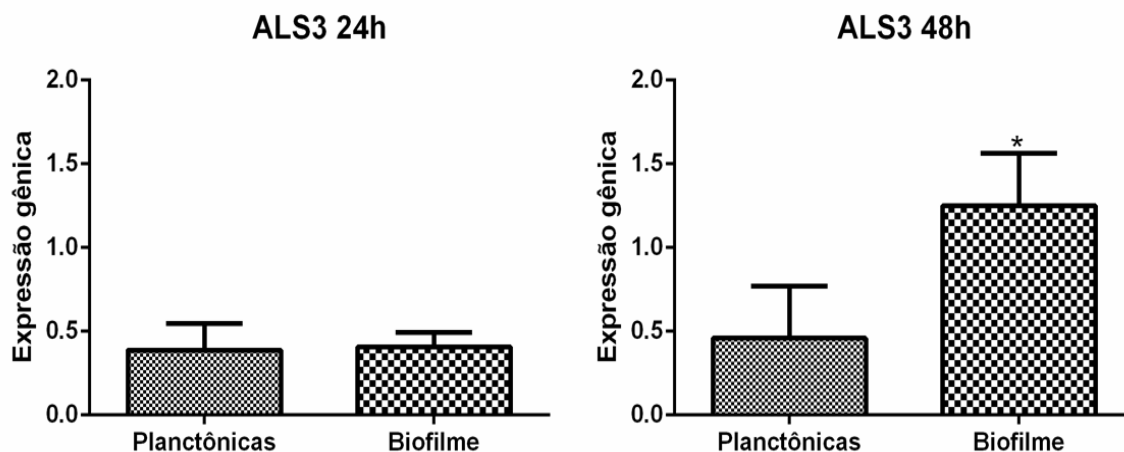


Figura 22. Expressão do gene ALS3 de *C. parapsilosis* durante biofilme. A expressão do gene ALS3 foi maior nas células do biofilme quando comparadas as células com crescimento planctônico, após 48h de incubação ($p < 0,05$).

5

6

7

8 O gene ALS4-like apresentou diminuição na expressão na condição de
9 biofilme quando comparado à condição de crescimento planctônico, em ambos os
10 tempos avaliados, 24 e 48 horas (Figura 23).

11

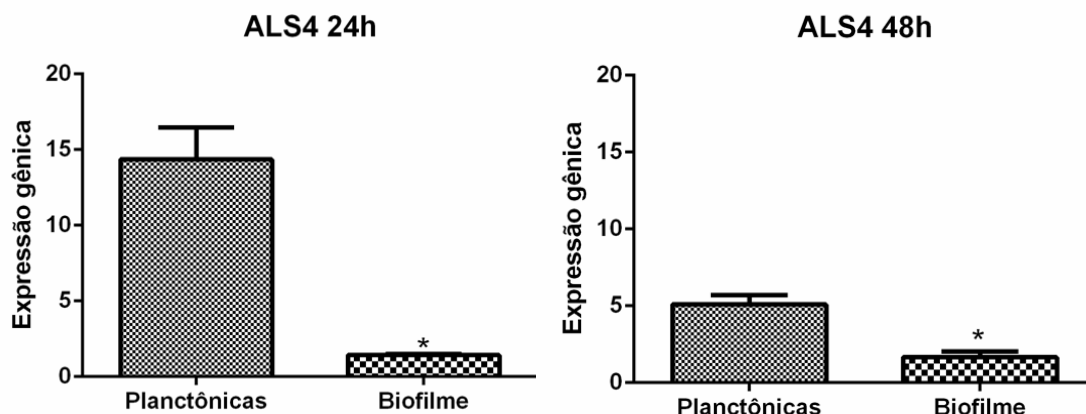


Figura 23. Expressão do gene ALS4 de *C. parapsilosis* durante biofilme. A expressão do gene ALS4 foi reduzida nas células do biofilme quando comparada com as células com crescimento planctônico, após 24 e 48h de incubação ($p < 0,05$).

1

2 O gene ALS5-like apresentou diminuição na expressão na condição de
 3 biofilme quando comparado à condição de crescimento planctônico após 48h de
 4 incubação. Não foi observada diferença na expressão do gene ALS5-like no
 5 tempo 24h (Figura 24).

6

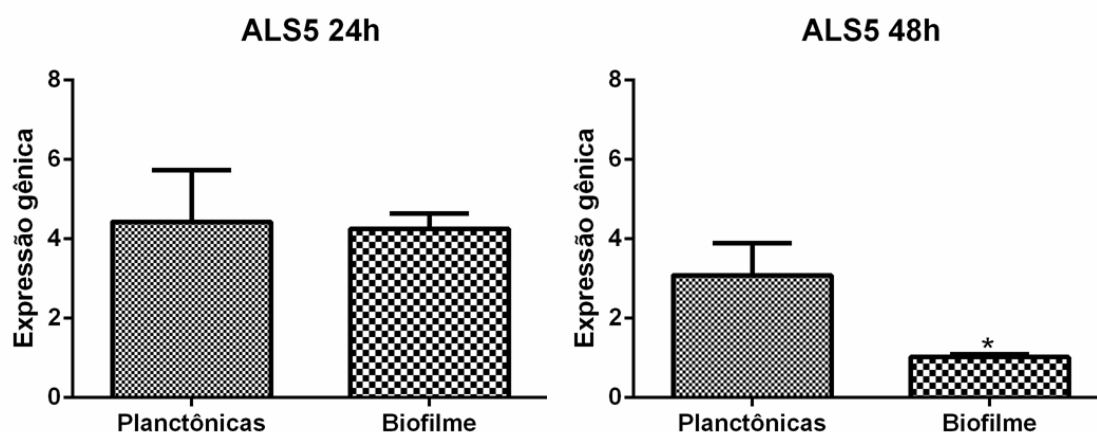


Figura 24. Expressão do gene ALS5 de *C. parapsilosis* durante biofilme. A expressão do gene ALS5 foi reduzida nas células do biofilme quando comparada com as células com crescimento planctônico, após 48h de incubação ($p < 0,05$).

7

4.3.2.2 Expressão dos genes ALS durante fagocitose por macrófagos

Os cinco genes ALS-like de *C. parapsilosis* foram avaliados quanto à sua expressão durante a fagocitose por macrófagos. A análise da expressão de cada gene foi realizada por PCR em tempo real em cinco tempos diferentes, 0min, 15min, 30min, 1h e 6h, sendo o tempo 0min empregado como controle para avaliação da expressão nos demais tempos.

Os dados obtidos para cada um dos cinco genes estão apresentados nas Figuras 25 a 29. Foi observado aumento da expressão dos genes ALS1 e ALS4 após 15 minutos de exposição, enquanto que o ALS5 teve sua expressão aumentada após 30 minutos de incubação com macrófagos. Os genes ALS2 e ALS3, quando incubados com macrófagos, apresentaram diminuição na expressão nos 15 minutos iniciais.

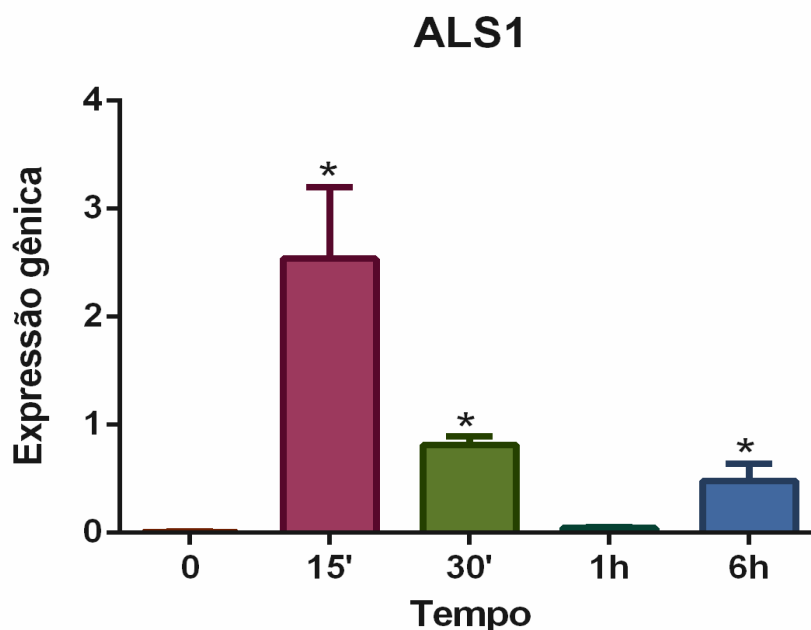


Figura 25. Expressão do gene ALS1-like de *C. parapsilosis* durante a fagocitose por macrófagos. Foi observado aumento de expressão gênica nos tempos 15 min, 30 min e 6 horas, quando comparada com a do controle (tempo 0 min).

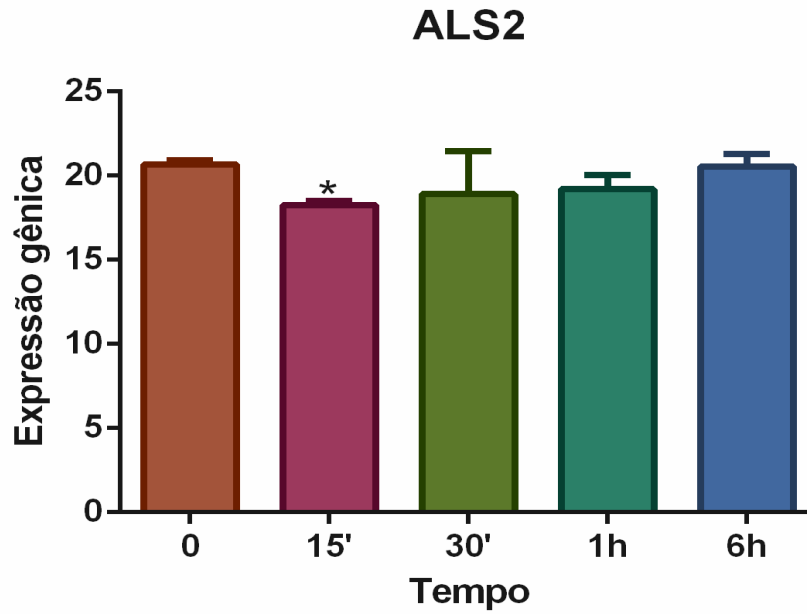


Figura 26. Expressão do gene ALS2-like de *C. parapsilosis* durante a fagocitose por macrófagos. Foi observada diminuição de expressão gênica no tempo 15 min, quando comparada com a do controle (tempo 0 min).

1

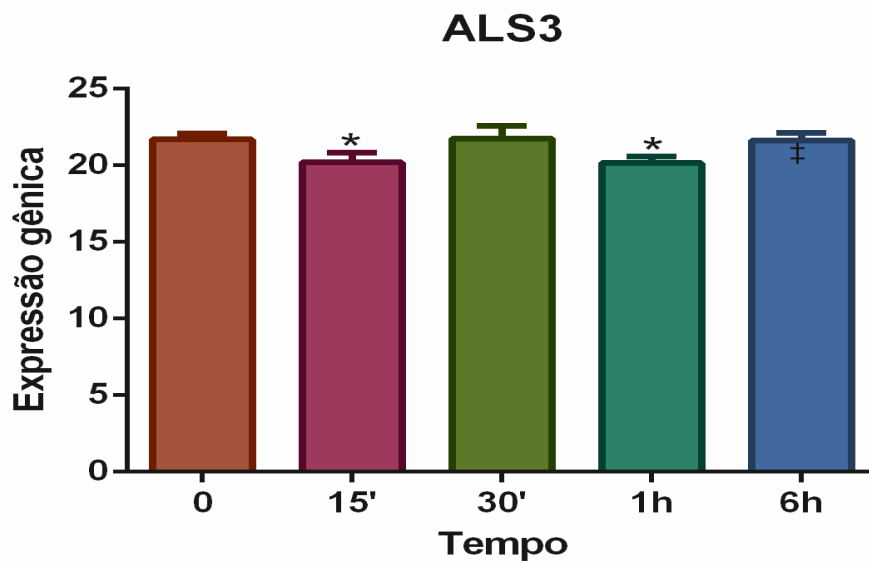


Figura 27. Expressão do gene ALS3-like de *C. parapsilosis* durante a fagocitose por macrófagos. Foi observada diminuição de expressão gênica nos tempos 15 min e 1 hora, quando comparada com a do controle (tempo 0 min).

2

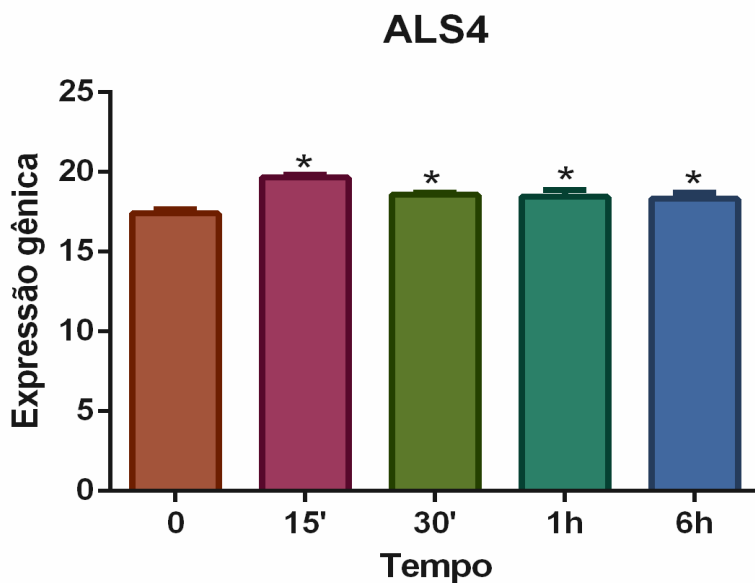


Figura 28. Expressão do gene ALS4-like de *C. parapsilosis* durante a fagocitose por macrófagos. Foi observado aumento de expressão gênica nos tempos 15 min, 30 min, 1 hora e 6 horas, quando comparada com a do controle (tempo 0 min).

1

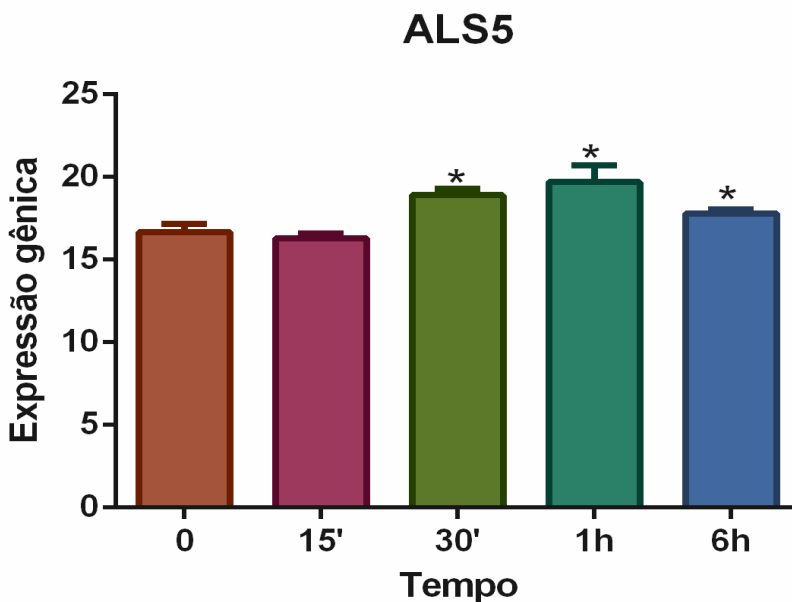


Figura 29. Expressão do gene ALS5-like de *C. parapsilosis* durante a fagocitose por macrófagos. Foi observado aumento de expressão gênica nos tempos 30 min, 1 hora e 6 horas, quando comparada com a do controle (tempo 0 min).

2

1

2

4.3.2.3 Detecção dos genes ALS em isolados clínicos

3

4 Tendo em vista a ausência de alguns dos genes ALS-like na cepa GA1
5 de *C. parapsilosis*, reações de PCR para amplificação integral dos cinco genes da
6 família foram realizadas (Figura 30). Foram avaliadas 81 amostras de *C.*
7 *parapsilosis* e os dados obtidos estão apresentados na tabela 14. A não
8 observância de banda de amplificação, não significa apenas ausência do gene,
9 mas também que os primers desenhados não anelaram devido a algum
10 polimorfismo de sequência ou que o gene não esteja completo, isto é, apenas
11 fragmentos do gene podem estar presentes numa determinada amostra.

11

12

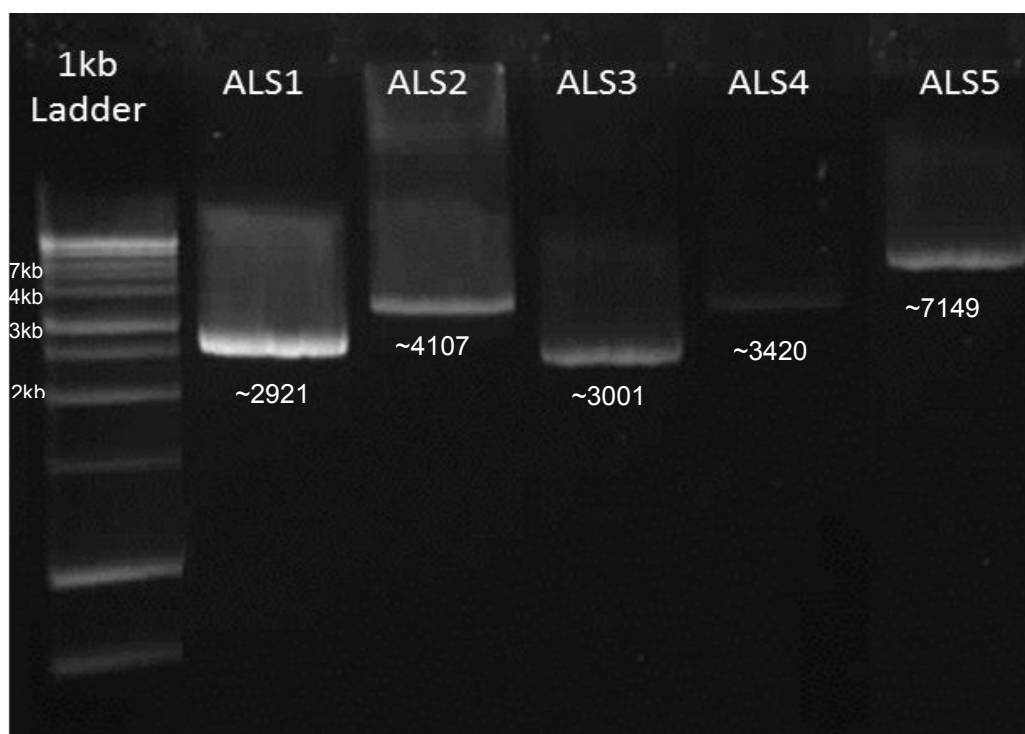


Figura 30. Amplificação dos genes ALS-like de *C. parapsilosis*. PCR para amplificação dos genes ALS-like de *C. parapsilosis* da cepa controle ATCC 22019. Marcador 1kb (Promega).

13

Tabela 14. Gens ALS-like de *C. parapsilosis*. PCR para detecção dos genes da família ALS-like em 81 amostras de *C. parapsilosis* isoladas de hemocultura, HC-FMB.

Gene	<i>C. parapsilosis</i>^a	n (%)	pb^b
ALS1	CPAG_00368	35 (43,2)	2921
ALS2	CPAG_05056	78 (96,3)	4107
ALS3	CPAG_05314	72 (88,9)	3001
ALS4	CPAG_00369	66 (81,5)	3420
ALS5	CPAG_05054	26 (32,1)	7149

^areferência nos bancos de dados de *C. parapsilosis*; ^bpb: número de pares de base; tamanho da banda observada.

1

2

5. DISCUSSÃO

1
2
3 A frequência das infecções causadas por leveduras, em especial pelas
4 espécies de *Candida*, tem aumentado substancialmente nos últimos anos
5 (HAJJEH et al., 2004; PFALLER & DIEKEMA, 2007). Embora *C. albicans* ainda
6 apresente alta frequência causando infecções, outras espécies de *Candida* estão
7 emergindo, e em algumas casuísticas as espécies não-*albicans* são isoladas com
8 maior frequência (COLOMBO et al., 2006; SHIVAPRAKASHA et al., 2007;
9 COSTA-DE-OLIVEIRA et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2008; KERSUN et al.,
10 2008; MONTAGNA et al., 2010; CELEBI et al., 2012). No presente estudo, a
11 frequência de *C. albicans* variou de 39,3 a 44,4%, dependendo do método de
12 identificação empregado, e foi inferior ao conjunto de *C. não-albicans*, onde *C.*
13 *parapsilosis* foi espécie mais frequente, com 33,2 a 42,3% de isolados, também
14 dependendo do método de identificação. A alta frequência de espécies de *C. não-*
15 *albicans*, em especial *C. parapsilosis*, em relação a *C. albicans*, em isolados de
16 hemoculturas, já havia sido observada em outras casuísticas brasileiras (RUIZ et
17 al. 2005; COLOMBO et al., 2006; MEDRANO et al. 2006; PASSOS et al., 2007;).
18 A razão pela qual essa espécie tem se destacado ainda não está completamente
19 entendida. *C. parapsilosis* é parte da microbiota da pele humana e já foi possível
20 o isolamento dessa espécie das mãos de profissionais da saúde (VAN ASBECK
21 et al., 2007; TROFA et al., 2008), os quais foram identificados como vetores para
22 aquisição de infecção por esta espécie (TROFA et al., 2008). *C. parapsilosis* pode
23 apresentar importantes fatores de virulência como facilidade de adesão às células
24 do hospedeiro, capacidade de produção de biofilme e produção de enzimas
25 hidrolíticas (BRANCHINI et al., 1994; TROFA et al., 2008), além de habilidade de

1 crescimento em solução de alimentação parenteral e afinidade por dispositivos
2 intravasculares e materiais protéticos (CLARK et al., 2004; TROFA et al., 2008). A
3 adoção de “boas práticas” de controle, com adequada anti-sepsia das mãos de
4 profissionais da saúde, bem como a desinfecção dos dispositivos médicos, em
5 especial os cateteres, poderão minimizar substancialmente os casos de infecção
6 por *C. parapsilosis*.

7 A alteração na epidemiologia das infecções por *Candida* spp.,
8 caracterizada pelo predomínio das espécies não-*albicans* sobre a espécie *C.*
9 *albicans* (DIEKEMA et al., 2012), enfatiza a necessidade de melhor
10 caracterização dos isolados, uma vez que diferentes espécies podem apresentar
11 diferentes perfis de susceptibilidade a drogas e evolução clínica. Nos laboratórios
12 clínicos, a identificação em nível de espécie vem se tornando cada vez mais
13 importante. O isolamento e identificação morfo-fisiológica, embora ainda sejam
14 considerados como método de referência, é laborioso e necessita de maior
15 tempo, tornando difícil o tratamento empírico adequado, especialmente para os
16 casos de infecções invasivas. Sistemas automatizados, para identificação e testes
17 de susceptibilidade, vêm sendo amplamente empregados em laboratórios clínicos
18 visando agilidade na caracterização. Com o advento da biologia molecular,
19 técnicas de identificação baseadas no DNA foram desenvolvidas e vêm sendo
20 empregadas tanto na pesquisa como para o diagnóstico de infecções. A técnica
21 molecular mais utilizada para identificação de fungos, principalmente leveduras do
22 gênero *Candida* spp., consiste na amplificação e sequenciamento de regiões de
23 rDNA, como as regiões ITS (CLSI, MM18-A). Embora essa técnica já tenha sido
24 padronizada para uso em laboratórios de rotina microbiológica, os custos ainda
25 são altos, considerando que além da aquisição e manutenção dos equipamentos,

1 há também a necessidade de profissionais capacitados com domínio da técnica e
2 também de microbiologia clássica, para interpretação dos resultados obtidos. No
3 presente trabalho, foram comparados três diferentes métodos de identificação, o
4 método automatizado, o método clássico de referência (morfo-fisiológico) e o
5 método molecular. O método molecular foi capaz de detectar o maior número de
6 espécies, inclusive discriminar as espécies crípticas do complexo *C. parapsilosis*.
7 O método morfo-fisiológico, embora com menor poder discriminatório que o
8 molecular, ainda é considerado de referência, uma vez que só com a visualização
9 do isolado pode-se melhor analisá-lo, avaliando suas características e garantindo
10 a pureza da cultura, essencial para obtenção de resultados fidedignos.
11 Considerando que houve uma boa concordância entre os métodos (>80%), a
12 utilização do método automatizado em laboratórios de rotina, principalmente com
13 grande volume de exames, deve ser considerado uma ferramenta importante,
14 uma vez que o processo de identificação pode ser realizado em menor tempo e
15 com boa sensibilidade discriminatória quando comparado aos outros métodos.
16 Porém, vale enfatizar a necessidade de profissionais bem treinados, com
17 conhecimento e capacidade de discernimento para os casos em que há
18 necessidade de lançar mão de técnicas tradicionais e/ou recorrer a técnicas
19 moleculares para melhor “resolução” da espécie em questão.

20 Nas últimas décadas, simultaneamente ao aumento do número de
21 infecções por *Candida* spp., aumentou também o volume de pesquisas para
22 melhor compreensão da biologia desse micro-organismo. A produção de biofilme
23 é uma característica importante desse micro-organismo, que pode trazer
24 malefícios não apenas na área médica, como também prejuízos nas indústrias do
25 ramo alimentício, estações de tratamento de água, e etc. A fim de garantir

1 tratamento eficiente para pacientes, o perfil de cada espécie capaz de causar
2 infecção deve ser levado em consideração, tornando o conhecimento das
3 principais características de cada micro-organismo um recurso importante no
4 direcionamento do tratamento. Neste trabalho, a produção de biofilme foi avaliada
5 com o objetivo de melhor conhecimento do perfil dos isolados mais frequentes no
6 HC/FMB. Embora existam diferentes metodologias para avaliar a produção de
7 biofilme por *Candida* spp., publicações recentes têm relatado técnicas que
8 envolvem além da quantificação do biofilme presente no substrato, a visualização
9 por técnicas de microscopia. No presente estudo, o biofilme produzido por cada
10 isolado foi quantificado e alguns também foram submetidos à microscopia de
11 fluorescência e microscopia eletrônica de varredura. Já foi reportado que isolados
12 de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* sejam menos produtores de biofilme que a
13 espécie mais patogênica *C. albicans* (HAWSER & DOUGLAS,1994), entretanto,
14 no presente estudo não foi observada diferença significativa quanto à produção
15 de biofilme entre diferentes espécies, quando comparadas entre si. E embora,
16 tenham sido observados maiores valores de DO nos isolados de *C. orthopsilosis*,
17 o número de isolados é muito baixo e pode não ser representativo. Na
18 visualização por microscopia de fluorescência, as amostras com maiores valores
19 de DO apresentaram-se como uma massa confluenta, e as com valores menores
20 apresentaram-se como células dispersas, independente da espécie avaliada. Na
21 microscopia eletrônica de varredura, também independente da espécie analisada,
22 amostras com maiores valores de DO apresentaram estruturas não-celulares
23 aderidas a células, possivelmente matriz polimérica extracelular. A utilização de
24 imagens como complemento à técnica de quantificação da produção de biofilme é

1 uma ferramenta extra que permite a visualização do que está sendo quantificado
2 e garante a confiabilidade no método.

3 Muitos pesquisadores consideram o uso de drogas antifúngicas, como o
4 fluconazol, como importante fator na alteração da epidemiologia das infecções por
5 *Candida* spp., justificando o fato de que em muitos países, principalmente nos
6 Estados Unidos, a espécie não-*albicans* mais frequente é a *C. glabrata*, que pode
7 apresentar sensibilidade reduzida a esta droga, e até mesmo *C. krusei*, a qual é
8 intrinsecamente resistente ao fluconazol (BEN-AMI et al., 2012; DIEKEMA et al.,
9 2012; YADAV et al., 2012; ARENDRUP et al., 2013; MORETTI et al., 2013). Os
10 isolados analisados neste estudo, não apresentaram resistência frente às drogas
11 antifúngicas avaliadas, com exceção da anfotericina B. Os isolados resistentes a
12 anfotericina B apresentaram MIC = 2µg/ml. O CLSI não estipula o ponto de corte
13 para resistência frente à anfotericina B, para tal foi considerado resistente os
14 isolados que apresentassem MIC ≥2µg/ml (NGUYEN et al., 1998). Resistência a
15 anfotericina B também já foi reportada em outros centros hospitalares (HULL et
16 al., 2012; JUNG et al., 2012; ERICSSON et al., 2013, YANG et al., 2013).

17 Além da identificação da espécie, a tipagem molecular é uma ferramenta
18 considerada bastante eficaz na identificação de surtos. Atualmente, técnicas
19 moleculares para tipagem de micro-organismos vêm ganhando destaque na
20 literatura, principalmente devido à publicação, e consequente disponibilidade, de
21 sequências dos genomas completos. As espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*
22 apresentam uma peculiaridade em relação às demais: a presença dos Introns do
23 grupo I. Os introns do grupo I são elementos móveis que podem estar inseridos
24 no rDNA e consequentemente interferir nos padrões de banda quando da
25 amplificação desse fragmento. Existem três diferentes genótipos de *C. albicans*, o

1 A, o B e o C, além da espécie críptica *C. dubliniensis*, que antigamente era
2 considerada o genótipo D de *C. albicans*. A presença desses introns na região
3 26S de rDNA apresenta-se de maneira diferente em cada um dos genótipos, o
4 que torna a detecção desse elemento, o Intron do grupo I, uma ferramenta rápida
5 de caracterização do genótipo em questão. No presente estudo, dentre as 77
6 amostras de *C. albicans* analisadas, observou-se um predomínio do genótipo A
7 (74%), que foi detectado pela ausência do Intron do grupo I, seguido do genótipo
8 B (19,5%), com o intron presente em homozigose e genótipo C (6,5%), o qual
9 apresenta o intron inserido em apenas um dos alelos – em heterozigose. Não
10 houve ocorrência de *C. dubliniensis*. Tamura et al. (2001) avaliaram 301 isolados
11 e encontraram frequência similar, com predomínio do genótipo A, seguido do
12 genótipo B e depois C, além de 5 isolados de *C. dubliniensis* e dois isolados com
13 padrões diferentes, produto de 1400pb, os quais denominaram como *C. albicans*
14 genótipo E. Este último parece ser exclusivo do Japão, onde o trabalho foi
15 realizado, pois até o presente, o genótipo E não foi detectado em outras
16 casuísticas (DISNEY et al., 2004; KARAHAN et al., 2004; MERCURE et al., 1993;
17 ZHANG & LEIBOWITZ, 2001). Alguns estudos avaliaram a relação entre a
18 presença dos Introns do grupo I e susceptibilidade a droga antifúngica flucitosina,
19 tendo sido observado que *C. albicans* do genótipo B e genótipo C são mais
20 sensíveis em relação ao genótipo A (STEVENS et al., 1990; MERCURE et al.,
21 1993; MCCOULLOGH et al. 1999). Considerando a rápida execução e facilidade
22 na interpretação dos resultados, a detecção de Introns do grupo I apresenta-se
23 como uma alternativa viável para avaliação dos casos suspeitos de surto, onde a
24 tipagem do micro-organismo se faz necessária.

1 A publicação da sequência do genoma de algumas das espécies de
2 *Candida* spp. possibilitou o conhecimento, ou um melhor entendimento, de
3 diversos fenômenos importantes da biologia desses micro-organismos. As
4 principais espécies do gênero *Candida* já foram completamente sequenciadas: *C.*
5 *albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e sua espécie críptica *C. orthopsilosis*, e, as
6 haplóides, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (JONES et al., 2004; VAN
7 HET HOOG et al., 2007; BUTLER et al., 2009; RICCOMBENI et al., 2012). Muitos
8 genes estão envolvidos em fenômenos como: resistência a drogas - genes ERG3
9 de resistência ao fluconazol (VALE-SILVA et al., 2012); alteração de aspecto da
10 colônia – switch branco-opaco de *C. albicans* (RAMÍREZ-ZAVALA et al., 2008);
11 nas vias de síntese de ácidos graxos de *C. parapsilosis* – genes LIP, FAS e OLE
12 (GÁCSEK et al., 2007b; NGUYEN et al., 2011; NGUYEN et al., 2012).

13 Em muitos casos, os processos necessários para a geração de um
14 fenótipo apresentam o envolvimento de mais de um gene ou família de genes,
15 como é o caso dos genes ALS de *C. albicans* (HOYER et al., 2001). O
16 envolvimento dos genes da família ALS no processo de formação do biofilme de
17 *C. albicans*, ainda não está completamente esclarecido (HOYER et al., 1995;
18 HOYER et al., 1998a,b; NAILIS et al., 2009; LIU et al., 2011). No presente estudo,
19 o perfil de polimorfismos de tamanho, indicados pelo número de cópias de *motifs*
20 na região do domínio central de cada gene, foi analisado quanto à sua
21 associação com a capacidade de produzir biofilme pelos isolados de *C. albicans*.
22 O gene ALS1 apresentou uma variação de quatro a 24 *motifs* por alelo e não foi
23 observada relação entre do número de *motifs* e a produção de biofilme. Já para o
24 gene ALS3, o número de *motifs* por alelo variou de sete a 19 e pode-se observar
25 uma relação entre o número de *motifs* e a produção de biofilme. Portanto, os

1 polimorfismos de tamanho (número de cópias) da região do domínio central do
2 gene ALS3 de *C. albicans*, detectados pelo número de *motifs*, podem estar
3 relacionados à produção de biofilme. Outro gene, o HWP1, foi sugerido ter sua
4 proteína “associada” a proteína als3, por similaridade aos genes MATa e MAT α
5 de *S. cerevisiae*, complementando o biofilme dessa espécie (DANIELS et al.,
6 2003; NAS et al., 2008; SOLL, 2008; KHODAVANDI et al., 2011). Na presente
7 casuística, o gene HWP1 pode ser amplificado em todos os isolados de *C.*
8 *albicans* e não foram detectados polimorfismos de tamanho desse gene.

9 A espécie *C. parapsilosis* era dividida em três grupos (I, II e III), com base
10 nas diferenças do DNA amplificado randomicamente (RAPD) e na sequência de
11 alguns genes (LEHMANN et al., 1992; CASSONE, et al. 1995; LIN et al., 1995;
12 ROY & MEYER, 1998; KATO et al., 2001). Em 2005, Tavanti et al. sugeriram que
13 o “complexo *C. parapsilosis*” fosse separado em três espécies distintas: *C.*
14 *parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, e *C. metapsilosis*, descrevendo uma
15 metodologia para discriminação das espécies do complexo de acordo com
16 polimorfismos presentes no gene SADH, pela amplificação do gene e digestão
17 com enzima de restrição. Estudos recentes apontam que essas espécies podem
18 apresentar diferentes perfis de susceptibilidade e virulência, justificando o
19 crescente número de pesquisas sobre a epidemiologia das infecções por esses
20 micro-organismos (GACSER et al., 2007a; GÓMEZ-LÓPEZ et al. 2008,
21 LOCKHART et al., 2008a; VAN ASBECK 2008, VARGA, et al. 2008; SILVA et al.,
22 2009, SZABO, et al. 2009; CANTÓN 2010; CANTÓN 2011). Nos últimos anos,
23 vem sendo relatado um aumento na incidência de infecções por *C. orthopsilosis* e
24 *C. metapsilosis*, que pode depender da região geográfica e do tipo de material
25 avaliado (LOCKHART et al., 2008a). No presente estudo, os isolados do

1 complexo *C. parapsilosis* (n=85) submetidos a restrição do gene SADH revelaram
2 a presença de três isolados da espécie críptica *C. orthopsilosis*. Houve
3 concordância de 92,8% entre as técnicas, com apenas uma amostra discrepante,
4 identificada como *C. orthopsilosis* pelo sequenciamento e *C. parapsilosis* pela
5 reação de digestão do gene SADH. Não foi observado *C. metapsilosis* na
6 presente amostragem. Outros estudos apresentam frequência similar, com
7 predomínio de *C. parapsilosis*, e com frequência bastante reduzida de *C.*
8 *orthopsilosis*, seguida de *C. metapsilosis* (KOCSUBE S., et al. 2007; GÓMEZ-
9 LÓPEZ et al. 2008; LOCKHART et al., 2008a; DIEKEMA et al. 2009;
10 GONCALVES et al. 2010; CANTÓN et al., 2011). Além dos polimorfismos do
11 gene SADH, outros marcadores vêm sendo descritos para a discriminação entre
12 as espécies do complexo (HORKÁ et a., 2012; PRANDINI, THR, dados ainda não
13 publicados), na tentativa de desenvolver uma técnica que seja aplicável nos
14 laboratórios clínicos, isto é, de fácil execução, rápida e com boa sensibilidade.

15 Assim como ocorreu com *C. albicans*, o sequenciamento de *C. parapsilosis*
16 abriu caminhos para melhor entendimento da biologia desse micro-organismo.
17 Hoje se sabe que a produção de biofilme é um fenômeno complexo, que envolve
18 vários genes. Uma vez que os genes da família ALS de *C. albicans*, já foram
19 identificados como importantes codificadores de proteínas para adesão e
20 arquitetura do biofilme, e como genes homólogos a eles foram identificados em *C.*
21 *parapsilosis* (BUTLER et al., 2009), estima-se que a produção de biofilme de *C.*
22 *parapsilosis* também apresente os genes ALS-like envolvidos na formação desse
23 fenômeno. Com base na sequência depositada no banco de dados do Broad
24 Institute, primers foram desenhados para quantificar a expressão desses genes
25 em células do biofilme de *C. parapsilosis*, desse modo foi observado que nem

1 todos os genes ALS-like estão presentes na cepa GA1, mas estão presentes na
2 cepa controle ATCC22019, na qual os cinco genes puderam ser amplificados.
3 Nesta última cepa, os genes ALS1, ALS2 e ALS3-like não apresentaram
4 diferenças relevantes na expressão quando comparados nas condições de
5 biofilme e células planctônicas. Já os genes ALS4 e ALS5-like, apresentaram
6 diminuição na expressão quando em condições de biofilme, comportamento
7 oposto ao esperado.

8 Tendo em vista os resultados de expressão desses genes na condição de
9 biofilme, e considerando que a erradicação das células de *Candida* spp. pelo
10 hospedeiro é amplamente dependente da atividade fungicida de monócitos, como
11 os macrófagos e neutrófilos, questionou-se a importância desses genes durante o
12 processo de infecção. Enquanto os genes ALS1, ALS4 e ALS5-like aumentaram a
13 expressão após o contato com macrófagos, os genes ALS2 e ALS3-like
14 diminuíram a expressão, o que poderia sugerir o possível envolvimento dos genes
15 ALS1, ALS4 e ALS5-like na resistência ao estresse oxidativo, provocado pelas
16 espécies reativas de oxigênio produzidas pelos macrófagos.

17 Considerando que, a cepa controle *C. parapsilosis* ATCC22019 esteja há
18 muitos anos em laboratório, e que a virulência pode ter sido perdida ou
19 descaracterizada (CLSI, M27-A2), e que algumas cepas não apresentam todos os
20 genes ALS (dados ainda não publicados - Toni Gabaldon, PhD, Comparative
21 Genomics Group, CRG-Centre for Genomic Regulation, Barcelona, Espanha), foi
22 necessário iniciar estudos para detecção dos genes da família ALS-like nos
23 isolados de *C. parapsilosis* da presente amostragem. E para melhor
24 entendimento, tentou-se amplificar por completo os 5 genes da família ALS-like,
25 sendo possível a detecção em apenas uma parte dos isolados. A não observância

- 1 de banda de amplificação, não significa apenas ausência do gene, mas também
- 2 que os primers desenhados não anelaram devido a algum polimorfismo de
- 3 sequência ou que o gene não esteja completo, isto é, apenas fragmentos do gene
- 4 podem estar presentes numa determinada amostra.

6. CONCLUSÕES

✓ Os métodos de identificação tradicional, automatizado e molecular apresentam boa correlação entre si, porém o método molecular apresenta maior capacidade de discriminação das espécies, incluindo as do grupo *psilosis*.

✓ O emprego do meio cromogênico, em conjunto com qualquer que seja a metodologia de identificação escolhida, é uma ferramenta útil para validação da identificação das espécies mais frequentes.

✓ A espécie *C. parapsilosis* apresentou frequência alterada de acordo com a metodologia empregada na identificação, é predominante em relação às demais espécies do complexo, e é o principal agente causador de infecções invasivas em pacientes do HC-FMB/UNESP.

✓ A caracterização do padrão de Introns do grupo I em isolados de *C. albicans* pode ser uma ferramenta útil e viável na detecção preliminar de surtos causados por esta espécie.

✓ Diversos fatores devem ser considerados na escolha da metodologia a ser empregada para a identificação em nível de espécie de leveduras do gênero *Candida*, ressaltando que nenhuma metodologia é capaz de substituir um profissional capacitado.

1 ✓ Todas as espécies podem apresentar isolados bons produtores de
2 biofilme e também isolados pouco ou não produtores de biofilme.

3

4 ✓ De modo geral, as drogas antifúngicas avaliadas (fluconazol,
5 voriconazol, anidulafungina e anfotericina B) exercem boa atividade sobre os
6 isolados de leveduras do gênero *Candida* obtidos de hemoculturas do HC-
7 FMB/UNESP.

8

9 ✓ Polimorfismos do gene ALS3 de *C. albicans* podem estar
10 relacionados à produção de biofilme nesta espécie.

11

12 ✓ Os genes ALS-like podem não estar presentes em todos os isolados
13 de *C. parapsilosis*, e sugere-se que estejam envolvidos nos processos de
14 fagocitose por macrófagos e não na produção de biofilme.

15

1 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

2
3 **Adler-Moore JP, Proffitt RT.** Amphotericin B lipid preparations: what are
4 the differences?. *Clin Microbiol Infect.* 2008 May;14 Suppl 4:25-36. doi:
5 10.1111/j.1469-0691.2008.01979.x.

6 **Albuquerque P, Casadevall A.** Quorum sensing in fungi--a review. *Med*
7 *Mycol.* 2012 May;50(4):337-45. doi: 10.3109/13693786.2011.652201

8 **Arendrup MC, Denning DW, Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH.** Does one
9 voriconazole breakpoint suit all *Candida* species? *J Clin Microbiol.* 2007
10 Jun;45(6):2093.

11 **Arendrup MC, Dzajic E, Jensen RH, Johansen HK, Kjaeldgaard P,**
12 **Knudsen JD, Kristensen L, Leitz C, Lemming LE, Nielsen L, Olesen B,**
13 **Rosenvinge FS, Røder BL, Schönheyder HC.** Epidemiological changes with
14 potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia:
15 data from a nationwide fungaemia surveillance programme. *Clin Microbiol Infect.*
16 2013 Apr 22. doi: 10.1111/1469-0691.12212

17 **Asmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Agnarsson BA, Gottfredsson M.**
18 The importance of strain variation in virulence of *Candida dubliniensis* and
19 *Candida albicans*: results of a blinded histopathological study of invasive
20 candidiasis. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Jun;15(6):576-85. doi: 10.1111/j.1469-
21 0691.2009.02840.x.

22 **Baillie GS, Douglas LJ.** Effect of growth rate on resistance of *Candida*
23 *albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998
24 Aug;42(8):1900-5.

1 **Baillie GS, Douglas LJ.** Matrix polymers of *Candida* biofilms and their
2 possible role in biofilm resistance to antifungal agents. J Antimicrob Chemother.
3 2000 Sep;46(3):397-403.

4 **Baixench MT, Aoun N, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Bretagne**
5 **S, Ramires S, Piketty C, Dannaoui E.** Acquired resistance to echinocandins in
6 *Candida albicans*: case report and review. J Antimicrob Chemother. 2007
7 Jun;59(6):1076-83.

8 **Basim E., Basim H.** "Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique
9 and its use in molecular biology." Turk J Biol. 2001; 405-18.

10 **Ben-Ami R, Rahav G, Elinav H, Kassis I, Shalit I, Gottesman T, Megged**
11 **O, Weinberger M, Ciobotaro P, Shitrit P, Weber G, Paz A, Miron D, Oren I,**
12 **Bishara J, Block C, Keller N, Kontoyiannis DP, Giladi M; for the Israeli**
13 **Candidaemia Study Group.** Distribution of fluconazole-resistant *Candida*
14 bloodstream isolates among hospitals and inpatient services in Israel. Clin
15 Microbiol Infect. 2012 Aug 30. doi: 10.1111/1469-0691.12004.

16 **Blankenship JR, Mitchell AP.** How to build a biofilm: a fungal perspective.
17 Curr Opin Microbiol. 2006 Dec;9(6):588-94.

18 **Borg-von Zepelin M, Kunz L, Rüchel R, Reichard U, Weig M, Gross U.**
19 Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal
20 agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004
21 to August 2005. J Antimicrob Chemother. 2007 Aug;60(2):424-8.

22 **Borg-von Zepelin M.** The epidemiology of *Candida* infections in Göttingen
23 and Germany. Mycoses. 2008 Sep;51 Suppl 3:17-9. doi: 10.1111/j.1439-
24 0507.2008.01580.x.

1 **Brajtburg J, Bolard J.** Carrier Effects on Biological Activity of Amphotericin
2 B. Clin Microbiol Rev. 1996 Oct;9(4):512-31.

3 **Branchini MLM, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Iseberg**
4 **HD.** Genotypic variation and smile production among blood and catheter isolates
5 of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 1994 Feb;32(2):452-6.

6 **Braun BR, van Het Hoog M, d'Enfert C, Martchenko M, Dungan J, Kuo**
7 **A, Inglis DO, Uhl MA, Hogues H, Berriman M, Lorenz M, Levitin A, Oberholzer**
8 **U, Bachewich C, Harcus D, Marcil A, Dignard D, Iouk T, Zito R, Frangeul L,**
9 **Tekaia F, Rutherford K, Wang E, Munro CA, Bates S, Gow NA, Hoyer LL,**
10 **Köhler G, Morschhäuser J, Newport G, Znaidi S, Raymond M, Turcotte B,**
11 **Sherlock G, Costanzo M, Ihmels J, Berman J, Sanglard D, Agabian N,**
12 **Mitchell AP, Johnson AD, Whiteway M, Nantel A.** A human-curated annotation
13 of the *Candida albicans* genome. PLoS Genet. 2005 Jul;1(1):36-57

14 **Brito Gamboa A, Mendoza M, Fernández A, Díaz E.** Detection of
15 *Candida dubliniensis* in patients with candidiasis in Caracas, Venezuela. Rev
16 Iberoam Micol. 2006 Jun;23(2):81-4.

17 **Bruder-Nascimento A, Camargo CH, Sugizaki MF, Sadatsune T,**
18 **Montelli AC, Mondelli AL, Bagagli E.** Species distribution and susceptibility
19 profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. BMC Res Notes.
20 2010 Jan 3;3:1. doi: 10.1186/1756-0500-3-1.

21 **Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro**
22 **CA, Rheinbay E, Grabherr M, Forche A, Reedy JL, Agrafioti I, Arnaud MB,**
23 **Bates S, Brown AJ, Brunke S, Costanzo MC, Fitzpatrick DA, de Groot PW,**
24 **Harris D, Hoyer LL, Hube B, Klis FM, Kodira C, Lennard N, Logue ME, Martin**
25 **R, Neiman AM, Nikolaou E, Quail MA, Quinn J, Santos MC, Schmitzberger**

1 **FF, Sherlock G, Shah P, Silverstein KA, Skrzypek MS, Soll D, Staggs R,**
2 **Stansfield I, Stumpf MP, Sudbery PE, Srikantha T, Zeng Q, Berman J,**
3 **Berriman M, Heitman J, Gow NA, Lorenz MC, Birren BW, Kellis M, Cuomo**
4 **CA.** Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes.
5 Nature. 2009 Jun 4;459(7247):657-62. doi: 10.1038/nature08064

6 **Calderone RA, Braun PC.** Adherence and receptor relationships of
7 *Candida albicans*. Microbiol Rev. 1991 Mar;55(1):1-20.

8 **Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J, del Castillo L.** In vitro fungicidal
9 activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C.*
10 *parapsilosis* evaluated by time-kill studies. Antimicrob Agents Chemother. 2010
11 May;54(5):2194-7. doi: 10.1128/AAC.01538-09

12 **Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M,**
13 **Merino P, Campos-Herrero I, Marco F, de la Pedrosa EG, Yagüe G, Guna R,**
14 **Rubio C, Miranda C, Pazos C, Velasco D; FUNGEMYCA Study Group.**
15 Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and
16 antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and
17 *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. Antimicrob Agents
18 Chemother. 2011 Dec;55(12):5590-6. doi: 10.1128/AAC.00466-11.

19 **Cassone A, De Bernardis F, Pontieri E, Carruba G, Girmenia C,**
20 **Martino P, Fernández-Rodríguez M, Quindós G, Pontón J.** Biotype diversity of
21 *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental
22 pathogenicity. J Infect Dis. 1995 Apr;171(4):967-75.

23 **Cataldo MA, Petrosillo N.** Economic considerations of antifungal
24 prophylaxis in patients undergoing surgical procedures. Ther Clin Risk Manag.
25 2011 Jan;13(7):13-20. doi: 10.2147/TCRM.S11895

- 1 **Cech TR.** Self-splice group I introns. *Annu Rev Biochem.* 1990;59:543-68.
- 2 **Celebi S, Hacimustafaoglu M, Koksall N, Ozkan H, Cetinkaya M, Ener B.**
- 3 Neonatal candidiasis: results of an 8 year study. *Pediatr Int.* 2012 Jun;54(3):341-9.
- 4 doi: 10.1111/j.1442-200X.2012.03574.x.
- 5 **Champe PC, Harvey RA, Fisher BD.** *Microbiologia ilustrada. 2. ed. São*
- 6 *Paulo: Artmed, 2008. 436 p.*
- 7 **Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick**
- 8 **T, Ghannoum MA.** Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*:
- 9 development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001
- 10 Sep;183(18):5385-94.
- 11 **Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA.** In vitro growth and analysis of
- 12 *Candida* biofilms. *Nat Protoc.* 2008;3(12):1909-24. doi: 10.1038/nprot.2008.192.
- 13 **Chaves GM, Diniz MG, da Silva-Rocha WP, de Souza LB, Gondim LA,**
- 14 **Ferreira MA, Svidzinski TI, Milan EP.** Species Distribution and Virulence Factors
- 15 of *Candida* spp. Isolated from the Oral Cavity of Kidney Transplant Recipients in
- 16 Brazil. *Mycopathologia.* 2013 Apr;175(3-4):255-63. doi: 10.1007/s11046-013-
- 17 9640-5
- 18 **Cho Y, Qiu YL, Kuhlman P, Palmer JD.** Explosive invasion of plant
- 19 mitochondria by a group I intron. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov
- 20 24;95(24):14244-9.
- 21 **Citiulo F, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ.** Purification and
- 22 germination of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* chlamydospores
- 23 cultured in liquid media. *FEMS Yeast Res.* 2009 Oct;9(7):1051-60. doi:
- 24 10.1111/j.1567-1364.2009.00533.x

1 **Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs BA,**
2 **Brandt ME, Webb RM, Currier M, Flowers RH, Fridkin SK, Hajjeh RA.**
3 Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida*
4 *parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. J Clin Microbiol. 2004
5 Oct;42(10):4468-72.

6 **Clinical and Laboratory Standards Institute** 2008. Interpretive criteria for
7 identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing: guideline. CLSI
8 document MM18-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

9 **Clinical and Laboratory Standards Institute** 2008. Reference Method for
10 Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-
11 Third Edition. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute,
12 Wayne, PA.

13 **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2004 Methods for antifungal
14 disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guideline (M44-A). Wayne,
15 PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

16 **Colombo A, Guimarães T.** Epidemiology of hematogenous infections due
17 to *Candida* spp. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(5):599-607.

18 **Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da**
19 **Matta DA, Warnock D, Morgan J; Brazilian Network Candidemia Study.**
20 Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of
21 Candidemia in Eleven Medical Centers. J Clin Microbiol. 2006 Aug;44(8):2816-23.

22 **Cooper CRJr.** 2011. Yeasts pathogenic for humans and animals. In:
23 Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, eds. The Yeasts: A Taxonomic Study. 5th ed.
24 Vol. 1. Amsterdam: Elsevier. pp. 9-19.

1 **Costa-de-Oliveira S, Pina-Vaz C, Mendonça D, Gonçalves Rodrigues**

2 **A.** A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital.

3 Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008 May;27(5):365-74. doi: 10.1007/s10096-007-

4 0448-4

5 **Critchley IA, Douglas LJ.** Differential adhesion of pathogenic *Candida*

6 species to epithelial and inert surfaces. FEMS Microbiol Lett. 1985 Jun 28(2):199-

7 203.

8 **Cuenca-Estrella, M.** Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones

9 sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y

10 resistencias. Rev Esp Quimioter. 2010 Dec;23(4):169-76.

11 **Daniels KJ, Lockhart SR, Staab JF, Sundstrom P, Soll DR.** The adhesin

12 Hwp1 and the first daughter cell localize to the a/a portion of the conjugation

13 bridge during *Candida albicans* mating. Mol Biol Cell. 2003 Dec;14(12):4920-30

14 **Daniels KJ, Srikantha T, Lockhart SR, Pujol C, Soll DR.** Opaque cells

15 signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*. EMBO J. 2006 May

16 17;25(10):2240-52.

17 **De Hoog GS, Guarro J, Figueras MJ, Gené J. (2000) Atlas of Clinical**

18 **Fungi. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The**

19 **Netherlands and Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain, 1124 pp.**

20 **De Repentigny L, Aumont F, Bernard K, Belhumeur P.** Characterization

21 of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence

22 to mucosal epithelial cells. Infect Immun. 2000 Jun;68(6):3172-9.

23 **Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M.** The changing

24 epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. Diagn

1 Microbiol Infect Dis. 2012 May;73(1):45-8. doi:
2 10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.001

3 **Diekema DJ, Messer SA, Boyken LB, Hollis RJ, Kroeger J, Tendolkar**
4 **S, Pfaller MA.** In vitro activity of seven systemically active antifungal agents
5 against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI
6 broth microdilution methods. J Clin Microbiol. 2009 Oct;47(10):3170-7. doi:
7 10.1128/JCM.00942-09.

8 **Ding C, Butler G.** Development of a gene knockout system in *Candida*
9 *parapsilosis* reveals a conserved role for BCR1 in biofilm formation. Eukaryot
10 Cell. 2007 Aug;6(8):1310-9.

11 **Disney MD, Childs JL, Turner DH.** New approaches to targeting RNA with
12 oligonucleotides: inhibition of group I intron self-splicing. Biopolymers. 2004
13 Jan;73(1):151-61.

14 **Dóczy I, Dósa E, Varga J, Antal Z, Kredics L, Nagy E.** Etest for assessing
15 the susceptibility of filamentous fungi. Acta Microbiol Immunol Hung.
16 2004;51(3):271-81.

17 **Donlan RM, Costerton JW.** Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically
18 Relevant Microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002 Apr;15(2):167-93.

19 **Donlan RM.** Biofilm formations: a clinically relevant microbiological
20 process. Clin Infect Dis. 2001 Oct 15;33(8):1387-92.

21 **Douglas LJ.** *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol.
22 2003 Jan;11(1):30-6.

23 **Dupont, B.** Overview of the lipid formulations of amphotericin B. J
24 Antimicrob Chemother. 2002 Feb;49 Suppl 1:31-6.

1 **Eerenstein SEJ, Grolman W, Schouwenburg PF.** Microbial colonization
2 of silicone voice prostheses used in laryngectomized patients. Clin Otolaryngol
3 Allied Sci. 1999 Sep;24(5):398-403.

4 **Egger KN.** Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities.
5 Canadian Journal of Botany, 1995, 73(S1): 1415-1422.

6 **Eggimann P, Garbino J, Pittet D.** Epidemiology of *Candida* species
7 infections in critically ill non-immunosuppressed patients. Lancet Infect Dis. 2003
8 Nov;3(11):685-702.

9 **Ericsson J, Chryssanthou E, Klingspor L, Johansson AG, Ljungman**
10 **P, Svensson E, Sjölin J.** Candidaemia in Sweden: a nationwide prospective
11 observational survey. Clin Microbiol Infect. 2013 Apr;19(4):E218-21. doi:
12 10.1111/1469-0691.12111

13 **Erlich HAG, Saiki RK.** Specific DNA amplification. Nature 1988 Feb;331:
14 461-62. doi:10.1038/331461a0

15 **Farooqi JQ, Jabeen K, Saeed N, Iqbal N, Malik B, Lockhart SR, Zafar A,**
16 **Brandt ME, Hasan R.** Invasive candidiasis in Pakistan: clinical characteristics,
17 species distribution and antifungal susceptibility. J Med Microbiol. 2013 Feb;62(Pt
18 2):259-68. doi: 10.1099/jmm.0.048785-0.

19 **Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD.** *Candida glabrata*: Review of
20 Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C.*
21 *albicans*. Clin Microbiol Rev. 1999 Jan;12(1):80-96.

22 **Finkel JS, Mitchell AP.** Genetic control of *Candida albicans* biofilm
23 development. Nat Rev Microbiol. 2011 Feb;9(2):109-18. doi: 10.1038/nrmicro2475

24 **Fleischmann J, Sripuntanagoon EM.** Pellicle associated adherence film
25 above incubation broth surface - an inexpensive adjunct to recognizing *Candida*

1 krusei in the laboratory. BMC Res Notes. 2011 Mar 22;4:74. doi: 10.1186/1756-
2 0500-4-74.

3 **Fridkin SK, Jarvis WR.** Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections.
4 Clin. Clin Microbiol Rev. 1996 Oct;9(4):499-511.

5 **Fu, Y, Ibrahim AS, Sheppard DC, Chen YC, French SW, Cutler JE,**
6 **Filler SG, Edwards JR JE.** *Candida albicans Als1p*: an adhesin that is a
7 downstream effector of the *EFG1* filamentation pathway. Mol Microbiol. 2002
8 Apr;44(1):61-72.

9 **Fundyga RE, Kuykendall RJ, Lee-Yang W, Lott TJ.** Evidence for
10 aneuploidy and recombination in the human commensal yeast *Candida*
11 *parapsilosis*. Infect Genet Evol. 2004 Mar;4(1):37-43.

12 **Gácsér A, Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD .**
13 Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida*
14 *metapsilosis* in reconstituted human tissue models. Fungal Genet Biol. 2007
15 Dec;44(12):1336-41. a

16 **Gácsér A, Trofa D, Schäfer W, Nosanchuk JD.** Targeted gene deletion in
17 *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. J Clin
18 Invest. 2007 Oct;117(10):3049-58.b

19 **Galbán B, Mariscal F.** Epidemiology of candidemia in ICU. Rev Iberoam
20 Micol. 2006 Mar;23(1):12-5.

21 **Garcia-Effron G, Chua DJ, Tomada JR, DiPersio J, Perlin DS,**
22 **Ghannoum M, Bonilla H.** Novel FKS Mutations Associated with Echinocandin
23 Resistance in *Candida* Species. Antimicrob Agents Chemother. 2010
24 May;54(5):2225-7. doi: 10.1128/AAC.00998-09.

1 **Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS.** Correlating Echinocandin MIC and
2 Kinetic Inhibition of fks1 Mutant Glucan Synthases for *Candida albicans*:
3 Implications for Interpretive Breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009
4 Jan;53(1):112-22. doi: 10.1128/AAC.01162-08.

5 **Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo JM, d'Enfert C.**
6 *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and
7 stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell.* 2004 Apr;3(2):536-45.

8 **Gardes M, Bruns TD.** ITS primers with enhanced specificity for
9 Basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol*
10 *Ecol.* 1993 Apr;2(2):113-8.

11 **Ghigo JM.** Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm
12 development. *Nature.* 2001 Jul 26;412(6845):442-5.

13 **Gilbert W.** Genes-in-pieces revisited. *Science.* 1985 May
14 17;228(4701):823-4.

15 **Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow**
16 **NA.** *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology.*
17 1998 Apr;144 (Pt 4):829-38.

18 **Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B,**
19 **Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M; Barcelona Candidemia**
20 **Project Study Group.** Prevalence and susceptibility profile of *Candida*
21 *metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based
22 surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008
23 Apr;52(4):1506-9. doi: 10.1128/AAC.01595-07.

24 **Gonçalves SS, Amorim CS, Nucci M, Padovan AC, Briones MR, Melo**
25 **AS, Colombo AL.** Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the

1 *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of
2 Candidaemia in Brazil. Clin Microbiol Infect. 2010 Jul;16(7):885-7. doi:
3 10.1111/j.1469-0691.2009.03020.x.

4 **González GM, Elizondo M, Ayala J.** Trends in species distribution and
5 susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to
6 seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. J
7 Clin Microbiol. 2008 Sep;46(9):2902-5. doi: 10.1128/JCM.00937-08.

8 **Green CB, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum MA, Hoyer**
9 **LL.** RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the
10 reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model
11 biofilms, Microbiology. 2004 Feb;150(Pt 2):267-75.

12 **Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA,**
13 **Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza**
14 **LT, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnock DW.** Incidence of bloodstream
15 infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected
16 from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. J Clin
17 Microbiol. 2004 Apr;42(4):1519-27.

18 **Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P.** Bacterial biofilms: From the
19 natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):95-
20 108.

21 **Hannula J, Saarela M, Alaluusua S, Slots J, Asikainen S.** Phenotypic
22 and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and the United States.
23 Oral Microbiol Immunol. 1997 Dec;12(6):358-65.

24 **Harris L, Rogers SO.** Splicing and evolution of an unusually small group I
25 intron. Curr Genet. 2008 Oct;54(4):213-22. doi: 10.1007/s00294-008-0213-y.

1 **Haugen P, Simon DM, Bhattacharya D.** The natural history of group I
2 introns. *Trends Genet.* 2005 Feb;21(2):111-9.

3 **Hawser SP, Douglas LJ.** Biofilm formation by *Candida* species on the
4 surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun.* 1994 Mar;62(3):915-21..

5 **Henrik-Nilsson R, Tedersoo L, Lindahl BD, Kjøller R, Carlsen T,**
6 **Quince C, Abarenkov K, Pennanen T, Stenlid J, Bruns T, Larsson KH, Kõljalg**
7 **U, Kauserud H.** Towards standardization of the description and publication of
8 next-generation sequencing datasets of fungal communities. *New Phytol.* 2011
9 Jul;191(2):314-8. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03755.x

10 **Hibbett DS, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk P, Nilsson H.** Progress
11 in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal
12 classification of environmental sequences. *Fungal Biol Rev.* 2011 Mar;25(1):38–
13 47.

14 **Horká M, Růžička F, Kubesová A, Němcová E, Slais K.** Separation of
15 phenotypically indistinguishable *Candida* species, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*
16 and *C. parapsilosis*, by capillary electromigration techniques. *J Chromatogr A.*
17 2011 Jun 24;1218(25):3900-7. doi: 10.1016/j.chroma.2011.04.057.

18 **Hoyer LL, Hecht JE.** The ALS5 gene of *Candida albicans* and analysis of
19 the *Als5p* N-terminal domain. *Yeast.* 2001 Jan 15;18(1):49-60.

20 **Hoyer LL, Payne TL, Bell M, Myers AM, Scherer S.** *Candida albicans*
21 ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet.* 1998
22 Jun;33(6):451-9.a

23 **Hoyer LL, Payne TL, Hecht JE.** The ALS2 and ALS4 genes of *Candida*
24 *albicans* and localization of Als proteins to the fungal cell surface. *J Bacteriol.*
25 1998 Oct;180(20):5334-43.b

1 **Hoyer LL, Scherer S, Shatzman AR, Livi GP.** *Candida albicans* ALS1:
2 domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a
3 repeating motif. *Mol Microbiol.* 1995 Jan;15(1):39-54.

4 **Hoyer LL.** The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.*
5 2001 Apr;9(4):176-80.

6 **Huang YC, Lin TY, Leu HS, Peng HL, Wu JH, Chang HY.** Outbreak of
7 *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: clinical implication
8 and genotyping analysis. *Infection.* 1999 Mar-Apr;27(2):97-102.

9 **Hull CM, Bader O, Parker JE, Weig M, Gross U, Warrilow AG, Kelly DE,**
10 **Kelly SL.** Two clinical isolates of *Candida glabrata* exhibiting reduced sensitivity to
11 amphotericin B both harbor mutations in ERG2. *Antimicrob Agents Chemother.*
12 2012 Dec;56(12):6417-21. doi: 10.1128/AAC.01145-12

13 **Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME.** Utilization of the internal transcribed
14 spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal
15 pathogens. *Med Mycol.* 2002 Feb;40(1):87-109.

16 **Jayaguru P, Raghunathan M.** Group I intron renders differential
17 susceptibility of *Candida albicans* to Bleomycin. *Mol Biol Rep.* 2007 Mar;34(1):11-
18 7.

19 **Johnson EM.** Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob*
20 *Chemother.* 2008 Jan;61 Suppl 1:i13-8. doi: 10.1093/jac/dkm427.

21 **Johnston DL, Lewis V, Yanofsky R, Gillmeister B, Ethier MC, Mitchell**
22 **D, Cellot S, Dix D, Portwine C, Price V, Silva M, Zelcer S, Michon B, Bowes L,**
23 **Stobart K, Brossard J, Beyene J, Sung L.** Invasive fungal infections in
24 paediatric acute myeloid leukaemia. *Mycoses.* 2013 Feb 26. doi:
25 10.1111/myc.12063.

1 **Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB,**
2 **Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW, Scherer S.**
3 The diploid genome sequence of *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A.
4 2004 May 11;101(19):7329-34.

5 **Jung SI, Shin JH, Choi HJ, Ju MY, Kim SH, Lee WG, Park YJ, Lee K;**
6 **Korean Study Group for Candidemia.** Antifungal susceptibility to amphotericin
7 B, fluconazole, voriconazole, and flucytosine in *Candida* bloodstream isolates from
8 15 tertiary hospitals in Korea. Ann Lab Med. 2012 Nov;32(6):426-8. doi:
9 10.3343/alm.2012.32.6.426.

10 **Kalkanci A, Kokturk N, Senol E, Acar K, Guzel O, Sancak B, Kustimur**
11 **S, Haznedar R.** Could. *Candida dubliniensis* be involved in lung fungal balls? Rev
12 Iberoam Micol. 2005 Sep;22(3):157-9.

13 **Karahan ZC, Güriz H, Ağırbaşı H, Balaban N, Göçmen JS, Aysev D,**
14 **Akar N.** Genotype distribution of *Candida albicans* isolates by 25S intron analysis
15 with regard to invasiveness. Mycoses. 2004 Dec;47(11-12):465-9.

16 **Kato M, Ozeki M, Kikuchi A, Kanbe T.** Phylogenetic relationship and
17 mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic *Candida*
18 species. Gene. 2001 Jul 11;272(1-2):275-81.

19 **Kersun LS, Reilly AF, Ingram ME, Nicholaou MJ, McGowan KL.**
20 Antifungal susceptibility against yeasts isolated from pediatric oncology patients.
21 Med Mycol. 2008 Jun;46(4):337-43. doi: 10.1080/13693780701874523.

22 **Khodavandi A, Harmal NS, Alizadeh F, Scully OJ, Sidik SM, Othman F,**
23 **Sekawi Z, Ng KP, Chong PP.** Comparison between allicin and fluconazole in
24 *Candida albicans* biofilm inhibition and in suppression of HWP1 gene expression.
25 Phytomedicine. 2011 Dec 15;19(1):56-63. doi: 10.1016/j.phymed.2011.08.060.

1 **Kibbler CC, Seaton S, Barnes RA, Gransden WR, Holliman RE,**
2 **Johnson EM, Perry JD, Sullivan DJ, Wilson JA.** Management and outcome of
3 bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. J Hosp
4 Infect. 2003 May;54(1):18-24.

5 **Kocsubé S, Tóth M, Vágvölgyi C, Dóczy I, Pesti M, Pócsi I, Szabó J,**
6 **Varga J.** Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in
7 Hungary. J Med Microbiol. 2007 Feb;56(Pt 2):190-5.

8 **Koga-Ito CY, Komiyama EY, Martins CA, Vasconcellos TC, Jorge AO,**
9 **Carvalho YR, do Prado RF, Balducci I.** Experimental systemic virulence of oral
10 *Candida dubliniensis* isolates in comparison with *Candida albicans*, *Candida*
11 *tropicalis* and *Candida krusei*. Mycoses. 2011 Sep;54(5):e278-85. doi:
12 10.1111/j.1439-0507.2010.01899.x.

13 **Kojic EM, Darouiche RO.** *Candida* infections of medical devices. Clin Clin
14 Microbiol Rev. 2004 Apr;17(2):255-67.

15 **Kontoyiannis DP, Lewis RE.** Antifungal drug resistance of pathogenic
16 fungi. Lancet. 2002 Mar 30;359(9312):1135-44.

17 **Köse S, Türken M, Akkoçlu G, Karaca C, Senger SS.** Disseminated
18 candidiasis developing during prophylaxis with fluconazole in a small-intestine
19 transplant recipient. Prog Transplant. 2012 Mar;22(1):110-2.

20 **Kourkoumpetis T, Manolakaki D, Velmahos G, Chang Y, Alam HB,**
21 **Moya MM, Sailhamer EA, Mylonakis E.** *Candida* infection and colonization
22 among non-trauma emergency surgery patients. Virulence. 2010 Sep-
23 Oct;1(5):359-66. doi: 10.4161/viru.1.5.12795.

24 **Krcmery V Jr, Oravcova E, Spanik S, Mrazova-Studena M, Trupl J,**
25 **Kunova A, Stopkova-Grey K, Kukuckova E, Krupova I, Demitrovicova A,**

1 **Kralovicova K.** Nosocomial breakthrough fungaemia during antifungal
2 prophylaxis or empirical antifungal therapy in 41 cancer patients receiving
3 antineoplastic chemotherapy: analysis of aetiology risk factors and outcome. *J*
4 *Antimicrob Chemother.* 1998 Mar;41(3):373-80.

5 **Kreusch A, Karstaedt AS.** Candidemia among adults in Soweto, South
6 Africa, 1990-2007. *Int J Infect Dis.* 2013 Mar 24. pii: S1201-9712(13)00100-8. doi:
7 10.1016/j.ijid.2013.02.010.

8 **Kumamoto CA.** *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 2002 Dec;5(6):608-
9 11.

10 **Kumar CG, Anand SK.** Significance of microbial biofilms in food industry: a
11 review. *Int J Food Microbiol.* 1998 Jun 30;42(1-2):9-27.

12 **Kurtzman CP, Fell, JW, Boekhout T.** **The Yeasts, a Taxonomic Study.**
13 **Volume 1, 5 ed. New York, NY: Elsevier, 2011.**

14 **Kurtzman CP, Robnett CJ.** Identification of clinically important
15 ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-
16 subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol.* 1997 May;35(5):1216-23.

17 **Kwamin F, Nartey NO, Codjoe FS, Newman MJ.** Distribution of *Candida*
18 species among HIV-positive patients with oropharyngeal candidiasis in Accra,
19 Ghana. *J Infect Dev Ctries.* 2013 Jan 15;7(1):41-5. doi: 10.3855/jidc.2442.

20 **Laffey SF, Butler G.** Phenotype switching affects biofilm formation by
21 *Candida parapsilosis*. *Microbiology.* 2005 Apr;151(Pt 4):1073-81.

22 **Lasker BA, Butler G, Lott TJ.** Molecular genotyping of *Candida*
23 *parapsilosis* group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite
24 markers. *J Clin Microbiol.* 2006 Mar;44(3):750-9.

1 **Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart SR, Diekema**
2 **DJ, Pfaller MA & Ghannoum MA.** Characterization of biofilms formed by *Candida*
3 *parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. Int J Med Microbiol. 2010
4 Apr;300(4):265-70. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.09.001.

5 **Lehmann PF, Lin D, Lasker BA.** Genotypic identification and
6 characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random
7 amplified polymorphic DNA. J Clin Microbiol. 1992 Dec;30(12):3249-54.

8 **Lewis RE, Kontoyiannis DP, Darouiche RO, Raad II, Prince RA.**
9 Antifungal activity of amphotericin B, fluconazole, and voriconazole in an in vitro
10 model of *Candida* catheter-related bloodstream infection. Antimicrob Agents
11 Chemother. 2002 Nov;46(11):3499-505.

12 **Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF.** Three distinct genotypes within
13 *Candida parapsilosis* from clinical sources. J Clin Microbiol. 1995 Jul;33(7):1815-
14 21.

15 **Lingegowda PB, Tan CK, Tan AL, Tan BH.** Selection of resistant fungi in
16 liver transplant recipients during use of newer antifungal agents -- a report of two
17 cases. Ann Acad Med Singapore. 2011 Jun;40(6):287-90.

18 **Linton CJ, Borman AM, Cheung G, Holmes AD, Szekely A, Palmer MD,**
19 **Bridge PD, Campbell CK, Johnson EM.** Molecular identification of unusual
20 pathogenic yeast isolates by large ribosomal subunit gene sequencing: 2 years of
21 experience at the United kingdom mycology reference laboratory. J Clin Microbiol.
22 2007 Apr;45(4):1152-8.

23 **Liu TT, Lee RE, Barker KS, Lee RE, Wei L, Homayouni R, Rogers PD.**
24 Genome-Wide Expression Profiling of the Response to Azole, Polyene,

1 Echinocandin, and Pyrimidine Antifungal Agents in *Candida albicans*. Antimicrob
2 Agents Chemother. 2005 Jun;49(6):2226-36.

3 **Liu Y, Filler SG.** *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and
4 invasin. Eukaryot Cell. 2011 Feb;10(2):168-73. doi: 10.1128/EC.00279-10

5 **Lockhart SR, Messer SA, Gherna M, Bishop JA, Merz WG, Pfaller MA,**
6 **Diekema DJ.** Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a
7 Large Global Collection of *Candida glabrata* Isolates: Comparison to the
8 Literature. J Clin Microbiol. 2009 Apr;47(4):1216-7. doi: 10.1128/JCM.02315-08.a

9 **Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ.** Geographic
10 Distribution and Antifungal Susceptibility of the Newly Described Species *Candida*
11 *orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in Comparison to the Closely Related
12 Species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 2008 Aug;46(8):2659-64. doi:
13 10.1128/JCM.00803-08..a

14 **Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ.** Identification and
15 Susceptibility Profile of *Candida fermentati* from a Worldwide Collection of
16 *Candida guilliermondii* Clinical Isolates. J Clin Microbiol. 2009 Jan;47(1):242-4.
17 doi: 10.1128/JCM.01889-08.b

18 **Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ.** *Lodderomyces*
19 *elongisporus* Masquerading as *Candida parapsilosis* as a Cause of Bloodstream
20 Infections. J Clin Microbiol. 2008 Jan;46(1):374-6.b

21 **Logue ME, Wong S, Wolfe KH, Butler G.** A genome sequence survey
22 shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective MTL_{a1}
23 allele at its mating type locus. Eukaryot Cell. 2005 Jun;4(6):1009-17.

24 **Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I, Boldrini**
25 **A, Campa M, Senesi S.** Horizontal Transmission of *Candida parapsilosis*

1 Candidemia in a Neonatal Intensive Care Unit. *J Clin Microbiol.* 2002
2 Jul;40(7):2363-9.

3 **Mallié M, Bastide JM, Blancard A, Bonnin A, Bretagne S, Cambon M,**
4 **Chandenier J, Chauveau V, Couprie B, Datry A, Feuilhade M, Grillot R,**
5 **Guiguen C, Lavarde V, Letscher V, Linas MD, Michel A, Morin O, Paugam A,**
6 **Piens MA, Raberin H, Tissot E, Toubas D, Wade A.** In vitro susceptibility testing
7 of *Candida* and *Aspergillus* spp. to voriconazol and other antifungal agents using
8 Etest®: results of a French multicentre study. *Int J Antimicrob Agents.* 2005
9 Apr;25(4):321-8.

10 **Malone LA, Mclvor CA.** Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA from
11 Four Microsporidian Isolates *J Invert Pat.* 1993 Mar;61(2):203–5

12 **Marchais V, Kempf M, Licznar P, Lefrançois C, Bouchara JP, Robert R,**
13 **Cottin J.** DNA array analysis of *Candida albicans* gene expression in response to
14 adherence to polystyrene. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Apr 1;245(1):25-32.

15 **Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J,**
16 **Calandra T, Glauser MP, Täuber MG, Pittet D; Fungal Infection Network of**
17 **Switzerland.** Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals
18 Secular Trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis.* 2004 Feb 1;38(3):311-20

19 **Martin KJ, Rygiewicz PT.** Fungal-specific PCR primers developed for
20 analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol.* 2005
21 May 18;5:28.

22 **McCullough M, Ross B, Reade P.** Characterization of genetically distinct
23 subgroup of *Candida albicans* strains isolated from oral cavities of patients
24 infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol.* 1995
25 Mar;33(3):696-700.

1 **McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA.** Molecular and phenotypic
2 characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with
3 *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. J Clin Microbiol. 1999
4 Feb;37(2):417-21.

5 **McCullough MJ, DiSalvo AF, Clemons KV, Park P, Stevens DA.**
6 Molecular epidemiology of *Blastomyces dermatitidis*. Clin Infect Dis. 2000
7 Feb;30(2):328-35.

8 **McManus BA, Coleman DC, Moran G, Pinjon E, Diogo D, Bougnoux**
9 **ME, Borecká-Melkusova S, Bujdákova H, Murphy P, d'Enfert C, Sullivan DJ.**
10 Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida*
11 *dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. J Clin
12 Microbiol. 2008 Feb;46(2):652-64.

13 **Medrano DJ, Brilhante RS, Cordeiro Rde A, Rocha MF, Rabenhorst**
14 **SH, Sidrim JJ.** Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida*
15 *parapsilosis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006 Jan-Feb;48(1):17-20.

16 **Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo**
17 **AL.** Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical
18 *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. Med
19 Mycol. 2011 Apr;49(3):253-62. doi: 10.3109/13693786.2010.530032.

20 **Mercure S, Cousineau L, Montplaisir S, Belhumeur P, Lemay G.**
21 Expression of a reporter gene interrupted by the *Candida albicans* group I intron is
22 inhibited by base analogs. Nucleic Acids Res. 1997 Jan 15;25(2):431-7.

23 **Mercure S, Montplaisir S, Lemay G.** Correlation between the presence of
24 a self-splicing intron in the 25S rDNA of *C. albicans* and strains susceptibility to 5-
25 fluorocytosine. Nucleic Acids Res. 1993 Dec 25;21(25):6020-7.

1 **Messer SA, Jones RN, Fritsche TR.** International Surveillance of *Candida*
2 spp. and *Aspergillus* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance
3 Program (2003). J Clin Microbiol. 2006 May;44(5):1782-7.

4 **Messer SA, Moet GJ, Kirby JT, Jones RN.** Activity of Contemporary
5 Antifungal Agents, Including the Novel Echinocandin Anidulafungin, Tested
6 against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.: Report from the
7 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006 to 2007). J Clin Microbiol.
8 2009 Jun;47(6):1942-6. doi: 10.1128/JCM.02434-08

9 **Miletti KE, Leibowitz MJ.** Pentamidine inhibition of group I intron splicing
10 in *Candida albicans* correlates with growth inhibition. Antimicrob Agents
11 Chemother. 2000 Apr;44(4):958-66.

12 **Mokaddas EM, Al-Sweih NA, Khan ZU.** Species distribution and
13 antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year
14 study. J Med Microbiol. 2007 Feb;56(Pt 2):255-9.

15 **Montagna MT, Caggiano G, Lovero G, De Giglio O, Coretti C, Cuna T,**
16 **Iatta R, Giglio M, Dalfino L, Bruno F, Puntillo F.** Epidemiology of invasive fungal
17 infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey
18 (AURORA Project). Infection. 2013 Jun;41(3):645-53. doi: 10.1007/s15010-013-
19 0432-0.

20 **Montagna MT, Lovero G, De Giglio O, Iatta R, Caggiano G, Montagna**
21 **O, Laforgia N; AURORA Project Group.** Invasive fungal infections in neonatal
22 intensive care units of Southern Italy: a multicentre regional active surveillance
23 (AURORA project). J Prev Med Hyg. 2010 Sep;51(3):125-30.

24 **Moretti ML, Trabasso P, Lyra L, Fagnani R, Resende MR, de Oliveira**
25 **Cardoso LG, Schreiber AZ.** Is the incidence of candidemia caused by *Candida*

1 glabrata increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream
2 infection in a university reference hospital in southeast Brazil. *Med Mycol.* 2013
3 Apr;51(3):225-30. doi: 10.3109/13693786.2012.708107

4 **Munro CA.** Fungal echinocandin resistance. *F1000 Biol Rep.* 2010 Sep
5 8;2:66. doi: 10.3410/B2-66

6 **Murillo LA, Newport G, Lan CY, Habelitz S, Dungan J, Agabian NM.**
7 Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by
8 *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2005 Sep;4(9):1562-73.

9 **Muzyka BC.** Oral fungal infections. *Dent Clin North Am.* 2005 Jan;49(1):49-
10 65, viii.

11 **Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B.** *Candida albicans* secreted aspartyl
12 proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003
13 Sep;67(3):400-28.

14 **Nailis H, Coenye T, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Nelis HJ**
15 Development and evaluation of different normalization strategies for gene
16 expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Mol Biol.*
17 2006 Aug 4;7:25

18 **Nailis H, Vandenbroucke R, Tilleman K, Deforce D, Nelis H, Coenye T.**
19 Monitoring ALS1 and ALS3 gene expression during in vitro *Candida albicans*
20 biofilm formation under continuous flow conditions. *Mycopathologia.* 2009
21 Jan;167(1):9-17. doi: 10.1007/s11046-008-9148-6.

22 **Nas T, Kalkanci A, Fidan I, Hizel K, Bolat S, Yolbakan S, Yilmaz E,**
23 **Ozkan S, Kustimur S.** Expression of ALS1, HWP1 and SAP4 genes in *Candida*
24 *albicans* strains isolated from women with vaginitis. *Folia Microbiol (Praha).*
25 2008;53(2):179-83.

1 **Negri M, Henriques M, Svidzinski TI, Paula CR, Oliveira R.** Correlation
2 Between Etest®, Disk Diffusion, and Microdilution Methods for Antifungal
3 Susceptibility Testing of *Candida* Species From Infection and Colonization. J Clin
4 Lab Anal. 2009;23(5):324-30. doi: 10.1002/jcla.20337.

5 **Nguyen L, Cesar GV, Le GTT, Silver DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD.**
6 Inhibition of *Candida parapsilosis* Fatty Acid Synthase (Fas2) Induces
7 Mitochondrial Cell Death in Serum PLoS Pathog. 2012 August; 8(8):
8 e1002879.doi: 10.1371/journal.ppat.1002879

9 **Nguyen LN, Gacser A, Nosanchuk JD.** The stearyl-coenzyme A
10 desaturase 1 is essential for virulence and membrane stress in *Candida*
11 *parapsilosis* through unsaturated fatty acid production. Infect Immun. 2011
12 Jan;79(1):136-45. doi: 10.1128/IAI.00753-10.a

13 **Nguyen LN, Hamari Z, Kadereit B, Trofa D, Agovino M, Martinez LR,**
14 **Gacser A, Silver DL, Nosanchuk JD.** *Candida parapsilosis* fat storage-inducing
15 transmembrane (FIT) protein 2 regulates lipid droplet formation and impacts
16 virulence. Microbes Infect. 2011 Jul;13(7):663-72. doi:
17 10.1016/j.micinf.2011.02.009.b

18 **Nguyen LN, Trofa D, Nosanchuk JD.** Fatty Acid Synthase Impacts the
19 Pathobiology of *Candida parapsilosis* *In Vitro* and during Mammalian Infection.
20 PLoS ONE 2009,4(12): e8421. doi:10.1371/journal.pone.0008421

21 **Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, Yu YC, Morris AJ, Snyderman DR, Sutton**
22 **DA, Rinaldi MG.** Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response
23 to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida*
24 fungemia. J Infect Dis. 1998 Feb;177(2):425-30.

1 **Niewerth M, Korting HC.** Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*.
2 2001 Nov;44(9-10):361-7.

3 **Nobile CJ, Andes DR, Nett JE., Smith FJ, Yue F, Phan Q-T, Edwards**
4 **JE, Filler SG, Mitchell AP.** Critical role of *Bcr1*-dependent adhesions in *C.*
5 *albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog.* 2006 Jul;2(7):e63.

6 **Nobile CJ, Mitchell AP.** Regulation of cell-surface genes and biofilm
7 formation by the *C. albicans* transcription factor *Bcr1p*. *Curr Biol.* 2005 Jun
8 21;15(12):1150-5.

9 **Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppaerd DC, Filler SG, Andes DR,**
10 **Mitchell A.** Complementary adhesion function in *C. albicans* biofilm formation.
11 *Curr Biol.* 2008 Jul 22;18(14):1017-24. doi: 10.1016/j.cub.2008.06.034.

12 **Nosek J, Adamíková L, Zemanová J, Tomáška L, Zufferey R, Mamoun**
13 **CB** Genetic manipulation of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr*
14 *Genet.* 2002 Oct;42(1):27-35.

15 **Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J,**
16 **Zurita J, Guzman-Blanco M, Santolaya ME, Thompson L, Sifuentes-Osornio**
17 **J, Echevarria JI, Colombo AL; Latin American Invasive Mycosis Network.**
18 Epidemiology of candidemia in latin america: a laboratory-based survey. *PLoS*
19 *One.* 2013;8(3):e59373. doi: 10.1371/journal.pone.0059373

20 **O'Connor L, Lahiff S, Casey F, Glennon M, Cormican M, Maher M.**
21 Quantification of ALS1 gene expression in *Candida albicans* biofilms by RT-PCR
22 using hybridisation probes on the LightCycler. *Mol Cell Probes.* 2005
23 Jun;19(3):153-62.

1 **O'Day DM, Head WS, Robinson RD.** An outbreak of *Candida parapsilosis*
2 endophthalmitis: analysis of strains by enzyme profile and antifungal susceptibility.
3 Br J Ophthalmol. 1987 Feb;71(2):126-9.

4 **Odds FC, Brown AJ, Gow NA.** *Candida albicans* genome sequence: a
5 platform for genomics in the absence of genetics. Genome Biol. 2004;5(7):230

6 **Odds FC, Hanson MF, Davidson AD, Jacobsen MD, Wright P, Whyte**
7 **JA, Gow NA, Jones BL.** One year prospective survey of *Candida* bloodstream
8 infections in Scotland, J Med Microbiol. 2007 Aug;56(Pt 8):1066-75.

9 **Oh SH, Cheng G, Nuessen JA, Jajko R, Yeater KM, Zhao X, Pujol C,**
10 **Soll DR, Hoyer LL.** Functional specificity of *Candida albicans* Als3p proteins and
11 clade specificity of ALS3 alleles discriminated by the number of copies of the
12 tandem repeat sequence in the central domain. Microbiology. 2005 Mar;151(Pt
13 3):673-81

14 **O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R.** Biofilm formation as microbial
15 development, Annu Rev Microbiol. 2000;54:49-79.

16 **Papon N, Courdavault V, Clastre M, Simkin AJ, Crèche J, Giglioli-**
17 **Guivarc'h N.** Deus ex *Candida* genetics: overcoming the hurdles for the
18 development of a molecular toolbox in the CTG clade. Microbiology. 2012
19 Mar;158(Pt3):585-600. doi: 10.1099/mic.0.055244-0

20 **Pappas PG.** Invasive Candidiasis. Infect Dis Clin North Am. 2006
21 Sep;20(3):485-506.

22 **Paredes CVT.** Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica.
23 Rev. Chil. Infect. 2009; 26: 144-150.

24 **Passos XS, Costa CR, Araújo CR, Nascimento ES, e Souza LK,**
25 **Fernandes Ode F, Sales WS, Silva Mdo R.** Species distribution and antifungal

1 susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian
2 tertiary care hospital. *Mycopathologia*. 2007 Mar;163(3):145-51

3 **Patel PK, Erlandsen JE, Kirkpatrick WR, Berg DK, Westbrook SD,**
4 **Louden C, Cornell JE, Thompson GR, Vallor AC, Wickes BL, Wiederhold NP,**
5 **Redding SW, Patterson TF.** The Changing Epidemiology of Oropharyngeal
6 Candidiasis in Patients with HIV/AIDS in the Era of Antiretroviral Therapy. *AIDS*
7 *Res Treat*. 2012;2012:262471. doi: 10.1155/2012/262471

8 **Pemán J, Cantón E, Gobernado M; Spanish ECMM Working Group on**
9 **Candidaemia.** Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species
10 isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. *Eur J Clin*
11 *Microbiol Infect Dis*. 2005 Jan;24(1):23-30.

12 **Peterson JF, Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Riebe KM, Ledebor**
13 **NA.** Multicenter comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility test with the
14 CLSI broth microdilution reference method for testing caspofungin, micafungin,
15 and posaconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol*. 2011 May;49(5):1765-
16 71. doi: 10.1128/JCM.02517-10.

17 **Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA,**
18 **Jones RN.** Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins
19 among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin*
20 *Microbiol*. 2012 Apr;50(4):1199-203. doi: 10.1128/JCM.06112-11

21 **Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, Fu**
22 **W, Colombo AL, Rodriguez-Noriega E; Global Antifungal Surveillance Study.**
23 Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to
24 2005: an 8.5 Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* species and Other Yeast

1 Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk
2 Diffusion Testing. J Clin Microbiol. 2007 Jun;45(6):1735-45. Epub 2007 Apr 18.

3 **Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ.** Interpretive Breakpoints for
4 Fluconazole and *Candida* Revisited: a Blueprint for the Future of Antifungal
5 Susceptibility Testing. Clin Microbiol Rev. 2006 Apr;19(2):435-47.

6 **Pfaller MA, Diekema DJ.** Epidemiology of Invasive Candidiasis: a
7 Persistent Public Health Problem. Clin Microbiol Rev. 2007 Jan;20(1):133-63

8 **Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye AA, Salkin IF, Geimer M,**
9 **Bassel A, Sullivan DJ, Clarke M, Hearn V.** Rapid Identification of *Candida*
10 dubliniensis with Commercial Yeast Identification Systems. J Clin Microbiol. 1999
11 Nov;37(11):3533-9.

12 **Pincus DH, Orenga S, Chatellier S.** Yeast identification—past, present,
13 and future methods. Med Mycol. 2007 Mar;45(2):97-121.

14 **Plouffe JF, Brown DG, Silva JJr, Eck T, Stricof RL, Fekety FR.**
15 Nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia related to intravenous
16 infusions. Arch Intern Med. 1977 Dec;137(12):1686-9.

17 **Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL.** Inhibition of *Candida*
18 *albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. Appl Environ
19 Microbiol. 2002 Nov;68(11):5459-63.b.

20 **Ramírez-Zavala B, Reuß O, Park Y-N, Ohlsen K, Morschhäuser J.**
21 Environmental Induction of White–Opaque Switching in *Candida albicans*. PLoS
22 Pathog 2008,4(6): e1000089. doi:10.1371/journal.ppat.1000089

23 **Rex JH.** Editorial response : catheters and candidemia. Clin Infect Dis.
24 1996 Mar;22(3):467-70.

- 1 **Riccombeni A, Vidanes G, Proux-Wéra E, Wolfe KH, Butler G.**
2 Sequence and Analysis of the Genome of the Pathogenic Yeast *Candida*
3 *orthopsilosis*. PLoS One. 2012; 7(4): e35750. doi: 10.1371/journal.pone.0035750
- 4 **Roy B, Meyer SA.** Confirmation of the distinct genotype groups within the
5 form species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 1998 Jan;36(1):216-8.
- 6 **Ruiz Lda S, Khouri S, Hahn RC, da Silva EG, de Oliveira VK, Gandra**
7 **RF, Paula CR.** Candidemia by Species of the *Candida parapsilosis* Complex in
8 Children's Hospital: Prevalence, Biofilm Production and Antifungal Susceptibility.
9 Mycopathologia. 2013 Apr;175(3-4):231-9. doi: 10.1007/s11046-013-9616-5.
- 10 **Ruiz LS, Sugizaki MF, Montelli AC, Matsumoto FE, Pires MFC, da Silva**
11 **BCM, Silva EH, Gandra RF, Gonçalves da Silva E, Auler ME, Paula CR.**
12 Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated
13 at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. Journal de Mycologie Médicale. 2005.
14 15:13-21.
- 15 **Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J.** *Candida albicans*
16 Mutations in the Ergosterol Biosynthetic Pathway and Resistance to Several
17 Antifungal Agents. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Aug;47(8):2404-12.
- 18 **Sanglard D, Odds FC.** Resistance of *Candida* species to antifungal
19 agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis. 2002
20 Feb;2(2):73-85.
- 21 **Sato H, Murakami N.** Reproductive isolation among cryptic species in the
22 ectomycorrhizal genus *Strobilomyces*: Population-level caps marker-based genetic
23 analysis. Mol Phyl Evol. 2008;48:326–334.

1 **Sato H, Yumoto T, Murakami N.** Cryptic species and host specificity in the
2 ectomycorrhizal genus *Strobilomyces* (Strobilomycetaceae). *Am J Bot.*
3 2007;94:1630–1641.

4 **Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL.** A rapid and simple method for
5 preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 1990
6 May 25; 18(10): 3091–3092.

7 **Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque**
8 **CA, Chen W; Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium**
9 **Author List.** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a
10 universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci*
11 *USA.*2012;109:6241–6246.

12 **Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM,**
13 **Lozano E, Cuenca-Estrella M, Mendes-Giannini MJ, Zaragoza O.** Antifungal
14 Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates
15 with the Yeast In Vitro Susceptibility Profile. *PLoS One.* 2013;8(3):e60047. doi:
16 10.1371/journal.pone.0060047.

17 **Seifert KA.** Progress towards DNA barcoding of fungi. *Mol Ecol Res.*
18 2009;9:83–89.

19 **Sherwood RK, Bennett RJ.** Fungal Meiosis and Parasexual Reproduction
20 – lessons from Pathogenic Yeast. *Curr Opin Microbiol.* 2009 Dec;12(6):599-607.
21 doi: 10.1016/j.mib.2009.09.005.

22 **Shivaprakasha S, Radhakrishnan K, Karim PM.** *Candida* spp. other than
23 *Candida albicans*: a major cause of fungaemia in a tertiary care centre. *Indian J*
24 *Med Microbiol.* 2007 Oct;25(4):405-7.

1 **Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia médica à luz de autores**
2 **contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388 p.**

3 **Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG.** Prevalence,
4 distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C.*
5 *orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. J Clin Microbiol. 2009
6 Aug;47(8):2392-7. doi: 10.1128/JCM.02379-08.

7 **Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J.**
8 *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology,
9 epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012
10 Mar;36(2):288-305. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x

11 **Silva V, Cabrera M, Díaz MC, Abarca C, Hermosilla G.** Prevalence of
12 *Candida albicans* serotypes in blood isolates in Chile, and first report of *Candida*
13 *dublinsiensis* candidemia. Rev Iberoam Micol. 2003 Jun;20(2):46-51.

14 **Soll DR.** *Candida albicans* biofilms: is adhesion sexy Curr Biol. 2008 Aug
15 26;18(16):R717-20. doi: 10.1016/j.cub.2008.07.014.

16 **Solomon SL, Khabbaz RF, Parker RH, Anderson RL, Geraghty MA,**
17 **Furman RM, Martone WJ.** An outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream
18 infections in patients receiving parenteral nutrition. J Infect Dis. 1984
19 Jan;149(1):98-102.

20 **Spiering MJ, Moran GP, Chauvel M, Maccallum DM, Higgins J,**
21 **Hokamp K, Yeomans T, d'Enfert C, Coleman DC, Sullivan DJ.** Comparative
22 transcript profiling of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* identifies SFI2, a
23 *C. albicans* gene required for virulence in a reconstituted epithelial infection model.
24 Eukaryot Cell. 2010 Feb;9(2):251-65. doi: 10.1128/EC.00291-09

1 **Staab JF, Ferrer CA, Sundstrom P.** Developmental expression of a
2 tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal
3 surfaces on *Candida albicans*. J Biol Chem. 1996 Mar 15;271(11):6298-305.

4 **Sterling TR, Merz WG.** Resistance to amphotericin B: emerging clinical
5 and microbiological patterns. Drug Resist Updat. 1998;1(3):161-5.

6 **Stevens DA, Odds FC, Scherer S.** Application of DNA typing methods to
7 *Candida albicans* epidemiology and correlations with phenotype. Rev Infect Dis.
8 1990 Mar-Apr;12(2):258-66.

9 **Stokes C, Moran GP, Spiering MJ, Cole GT, Coleman DC, Sullivan DJ.**
10 Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence
11 in comparison with *Candida albicans*. Fungal Genet Biol. 2007 Sep;44(9):920-31

12 **Strausbaugh LJ, Sewell DL, Ward TT, Pfaller MA, Heitzman T, Tjoelker**
13 **R.** High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. J Clin
14 Microbiol. 1994 Sep;32(9):2299-300.

15 **Sudbery P, Gow N, Berman J.** The distinct morphogenic states of
16 *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2004 Jul;12(7):317-24.

17 **Sullivan D, Coleman D.** *Candida dubliniensis*: characteristics and
18 identification J Clin Microbiol. 1998 Feb;36(2):329-34.

19 **Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC.** *Candida dubliniensis*: ten years on.
20 FEMS Microbiol Lett. 2005 Dec 1;253(1):9-17

21 **Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC.**
22 *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a
23 novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals
24 Microbiology. 1995 Jul;141 (Pt 7):1507-21.

1 **Szabó Z, Szilágyi J, Tavanti A, Kardos G, Rozgonyi F, Bayegan S,**
2 **Majoros L.** In vitro efficacy of 5 antifungal agents against *Candida parapsilosis*,
3 *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* as determined by time-kill
4 methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009 Jul;64(3):283-8. doi:
5 10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.011.

6 **Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, Yazawa K, Nishimura K.** Molecular
7 characterization of new clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in
8 Japan: analysis reveals a new genotype of *C. albicans* with group I intron. *J Clin*
9 *Microbiol.* 2001 Dec;39(12):4309-15

10 **Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC.** *Candida*
11 *orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis*
12 groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan;43(1):284-92.

13 **Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S, Sato H.** High-Coverage ITS Primers for
14 the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in
15 Environmental Samples. *PLoS One.* 2012;7(7):e40863. doi:
16 10.1371/journal.pone.0040863

17 **Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure**
18 **O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R; ECMM Working**
19 **Group on Candidaemia.** Epidemiology of Candidaemia in Europe: Results of 28-
20 Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital-Based
21 Surveillance Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004 Apr;23(4):317-22.

22 **Tortorano AM, Prigitano A, Lazzarini C, Passera M, Deiana ML,**
23 **Cavinato S, De Luca C, Grancini A, Lo Cascio G, Ossi C, Sala E, Montagna**
24 **M.** A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology
25 over one decade. *Infection.* 2013 Apr 5.

1 **Tosun I, Akyuz Z, Guler NC, Gulmez D, Bayramoglu G, Kaklikkaya N,**
2 **Arikan-Akdagli S, Aydin F.** Distribution, virulence attributes and antifungal
3 susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from
4 clinical samples. *Med Mycol.* 2012 Dec 6.

5 **Tosun I, Akyuz Z, Guler NC, Gulmez D, Bayramoglu G, Kaklikkaya N,**
6 **Arikan-Akdagli S, Aydin F.** Distribution, virulence attributes and antifungal
7 susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from
8 clinical samples. *Med Mycol.* 2012 Dec 6.

9 **Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 4. ed. rev. e ampl. São Paulo:**
10 **Atheneu, 2005. 697 p.**

11 **Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD.** *Candida parapsilosis*: an Emerging
12 Fungal Pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Oct;21(4):606-25. doi:
13 10.1128/CMR.00013-08.

14 **Tunney MM, Gorman SP, Patrick S.** Infection associated with medical
15 devices. *Rev Med Microbiol* 1996; 7:195-205.

16 **Vale-Silva LA, Coste AT, Ischer F, Parker JE, Kelly SL, Pinto E,**
17 **Sanglard D.** Azole Resistance by Loss of Function of the Sterol Δ 5,6-Desaturase
18 Gene (ERG3) in *Candida albicans* Does Not Necessarily Decrease Virulence
19 Antimicrob Agents Chemother. 2012 April; 56(4): 1960–1968. doi:
20 10.1128/AAC.05720-11

21 **Van Asbeck E, Clemons KV, Martinez M, Tong AJ, Stevens DA.**
22 Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida*
23 *parapsilosis* group. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008 Sep;62(1):106-9. doi:
24 10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.019.

- 1 **van Asbeck EC, Huang YC, Markham AN, Clemons KV, Stevens DA.**
2 *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare
3 workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia*. 2007
4 Dec;164(6):287-93.
- 5 **Van het Hoog M, Rast TJ, Martchenko M, Grindle S, Dignard D,**
6 **Hogues H, Cuomo C, Berriman M, Scherer S, Magee BB, Whiteway M,**
7 **Chibana H, Nantel A, Magee PT.** Assembly of the *Candida albicans* genome into
8 sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome Biol*.
9 2007;8(4):R52.
- 10 **Vandeputte P, Tronchin G, Bergès T, Hennequin C, Chabasse D,**
11 **Bouchara JP.** Reduced Susceptibility to Polyenes Associated with a Missense
12 Mutation in the ERG6 Gene in a Clinical Isolate of *Candida glabrata* with
13 Pseudohyphal Growth. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Mar;51(3):982-90
- 14 **Vandeputte P, Tronchin G, Rocher F, Renier G, Bergès T, Chabasse D,**
15 **Bouchara JP.** Hypersusceptibility to azole antifungals in a clinical isolate of
16 *Candida glabrata* with reduced aerobic growth. *Antimicrob Agents Chemother*.
17 2009 Jul;53(7):3034-41. doi: 10.1128/AAC.01384-08.
- 18 **Varga I, Sóczó G, Kardos G, Borbély A, Szabó Z, Kemény-Beke A,**
19 **Majoros L.** Comparison of killing activity of caspofungin against *Candida*
20 *parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *J Antimicrob*
21 *Chemother*. 2008 Dec;62(6):1466-8. doi: 10.1093/jac/dkn403
- 22 **Verstrepen KJ, Klis FM.** Flocculation, adhesion and biofilm formation in
23 yeasts. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol*. 2006
24 Apr;60(1):5-15

1 **Vilela MM, Kamei K, Sano A, Tanaka R, Uno J, Takahashi I, Ito J, Yarita**
2 **K, Miyaji M.** Pathogenicity and virulence of *Candida dubliniensis*: comparison with
3 *C. albicans*. *Med Mycol.* 2002 Jun;40(3):249-57.

4 **Waters CM, Bassler BL.** Quorum sensing: cell-to-cell communication in
5 bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:319-46.

6 **Wemms JJ, Chamberland ME, Ward J, Willy M, Padhye AA, Solomon**
7 **SL.** *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and
8 contaminated blood pressure transducers. *J Clin Microbiol.* 1987 Jun;25(6):1029-
9 32.

10 **Wemms JJ.** *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical
11 manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis.* 1992
12 Mar;14(3):756-66.

13 **Westbrook SD, Wiederhold NP, Vallor AC, Kotara S, Bernardo S, Lee**
14 **SA, Kirkpatrick WR, Toro JJ, Freytes C, Patterson TF, Redding SW.** Loss of in
15 vitro resistance in *Candida glabrata* following discontinuation of fluconazole
16 prophylaxis in a hematopoietic stem cell transplantation patient. *Med Mycol.* 2010
17 May;48(3):557-60. doi: 10.3109/13693780903213504

18 **White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.** Amplification and direct sequencing of
19 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols a guide to*
20 *methods and applications*, 315–322. Academic Press, San Diego. 1990.

21 **Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV.** DNA
22 polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.
23 *Nucleic Acids Res.* 1990 Nov 25;18(22):6531-5.

1 **Winn WC, Koneman EW. Koneman: Diagnostico Microbiológico texto**
2 **e atlas colorido. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, c2008.**
3 **1535p.**

4 **Wrestler JC, Lipas BD, Birren BW.** Lai E. Pulsed-field gel electrophoresis.
5 *Methods Enzymol.* 1996;270:255-72.

6 **Xiao M, Li T, Yuan X, Shang Y, Wang F, Chen S, Zhang Y.** A peripheral
7 element assembles the compact core structure essential for group I intron self-
8 splicing. *Nucleic Acids Res.* 2005 Aug 12;33(14):4602-11

9 **Yadav JS, Bezawada J, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY.** *Candida*
10 *krusei*: biotechnological potentials and concerns about its safety. *Can J Microbiol.*
11 2012 Aug;58(8):937-52. doi: 10.1139/w2012-077.

12 **Yang YL, Chen HT, Lin CC, Chu WL, Lo HJ;** TSARY Hospitals. Species
13 distribution and drug susceptibilities of *Candida* isolates in TSARY 2010. *Diagn*
14 *Microbiol Infect Dis.* 2013 Apr 8. pii: S0732-8893(13)00136-3. doi:
15 10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.003.

16 **Zemanova J, Nosek J, Tomaska L.** High-efficiency transformation of the
17 pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet.* 2004 Mar;45(3):183-6.

18 **Zhang Y, Leibowitz MJ.** Folding of the group I intron ribozyme from the
19 26S rRNA gene of *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jun
20 15;29(12):2644-53.

21 **Zhang Y, Li Z, Pilch DS, Leibowitz MJ. Zhang Y, Li Z, Pilch DS,**
22 **Leibowitz MJ.** Pentamidine inhibits catalytic activity of group I intron Ca.LSU by
23 altering RNA folding. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jul 1;30(13):2961-71.