

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta dissertação será disponibilizado
somente a partir de 23/02/2020.



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



**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E AMBIENTAIS DE
CANDIDEMIAS EM HOSPITAL TERCIÁRIO
(HC/FMB/UNESP/BOTUCATU) LOCALIZADO NA REGIÃO
CENTRO-SUL DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.**

JULIANA GIACOBINO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus 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 Micro-organismos*.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bagagli

BOTUCATU- SÃO PAULO

2018



unesp

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E AMBIENTAIS DE
CANDIDEMIAS EM HOSPITAL TERCIÁRIO
(HC/FMB/UNESP/BOTUCATU) LOCALIZADO NA REGIÃO
CENTRO-SUL DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.**

DOUTORANDA: JULIANA GIACOBINO

ORIENTADOR: PROFESSOR TITULAR EDUARDO BAGAGLI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus 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
Micro-organismos*.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bagagli

BOTUCATU-SÃO PAULO

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA
INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB8/5651

Giacobino, Juliana.

Aspectos microbiológicos e ambientais de candidemias em Hospital terciário (HC/UNESP/Botucatu) localizado na região centro-sul do estado de São Paulo, Brasil/ Juliana Giacobino. - Botucatu, 2018.

Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu, 2018.

Orientador: Eduardo Bagagli

Capes: 21201030

1. Candidemia. 2. Fatores de virulência. 3. Atenção terciária à saúde. 4. Antimicóticos. 5. Hospitais. 6. Botucatu (SP).

Palavras-chave: Complexo *Candida parapsilosis*; Fatores de virulência; Identificação molecular; Isolados ambientais; Susceptibilidade aos antifúngicos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai (José Vicente Giacobino), minha mãe (Eliana Aparecida Dalanesi Giacobino), minha irmã (Tatiana Giacobino) por sempre acreditarem em mim, mesmo nos momentos mais difíceis e conturbados da minha vida e ao longo do meu doutorado, sempre me apoiando e me dando forças para continuar e seguir o meu caminho.

Agradeço ao meu marido Carlos Eduardo Santos pelo seu companheirismo, amor e paciência ao longo da minha vida e do doutorado e por todos os momentos de alegria que vivemos juntos.

Agradeço ao meu sobrinho Gabriel Giacobino Silvestre por alegrar todos os meus dias e pelo seu amor e carinho. Agradeço a Deus por me dar a oportunidade de ver o seu sorriso jovial, amá-lo a cada dia e aproveitar ao seu lado momentos maravilhosos.

Agradeço a minha filha Maria Eduarda Giacobino Santos por me permitir ser sua mãe e me ensinar o amor infinito e incondicional. Você é a fonte de inspiração para a conclusão do meu doutorado.guardo a sua chegada com muito amor e carinho!

Agradeço ao Tio Quim pelo seu apoio ao longo de minha vida e durante o meu doutorado, sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida, me apoiando e dando forças. Obrigada!

Agradeço a minha sogra Mércia Regina Ornellas Santos e meu cunhado Renato Santos Neto pela amizade e apoio.

Agradeço ao amor e carinho da minha avó Concheta Granato Giacobino (*in memoriam*) que mesmo em outro plano ilumina o meu caminho.

Agradeço ao amor, carinho, apoio e orações da minha avó Vera Lúcia Linheira Dalanesi que sempre acreditou em mim e continua acreditando.

Agradeço aos meus tios: Edvaldo Francisco, Everaldo, Vera Lúcia, Maria Terezinha e Maria Aparecida pelo apoio e por acreditarem em mim ao longo destes anos.

Agradeço a todos os meus primos pela confiança, amizade e pelos momentos de alegria.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Bagagli pelo apoio, paciência, dedicação e amizade ao longo desses anos. Agradeço por acreditar em mim e depositar total confiança em meu trabalho. Tenho você como um grande amigo.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Biologia de Fungos (Departamento de Microbiologia e Imunologia): Hans, Marluce, Thales, Raquel, Tâmara, Gabriel, Tarsila, e Professora Sandra. Muito obrigada pelo apoio, amizade e aprendizado ao longo desses anos.

Agradeço a todos do Departamento de Microbiologia e Imunologia – IBB pela amizade e apoio.

Agradeço a Professora Terue pela amizade, apoio e pelos ensinamentos durante o doutorado.

Agradeço aos amigos Danilo, Valéria, Carlos, Fabiano, Ceci e Jeffersson pela amizade e apoio.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro para a realização do doutorado.

Enfim, agradeço a Deus por tudo!

“Mesmo desacreditado e ignorado por todos, não posso desistir, pois para mim, vencer é nunca desistir.”(Albert Einstein).

“Se podemos sonhar, também podemos tornar nossos sonhos realidade”.
(Walt Disney)

RESUMO

Infecções fúngicas causadas por leveduras constituem um dos maiores problemas em pacientes hospitalizados em todo o mundo e têm se tornado uma importante causa de morbidade e mortalidade. Embora *Candida albicans* seja a espécie mais frequentemente isolada e sua forma de infecção ocorra geralmente por translocação endógena, tem-se observado um aumento das espécies *não-albicans*, com destaque para o complexo *C. parapsilosis*, cuja principal forma de infecção é exógena, provavelmente pelas mãos dos profissionais de saúde. Este trabalho propôs estudar os aspectos microbiológicos e ambientais das candidemias, com especial atenção para o complexo *Candida parapsilosis*, no hospital terciário HC/FMB/UNESP, Botucatu, utilizando-se de métodos moleculares, busca ativa dos agentes no ambiente hospitalar (ar, superfícies e mãos de profissionais de saúde), bem como determinar os fatores de virulência e susceptibilidade aos antifúngicos destas espécies e associação com o desfecho clínico. Os isolados clínicos (obtidos de hemoculturas, período 2007-2015) e ambientais (período 2014-2015) de *C. parapsilosis sensu lato* foram identificados pelo meio CHROMagar *Candida*, Vitek-2, sequenciamento do rDNA e perfis dos inteins VMA e ThrRS. Fatores de virulência (produção de proteinase, fosfolipase e biofilme) e perfis de susceptibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, voriconazol, caspofungina e micafungina foram estimados, e dados clínicos obtidos junto aos prontuários dos pacientes. Dentre os isolados clínicos (n=45), *C. parapsilosis sensu stricto* (s.s.) representou 84%, *C. orthopsilosis* 16% e ausência de *C. metapsilosis*. Os perfis de inteins confirmaram o padrão híbrido incomum da espécie *C. orthopsilosis*. Dentre os ambientais (n=14), todos pertenceram à *C. parapsilosis s.s.* A produção de proteinase foi positiva ou fortemente positiva em 55% dos isolados clínicos de *C. parapsilosis s.s.*, e negativa nos isolados de *C. orthopsilosis*. Todos os isolados ambientais de *C. parapsilosis s.s.* foram produtores de proteinase (64% fortemente positivos). A produção de fosfolipase foi positiva para apenas um isolado ambiental de *C. parapsilosis s.s.* A produção de biofilme foi significativamente maior em *C. orthopsilosis*. Todos os isolados clínicos de *C. parapsilosis s.s.* foram sensíveis à anfotericina B e voriconazol, cinco foram sensíveis dose-dependentes e dois resistentes ao fluconazol, três foram simultaneamente sensíveis dose-dependentes à caspofungina e micafungina. Os isolados de *C. orthopsilosis* foram sensíveis a todos os antifúngicos. A mortalidade foi alta (51%) e as mortes ocorreram principalmente em recém-nascidos e idosos. A melhor compreensão das leveduras do complexo *C. parapsilosis* terá impactos positivos no tratamento e prevenção de novas infecções.

Palavras-chave: complexo *Candida parapsilosis*; fatores de virulência; identificação molecular; exposição ambiental; agentes antifúngicos.

ABSTRACT

Fungal infections caused by yeasts are serious problems in hospitalized patients around the globe and have become a major cause of morbidity and mortality. Although *Candida albicans* is the most frequently isolated species and its infection usually occurs by endogenous translocation, an increase of *non-albicans* species has been observed, with emphasis for the *C. parapsilosis* complex, whose main route of infection is exogenous, probably by the hands of health professionals. This work proposes to study the microbiological and environmental aspects of candidemia, with special attention to the *C. parapsilosis* complex, in a public tertiary hospital HC/FMB/UNESP, in Botucatu, using the molecular methods, active search of agents in the hospital environment (air, surfaces and hands of health professionals), as well as to determine the virulence factors and susceptibility to the antifungals of these species and correlate with the patient clinical outcomes. The clinical isolates (obtained of the blood cultures, 2007-2015 period) and environmental (2014-2015 period) of the *C. parapsilosis sensu lato* were identified by CHROMagar *Candida* medium, Vitek-2, rDNA sequencing and VMA and ThrRS inteins profiles. Virulence factors (production of proteinase, phospholipase and biofilm) and profiles of susceptibility to antifungals amphotericin B, fluconazole, voriconazole, caspofungin and micafungin were estimated, and the clinical data were obtained from patient's records. Among the clinical isolates (n=45), *C. parapsilosis sensu stricto* (*s.s.*) represented 84%, *C. orthopsilosis* 16% and absence of *C. metapsilosis*. The inteins profiles confirmed the unusual hybrid pattern of the *C. orthopsilosis* species. Among the environmental isolates (n=14), all belong to *C. parapsilosis s.s.* Proteinase production was positive or strongly positive in 55% of clinical isolates of *C. parapsilosis s.s.*, and negative in the *C. orthopsilosis* isolates. All the environment isolates of *C. parapsilosis s.s.* were proteinase producers (64% of them were strongly positive). The phospholipase production was positive for only one environmental isolate of *C. parapsilosis s.s.* The biofilm production was significantly higher in *C. orthopsilosis*. All the clinical isolates of *C. parapsilosis s.s.* were sensitive to amphoterycin B and voriconazole, five were dose-dependent sensitivity and two resistant to fluconazole, three were simultaneously dose-dependent sensitivity to caspofungin and micafungin. The isolates of *C. orthopsilosis* were sensitive to all antifungals. The mortality was high (51%) and deaths occurred mainly in newborns and elderly patients. A better understanding of *C. parapsilosis* complex yeasts will have positive impacts on the treatment and prevention of new infections in our hospitals.

Keywords: *Candida parapsilosis* complex; virulence factors; molecular identification; environmental exposures; antifungal agents.

LISTA DE ABREVIATURAS:

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Inglês).

Candida parapsilosis sensu stricto: (referido como *C. parapsilosis s.s.*).

CDC: Centers for Disease Control and Prevention (Inglês).

D1/D2: Região Variável da Subunidade Maior 26S do rDNA.

GLT1: Gene da Glutamato-Synthase.

HE: Homing Endonuclease (Inglês).

ITS: Internal Transcribed Spacer (Inglês) (presente na região nuclear ribossomal).

NNIS: National Nosocomial Infection Survey (Inglês).

PCR: Polimerase Chain Reaction (Inglês).

rDNA: Ribossomal DNA (DNA ribossomal).

ThrRS: RNA de transferência para o aminoácido threonil (referido como intein ThrRS).

VMA: ATPase da membrana vacuolar (referido como intein VMA).

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Infecções fúngicas nosocomiais e leveduras do gênero <i>Candida</i>	1
Candidemias (<i>Candida albicans</i> X <i>Candida não-albicans</i>)	4
Complexo <i>Candida parapsilosis</i>	6
Aplicação de métodos moleculares na identificação e caracterização de leveduras.....	9
Fatores de Virulência (proteinase, fosfolipase e biofilme) em leveduras do complexo <i>Candida parapsilosis</i>	12
Perfis de susceptibilidade e resistência aos antifúngicos	15
JUSTIFICATIVAS DO TRABALHO	17
OBJETIVO GERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
REFERÊNCIAS	19
Capítulo 1: <i>Candida parapsilosis</i> complex in a public tertiary hospital in Brazil: molecular and environmental aspects, virulence factors, antifungal susceptibilities and clinical outcomes.	39
ANEXOS	75

INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas nosocomiais e leveduras do gênero *Candida*

As infecções fúngicas nosocomiais têm se tornado uma das principais causas de morte nas unidades de terapia intensiva (UTIs). Vale ressaltar, nas últimas décadas, um importante aumento na taxa global no número destas infecções fúngicas sistêmicas, principalmente causadas por leveduras, e este aumento constitui um importante problema de saúde pública, devido principalmente a sua gravidade, aumentos no tempo de hospitalização, no custo e nas taxas de morbidade e mortalidade (MARTIN et al., 2003; ARENDRUP, 2010; STORTI et al., 2012; MENEZES et al., 2015). Nos últimos anos, houve um notável aumento em sua incidência, devido aos avanços nas áreas de diagnóstico e tratamento com antimicrobianos de amplo espectro e à realização de transplantes de órgãos sólidos e hematopoiéticos (PERLROTH et al., 2007; COLOMBO et al., 2013). Assim, essas infecções constituem um dos maiores problemas nas UTIs tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, a incidência destas infecções aumentou em 2% a cada 1000 admissões hospitalares, nas últimas décadas (BAJWA & KULSHRESTHA, 2013). Já em países em desenvolvimento, como o Brasil, que carece de recursos humanos e financeiros e de práticas de controle e prevenção da disseminação desses micro-organismos, a incidência destas infecções aumentou em 5% (SALES-JÚNIOR et al., 2006; COLOMBO et al., 2013). Outro fato importante é que em países com clima predominantemente tropical, como Brasil e Índia, algumas evidências indicam que as diversas condições climáticas podem favorecer também o aumento destas infecções fúngicas no ambiente hospitalar (BECK-SAGUE & JARVIS, 1993; STORTI et al., 2012).

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza e podem sobreviver em ambientes extremos. Das 500 espécies mais conhecidas e/ou comumente associadas ao homem, poucas eram consideradas patogênicas e/ou oportunistas há alguns anos atrás, mas nos últimos anos, estes números têm crescido consideravelmente, embora não se saiba ainda quantas espécies de fungos são patogênicas ao homem. A maior incidência de infecções fúngicas sistêmicas nosocomiais é observada principalmente em pacientes imunodeprimidos, sendo responsáveis por aproximadamente 60% a 90% dos casos (BECK-SAGUE & JARVIS, 1993; RICHARDSON, 2005; APERIS et al., 2006; PFALLER et al., 2007; PAPPAS et al., 2010).

Em pacientes internados em UTIs, a maioria dos patógenos fúngicos causadores de infecções sistêmicas nosocomiais e de infecções de corrente sanguínea pertencem ao gênero *Candida*, sendo responsável por cerca de 80% destas infecções (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; EGGIMANN et al., 2003; PFALLER & DIEKEMA, 2002). As espécies de *Candida* são leveduras pertencentes à ordem *Saccharomycetales*, da classe dos *Ascomycetes*, e muitas de suas espécies fazem parte da microbiota da pele e dos tratos gastrintestinal e geniturinário. Alterações na microbiota da pele e mucosas, bem como a perda da integridade da barreira do trato gastrintestinal podem proporcionar condições de crescimento excessivo ou a translocação dos micro-organismos através do intestino (FRIDKIN & JARVIS, 1996; EGGIMANN et al., 2003). Nos últimos 20 anos, diversos fatores têm contribuído para o aumento na incidência das candidemias, dentre eles destacam-se aqueles que comprometem as condições dos pacientes, como as deficiências imunológicas e desordens congênitas, tais como: neutropenia, neoplasia, cirurgias do tratogastrintestinal, transplantes de órgãos sólidos, diabetes avançada, terapia com glicocorticoides, neonatos com baixo peso, idosos, pacientes infectados pelo vírus HIV, pacientes com cânceres submetidos à quimioterapia e que necessitam de procedimentos médicos invasivos (como o uso de cateter

venoso central e sondas urinária e parenteral) submetidos a longos períodos de hospitalização. Outros fatores de risco também envolvidos nesse aumento são o uso profilático e terapia com antimicrobianos de amplo espectro, principalmente quando se refere ao uso dos azóis (principalmente o fluconazol), colonização por *Candida* spp. em diferentes sítios, hemodiálise e o próprio ambiente hospitalar, como as UTIs (WEY et al., 1988; LUSATTI et al., 2000; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; MARCHETTI et al., 2004; PERLROTH et al., 2007; STORTI et al., 2012; NUCCI et al., 2010; MENEZES et al., 2015).

Nos Estados Unidos (EUA), segundo dados do *National Nosocomial Infection Survey* (NNIS), as espécies pertencentes ao gênero *Candida* foram consideradas a quarta causa mais comum de infecções sanguíneas nosocomiais encontradas na década de 1990 (EDMOND et al., 1999; RANGEL-FRAUSTO et al., 1999; WISPLINGHOFF et al., 2004). Em anos mais recentes, houve um aparente crescimento destas infecções, que passaram a ocupar a terceira posição, sendo apenas superada estatisticamente pelas espécies bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (WISPLINGHOFF et al., 2004), sendo responsáveis por 8% a 15% das infecções sanguíneas isoladas de hemoculturas em pacientes hospitalizados em UTIs (JARVIS & MARTONE, 1992; PFALLER et al., 2002; ZAOUTIS et al., 2005). Segundo dados do ano de 2007 do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), as candidemias constituem a terceira maior causa de infecções sanguíneas associadas a cateteres nos EUA, nos últimos anos e estas taxas variam de 30% a 80% (LUSATTI et al., 2000). No Brasil, também vem sendo observado um aumento na taxa de incidência destas infecções (com média de 1,66 episódios por 1000 admissões hospitalares), números maiores do que os observados em países da Europa (0,17 a 0,76 por 1000 admissões hospitalares) e EUA (0,28 a 0,96 por 1000 admissões hospitalares) (WISPLINGHOFF et al., 2004; COLOMBO et al., 2007). Ainda no Brasil, estas infecções variam entre diferentes centros médicos de uma

mesma região, bem como em diferentes regiões geográficas (COLOMBO et al., 2007; NUCCI et al., 2010). Essas infecções representam um elevado custo hospitalar, pois aumentam o tempo de internação do paciente, e acarretam elevadas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (PATTERSON, 2005; ZAOUTIS et al., 2005; ODDS et al., 2007; PFALLER & DIEKEMA, 2002; ALANGADEN, 2011). Nos EUA, a taxa de mortalidade é estimada em 49% nas UTIs de adultos e chegam em até 75% nas UTIs pediátricas (STORTI et al., 2012; WISPLINGHOFF et al., 2014).

Candidemias (*Candida albicans* X *Candida não-albicans*)

A epidemiologia das candidemias vem sofrendo alterações nas últimas décadas. Até a década de 1980, a espécie até então mais frequentemente isolada era *Candida albicans*, também considerada a espécie mais virulenta de todas as espécies de *Candida* (BRIELAND et al., 2001; PERLROTH et al., 2007). Embora *C. albicans* seja ainda considerada a principal espécie do gênero e uma das mais importantes causadoras de infecções em muitos países, como os EUA, França e Tailândia, tem sido observado, a partir da década de 1990, um aumento na incidência das espécies *Candida não-albicans* em diversos centros médicos hospitalares em todo o mundo (PERLROTH et al., 2007; PFALLER & DIEKEMA, 2002; MARRA et al., 2011; PAPPAS et al., 2010; PFALLER et al., 2011; PARMELAND et al., 2013).

Dentre as espécies *não-albicans* mais frequentemente encontradas destacam-se: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (STORTI et al., 2012). Na literatura são encontrados estudos epidemiológicos com as mais variadas taxas de frequência das espécies, sempre dependendo da casuística e da região geográfica de cada centro avaliado. Nos EUA, Reino Unido, França, Alemanha, Noruega e China, *C. glabrata* foi a espécie *não-albicans*

mais frequentemente encontrada causadora de candidemias, enquanto que, na Espanha, Israel e em muitos países da América Latina as espécies mais encontradas foram *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (MARCHETTI et al., 2004; ALMIRANTE et al., 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2002; GONZÁLEZ et al., 2008; NUCCI et al., 2013; DING et al., 2015). Alguns estudos dão ênfase a esses achados, como o observado por Ding et al. (2015) que dentre os 106 pacientes analisados, 53,8% apresentaram infecções por *Candida não-albicans*: *C. glabrata* (25,5%), *C. tropicalis* (15,1%), *C. parapsilosis* (10,4%) e *C. krusei* (0,9%). Pereira et al. (2010) realizaram um estudo em um hospital terciário na cidade de São Paulo, Brasil (Hospital Brigadeiro), num período de 5 anos (2004 a 2008), e observaram que 82% das infecções foram causadas por espécies *não-albicans*, sendo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, as espécies mais comumente isoladas (26% cada). Em outro país semelhante ao Brasil, pelo clima, localização geográfica e/ou condições socioeconômicas, por exemplo, Índia, observa-se que as taxas de espécies de *Candida não-albicans* variaram de 52% a 96% dos casos, sendo a espécie *C. tropicalis* predominante em vários grupos estudados (CHAKRABARTI et al., 2002; RANI et al., 2002; VERMA et al., 2003; CHOW et al., 2008). No Peru, em estudo realizado em uma UTI neonatal, as espécies *Candida não-albicans* foram as mais frequentemente isoladas, sendo: *C. parapsilosis* (32% dos casos), *C. pelliculosa* (32%), *C. glabrata* (8%) e *C. albicans* em apenas 22% dos casos (IPEK et al., 2011). Em um estudo multicêntrico envolvendo 36 diferentes instituições na Argentina, no período de abril de 1999 a abril de 2000, observou-se também o predomínio das espécies *Candida não-albicans* (50,92%), sendo isoladas principalmente *C. parapsilosis* (28,67%), *C. tropicalis* (15,84%), *C. famata* (3,77%), *Cryptococcus neoformans* (3,77%), *C. glabrata* (2,64%) e outros (4,53%) enquanto que *C. albicans* foi isolada em 40,75% dos casos (RODERO et al., 2005).

Ainda neste tema sobre espécies *não-albicans*, é fundamental salientar sobre a emergência da espécie *Candida auris*, até então pouco conhecida e ainda não isolada no Brasil. Infecções por *C. auris* têm surgido como uma importante mudança no paradigma de pacientes admitidos em UTIs devido à ocorrência de surtos potenciais, resistência multidrogas, principalmente ao fluconazol, anfotericina B e equinocandinas, e associação a altas taxas de mortalidade, sendo que estas variam de 30 a 70%. Assim, esta espécie está relacionada à falha terapêutica e disseminação no ambiente hospitalar (CHOWDARY et al., 2013, 2014, 2017; MORALES-LÓPEZ et al., 2017; RUDRAMURTHY et al., 2017). O primeiro relato de isolamento desta espécie ocorreu no Japão em 2009 em um paciente com quadro de otite por *C. auris* (KIM et al., 2009). Atualmente, há relatos em vários países do mundo, como Kuwait, Índia, Coreia do Sul, África do Sul, Reino Unido, EUA, Israel, Europa, Colômbia e Venezuela (BEM-AMI et al., 2017; BORMAN et al., 2016; CALVO et al., 2016; CHOWDARY et al., 2013, 2014, 2017; KHILLAN et al., 2014; EMARA et al., 2015; LEE et al., 2011; LOCKHART et al., 2017; MAGOBO et al., 2014; MORALES-LÓPEZ et al., 2017; RUDRAMURTHY et al., 2017; SCHELENZ et al., 2016; VALLABHANENI et al., 2016).

Complexo *Candida parapsilosis*

Dentre este universo relativamente amplo das espécies *não-albicans* e por sua alta frequência e importância nos hospitais brasileiros, apresentamos a seguir alguns dados mais detalhados sobre o complexo *C. parapsilosis*, também referido como *C. parapsilosis sensu lato* ou grupo *psilosis* (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; MONDELLI et al., 2012). Infecções causadas por leveduras pertencentes a este grupo têm sido particularmente observadas em pacientes com AIDS, câncer, transplantados, recém-nascidos com baixo peso (<1500g) e pacientes hospitalizados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) que necessitam

de cirurgia invasiva do trato gastrointestinal e uso prolongado de cateteres intravasculares, tanto para administração de nutrição parenteral como para terapia antimicrobiana (COLOMBO, 2003; CHANG et al., 2008; TROFA et al., 2008; COLOMBO et al., 2013; PAMMI et al., 2013; QUINDÓS, 2014; ALENCAR et al., 2017).

Baseados em estudos moleculares e filogenéticos, *C. parapsilosis* foi reclassificada em três espécies crípticas distintas: *C. parapsilosis sensu stricto* (antigo grupo I), *C. orthopsilosis* (antigo grupo II) e *C. metapsilosis* (antigo grupo III) (TAVANTI et al., 2005). No entanto, a definição de espécies dentro do grupo *psilosis* pode ser muito mais complexa do que se conhece. Estudos recentes de sequenciamento de ITS, locus MAT, inteins e genômica comparativa vêm demonstrando que isolados de *C. orthopsilosis* são geneticamente heterogêneos, com a ocorrência de pelo menos dois subgrupos distintos (subespécies) (SAI et al., 2011; PRANDINI et al., 2013; PRYSZCZ et al., 2014), originadas por pelo menos quatro eventos distintos de hibridização (SCHRÖDER et al., 2016).

Embora as reais prevalência e distribuição de espécies do complexo *C. parapsilosis* não estejam completamente claras para as diferentes regiões geográficas, vários estudos indicam que *C. parapsilosis s.s.* ocorre em maior frequência do que *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* em casos clínicos (TAVANTI et al. 2005, TROFA et al., 2008, NÉMETH et al., 2013), sendo responsável por 7% a 15% das candidemias na maioria das séries publicadas nos EUA e Europa, e ainda diversos estudos afirmam que é a segunda espécie mais comumente isolada de fungemias em várias regiões do mundo, sendo encontrada em maior frequência que *C. albicans* em vários hospitais da Europa, Ásia e América Latina, principalmente em recém-nascidos (VOSS et al., 1996; PFALLER et al., 2001; ALMIRANTE et al., 2005; MORAN et al., 2002; NAKAMURA & TAKAHASHI, 2006; MEDRANO et al., 2006; COSTA-DE-OLIVEIRA et al., 2008; TROFA et al., 2008; DASILVA et al; 2015).

Em relação aos aspectos ecológicos ou ambientais, a literatura indica que *C. parapsilosis sensu lato* é patógeno comensal humano, podendo ocorrer como habitante normal ou transitório da pele, bem como de mucosas. Existem poucos estudos ecológicos com a diferenciação das três espécies e a maior parte dos dados refere-se à espécie *C. parapsilosis s.s.* Estes organismos apresentam potencial capacidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas, como células do tecido epitelial, cateteres e outros dispositivos médicos, e de proliferar-se em soluções contendo glicose, como soluções de nutrição parenteral e de uso em diálise peritoneal (COLOMBO, 2003; TROFA et al., 2008; SABINO et al., 2011; PAMMI et al., 2013). Outro fato importante que está relacionado à sua disseminação no ambiente hospitalar, principalmente nas UTIs é que diferente da maioria das espécies de *Candida* cuja principal via de transmissão de infecções é a endógena, *C. parapsilosis* é transmitida frequentemente de modo horizontal pelas mãos dos profissionais de saúde que entram em contato com pacientes que requerem uso intensivo de implantes médicos (TAVANTI et al., 2005; TROFA et al., 2008). Há estudos que já demonstraram o isolamento desta espécie em mãos de profissionais de saúde e aparelhos por eles manuseados (HUANG et al., 1999; LUPETTI et al., 2002; TROFA et al., 2008). Quando comparada a outras espécies de *Candida*, possui uma extensa distribuição na natureza, e têm sido também isolada de animais domésticos, insetos, solo, ambientes marinhos e hospitalares (assim como ar, sistemas de ventilação, construções hospitalares, carpetes, água, alimento entre outras superfícies) (WEEMS, 1987; SABINO et al., 2011). Em estudo realizado no Brasil por Cordeiro et al. (2010), em um total de 240 amostras de ar envolvendo diferentes ambientes hospitalares, foram isoladas 34 amostras de *C. parapsilosis s.s.*, sendo a espécie predominante quando comparada a outras espécies, como *C. tropicalis* (n=8), *C. albicans* (n=4), *C. guilliermondii* (n=1), *C. krusei* (n=1), *Trichosporon asahii* (n=11) e *Sacharomyces cerevisiae* (n=1)

Aplicação de métodos moleculares na identificação e caracterização de leveduras

Embora as diversas espécies tendam a apresentar diferentes perfis clínicos e epidemiológicos, a correta identificação destes agentes tem se tornado um grande desafio na prática laboratorial, principalmente quando baseado apenas nas características morfofisiológicas destas espécies. A identificação de patógenos fúngicos por métodos convencionais (fenotípicos), além do uso de sistemas comerciais denominados VITEK e API-32C, está se tornando cada vez mais difícil e inconclusiva, especialmente para as espécies fúngicas menos frequentes e/ou raras. Isto se dá, principalmente, pelas condições de crescimento das culturas que levam dias ou semanas, além de uma difícil interpretação de suas estruturas morfológicas e de seus perfis de assimilação e fermentação de carboidratos (CHEN et al., 2000; LEAW et al., 2006).

Com o advento da biologia molecular, surgiram novas possibilidades de detecção e identificação desses patógenos, sem que haja a necessidade de isolamento e cultivo do mesmo, utilizando para isso técnicas de reação de polimerase em cadeia, como a PCR (SAIKI et al., 1985). Informações de sequências gênicas e de genomas completos vêm sendo geradas em crescimento exponencial e depositadas nos respectivos bancos de dados (GenBank, EMBL-EBI, BroadInstitute, Sanger Institute e outros). Espécies podem ser discriminadas com base nas suas sequências de nucleotídeos; e as ferramentas de bioinformática, para a realização das análises comparativas, evoluíram para um grande poder de análise, associadas também à relativa simplicidade para o usuário, como por exemplo, o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). Algumas regiões gênicas em particular, como as de rDNA que contém os fragmentos de ITS1/ITS2 e D1/D2, demonstram ser de grande utilidade para os protocolos de identificação rápida pela reação da PCR, devido ao fato de apresentarem, concomitantemente, regiões conservadas, isto é, não-variáveis

presentes em todos os fungos e regiões variáveis (única para cada espécie ou grupo de espécies próximas) (BAGAGLI & MARQUES, 2010). Diversos laboratórios já vêm empregando este tipo de abordagem na identificação de leveduras do gênero *Candida*, com excelentes resultados (CHEN et al., 2000, 2001; LEAW et al. 2006; CIARDO et al., 2006). A análise das regiões de ITS1/ITS2, juntamente com a do gene 5.8S rDNA, também serviu para indicar a ocorrência de três grupos genéticos distintos (grupos I, II e III) em *C. parapsilosis sensu lato* (LIN et al., 1995), que, posteriormente, confirmou serem de fato três espécies crípticas distintas, como já mencionado acima (TAVANTI et al., 2007).

Outros alvos moleculares, denominados inteins, também vêm sendo utilizados na identificação fúngica (KASUGA et al., 2003; BUTLER & POULTER, 2005; CARRERO et al., 2008) e mostraram ser particularmente úteis na distinção de espécies filogeneticamente próximas (PRANDINI et al., 2013). Inteins são considerados elementos genéticos parasitas, normalmente inseridos em genes codificadores de proteínas, evolutivamente conservados e importantes para o funcionamento celular, os denominados “house-keeping genes” (BONEN & VOGEL, 2001). Caracteristicamente, os inteins são transcritos e traduzidos juntamente com a sequência flanqueadora (extein), e apresentam propriedades de auto-excisão (self-splicing) e religação das sequências flanqueadoras, de forma a minimizar seus efeitos deletérios à célula hospedeira (BONEN & VOGEL, 2001; GOGARTEN et al., 2002). Existem três tipos de inteins na natureza: os inteins completos ou bi-funcionais (também conhecidos como large-inteins ou full-length inteins), os mini-inteins e os split inteins. Os inteins bi-funcionais são constituídos de um domínio responsável pelo splicing proteico (Spl) cujas porções N e C terminais são separadas por um domínio central codificador de uma homing endonuclease (HE) que confere ao intein mobilidade, resultando na ocupação de alelos vazios e duplicação do elemento genético parasita (LIU et al; 2000). Os mini-inteins não possuem o domínio HE

tendo, portanto um domínio Spl contínuo ou os dois domínios Spl separados por pequena sequência (linker, formada restos da HE degenerada). Os split-inteins constituem mini-inteins cujas partes N e C terminais estão separadas ao longo do cromossomo bacteriano (só foram observados em bactérias e arqueas), fragmentando o gene em que está inserido/associado. Após a tradução, as porções N e C terminais se unem, sofrem o splicing e ligam seus exteins em uma reação de *trans-splicing* proteico (WU et al., 1998). Inteins, em especial os bifuncionais, proporcionam excelentes informações filogenéticas, pois apresentam um maior polimorfismo de sequência no domínio HE do que no domínio Spl devido a uma seleção mais “frouxa”, especialmente no caso do domínio HE não estar mais ativo na população (GOGARTEN & HILÁRIO, 2006; THEODORO & BAGAGLI, 2009). Três inteins, presentes nos genes de uma membrana vacuolar ATPase (VMA), da threonyl-tRNA synthetase (ThrRS) e da glutamate synthase (GLT1), são particularmente importantes nas leveduras do gênero *Candida* (FERNANDES et al., 2016). Trabalho recente desenvolvido pelo nosso grupo demonstrou que a análise destes inteins representa uma maneira relativamente simples e eficiente para discriminar as três espécies do grupo *psilosis* (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*), além de também indicar a ocorrência de dois genótipos distintos em isolados de *C. orthopsilosis* (PRANDINI et al., 2013; FERNANDES et al., 2016; SCHRÖDER et al., 2016).

Paralelamente aos métodos de identificação molecular, métodos de tipagem molecular para a diferenciação e detecção dos genótipos vêm evoluindo muito em leveduras e microorganismos em geral. Técnicas como a do cariótipo obtido por eletroforese com alternância do campo elétrico (PFGE, “pulse-field gel electrophoresis”), da análise de polimorfismo de DNA gerado pela amplificação de fragmentos com uso de *primers* arbitrários (RAPD, “random amplified polymorphic DNA”), ou as obtidas pelo polimorfismo de fragmentos

gerados com enzimas de restrição (RFLP, “restriction fragment length polymorphism”), dentre outras, estão sendo frequentemente empregadas na tipagem destes micro-organismos, e vários genes e/ou regiões genômicas, ou o genoma todo, podem ser empregados nestes estudos. A combinação do uso de enzimas de restrição de cortes relativamente pouco frequentes em células na forma de esferoplastos, seguido de PFGE, tem se mostrado bastante útil no rastreamento de genótipos associados a surtos epidêmicos, por possibilitar comparações seguras entre isolados da mesma espécie, porém obtidos de diferentes fontes (CHEN et al., 2005; FILIPPIDI et al., 2014).

Fatores de Virulência (proteínase, fosfolipase e biofilme) em leveduras do complexo *C. parapsilosis*

Em relação aos fatores de virulência, estudos têm demonstrado diferenças significativas na secreção de enzimas hidrolíticas (fosfolipases e proteínases) e produção de biofilme entre essas espécies (RUCHEL et al., 1986; CÁNTON et al., 2011; PRANDINI et al., 2013, NÉMETH et al., 2013; PAMMI et al., 2013). Alguns estudos realizados *in vitro* demonstraram que *C. metapsilosis* é menos virulenta que *C. parapsilosis sensu stricto* e *C. orthopsilosis* (TAVANTI et al., 2005; SILVA et al., 2009; CANTÓN et al., 2011; SAI et al., 2011; NÉMETH et al., 2013; TOSUN et al., 2013). Associados a esses achados, a publicação recente do genoma de *C. orthopsilosis* mostrou que houve uma redução na família de genes associados à patogenicidade quando comparado ao da espécie *C. parapsilosis s.s.* (RICCOMBENI et al., 2012). Portanto, esse fato corrobora com os achados de que um número menor de infecções nosocomiais seja causado por *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, e sugere assim, que essas espécies são menos virulentas que *C. parapsilosis s.s.* (TAVANTI et al., 2005). Estudos recentes descreveram a presença de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* em

menos de 10% dos isolados clínicos. Também já foi reportado que ambas as espécies (*C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) não estão relacionadas ao comensalismo humano (TAVANTI et al., 2005). Blanco-Blanco et al., 2014, em estudo realizado na Espanha, em um hospital terciário, durante o período de junho de 2007 a junho de 2009, observaram que em 36,5% dos casos de candidemias foram isoladas as espécies do grupo *psilosis* (sendo *C. parapsilosis s.s.* em 25% dos casos e *C. orthopsilosis* em 11,5%), seguida de *C. albicans* (30,8%), *C. tropicalis* (11,5%) e *C. glabrata* (11,5%). Embora *C. parapsilosis s.s.* ocorra com maior frequência dentro do grupo *psilosis* e seja mais virulenta que *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, observou-se em uma UTI pediátrica no Brasil três casos de candidemias com óbitos, sendo dois casos por *C. orthopsilosis* e um por *C. metapsilosis* (OLIVEIRA et al., 2014).

A secreção de enzimas hidrolíticas (proteínases e fosfolipases) tem um importante papel na patogênese de doenças causadas pelas espécies pertencentes ao complexo *C. parapsilosis* o que facilita a sua aderência e invasão no tecido hospedeiro e dificultam a ação do sistema imunológico contra a ação dos antimicrobianos (NÉMETH et al., 2013). Em termos de atividade de proteinase e fosfolipase dentro do complexo *C. parapsilosis* há achados contraditórios que enfatizam a hipótese de que a expressão dos fatores de virulência é dependente da amostra (ZICCARDI et al., 2015). Horváth et al. (2012) demonstraram que a secreção de proteinase desempenha um importante papel na virulência de *C. parapsilosis s.s.*, o que parece ser um fator mais prevalente nesta espécie. Outros estudos também detectaram uma maior proporção de secreção de proteinase em isolados de *C. parapsilosis s.s.* com taxas variando de 66,1 a 100% (TAVANTI et al., 2010; GE et al., 2011; ABI-CHACRA et al., 2013; NÉMETH et al., 2013). A produção de fosfolipase parece não ser um fator de virulência significativo dentro das espécies *não-albicans*, pois estudo demonstrou que a

atividade desta enzima ocorre em maiores porcentagens em isolados de *C. albicans* (54 a 73%) quando comparada às demais espécies de *Candida* (2 a 17%) (TAY et al., 2011).

Biofilmes são comunidades de micro-organismos que crescem associados a superfícies ou aderem a elas produzindo uma matriz extracelular (ECM) que é predominantemente formada por polissacarídeos, contendo resíduos de glicose e manose que conferem proteção (CHANDRA et al., 2001; RAMAGE et al., 2012). Podem ser encontrados aderidos a superfícies biológicas, tais como da via oral, mucosa e implantes médicos, os quais atuam como fontes de infecções persistentes. Recentemente, tem sido demonstrado que micro-organismos produtores de biofilme têm uma grande associação com mortalidade quando comparados às células fúngicas planctônicas, pois confere resistência significativa aos antifúngicos e protege as células de leveduras de respostas imunes do hospedeiro (CHANDRA et al., 2001; RAMAGE et al., 2012; TREVIÑO-RANGEL et al., 2015). Assim, os micro-organismos em condições de biofilme normalmente são mais resistentes aos diversos fatores ambientais, ao estresse físico e químico e ainda podem apresentar cooperação metabólica. Os biofilmes também servem como reservatórios de fontes persistentes de infecções em pacientes e têm efeito na saúde de um número aumentado de indivíduos imunocomprometidos (RAMAGE et al., 2012).

Espécies de *Candida*, em geral, são capazes de aderir a superfícies bióticas e abióticas, podendo levar à formação de biofilme, que se comporta como importante fator de virulência nesses micro-organismos (CALDERONE & BRAUN, 1991). Biofilmes em espécies de *Candida* podem se formar em superfícies inertes de dispositivos implantados como cateteres, próteses de válvulas cardíacas, próteses de articulações, entre outros materiais médicos (BRANCHINI et al., 1994; HAWSER & DOUGLAS, 1994; KUMAR & ANAND, 1998; DONLAN, 2001; FUX et al., 2005). Em relação à *C. parapsilosis s.s.*, vários fatores conferem

vantagem seletiva a esta espécie, incluindo as capacidades de proliferar-se em altas concentrações de glicose e de aderência a materiais protéticos (DOUGLAS, 2003).

A produção de biofilme pode ser estimada por vários métodos, incluindo o XTT, que mensura a atividade metabólica das células formadoras de biofilme (CHANDRA et al., 2008; RAMAGE et al., 2012). Kuhn et al. (2002) em estudo envolvendo a produção de biofilme utilizando-se de discos de silicone e XTT comprovaram que *C. albicans* produzem quantidades maiores de biofilme tanto quantitativamente quanto qualitativamente quando comparadas às espécies *não-albicans*, em particular *C. parapsilosis s.s.* Já, as variações nos resultados de produção de biofilme entre as espécies do complexo *C. parapsilosis* podem estar relacionados às diferentes metodologias utilizadas nos estudos ou também ao fato dos isolados serem provenientes de regiões geográficas distintas (TOSUN et al., 2013).

Perfis de susceptibilidade e resistência aos antifúngicos

Os tratamentos das candidemias representam verdadeiros desafios na prática médica, apesar de poder contar com fármacos como os polienos (anfotericina B) e seus derivados lipídicos (anfotericina B lipossomal), os triazóis de amplo espectro (fluconazol, voriconazol, posaconazol), as pirimidinas fluoradas (5-fluorocitosina) e as recentes equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina), as quais apresentam maior segurança e melhores perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos (GARCÍA-AGUDO & GARCÍA-MARTOS, 2009). O fármaco anfotericina B apresenta vários efeitos adversos, destacando-se o seu alto potencial nefrotóxico, sendo muitas vezes, necessários ajustes em suas dosagens quando administrados em pacientes com disfunção renal. Na tentativa de diminuir seus efeitos adversos, foi lançado no mercado, na década de 1990, o fármaco anfotericina B lipossomal (comercialmente são utilizadas duas preparações lipossomais Fungisome e Ambisome), o qual

é menos nefrotóxico que a anfotericina B convencional (RESENDE, 2002; SIDRIM & ROCHA, 2004). Em estudo multicêntrico, Pachón et al. (2006) avaliaram a eficácia e segurança dos fármacos anfotericina B e fluconazol e obtiveram uma taxa de eficácia equivalente para ambos os fármacos testados (70% para fluconazol X 79% para anfotericina B), porém o fluconazol apresenta uma toxicidade renal significativamente menor quando comparado à anfotericina B (2% fluconazol X 37% anfotericina B), confirmando assim um melhor perfil de segurança (GARCIA-EFFRON et al., 2009).

Com os avanços na terapia antifúngica e na tentativa de diminuir seus efeitos adversos, novos fármacos foram introduzidos no mercado, a partir de 2001, como as equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina). A introdução desses fármacos contribuiu com um importante avanço no tratamento das infecções fúngicas por reduzir os problemas de resistência cruzada aos azóis e toxicidade associada aos fármacos polienos. Esta nova classe de antifúngicos possui um mecanismo inovador, pois são os únicos que atuam na inibição irreversível da síntese de (1,3)-beta-D-glucana, que é um polissacarídeo essencial presente na parede de fungos patogênicos, e, além disso, possuem uma atividade fungicida contra a maioria das espécies de *Candida*, sendo, portanto, um dos fármacos de escolha utilizados no tratamento das candidemias (SIDRIM & ROCHA, 2004; GARCÍA-AGUDO & GARCÍA-MARTOS, 2009; MURRAY et al., 2010, PFALLER et al., 2011). O crescente uso desses agentes tem proporcionado o aparecimento de espécies resistentes às equinocandinas. Essa resistência, embora raramente encontrada em espécies de *Candida* (cujas taxas de prevalência variam entre 2,9 e 3,1% dos casos), está relacionada a mutações nos genes Fks1 e Fks2, com substituições de aminoácidos em regiões conservadas das proteínas Fks, como as observadas em duas regiões conservadas (*hot spot 1* e *hot spot 2*) de Fks1p (uma das subunidades presentes na enzima D-glucana sintase, com função catalítica) que resulta em isolados com

MICs elevados, susceptibilidade diminuída e consequente falha na terapêutica (PERLIN, 2007; GARCIA-EFFRON et al., 2008, 2009; PFALLER et al., 2011; BEYDA et al., 2012). É importante salientar que as equinocandinas, em especial a caspofungina, apresenta eficácia diminuída contra *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, o que está relacionada à ocorrência de variantes naturais em Fks1 (MURRAY et al., 2010; BEYDA et al., 2012; FLEVARI et al., 2013). Assim, torna-se necessário avaliar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos nas espécies pertencentes ao complexo *C. parapsilosis*, pois essas espécies tendem a apresentar valores altos de MIC para as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) (GARCIA-EFFRON et al., 2008; PFALLER et al., 2008; PFALLER et al., 2010; TORTORANO et al., 2013). Além disso, estudos moleculares têm indicado a presença de uma mutação natural que induz a substituição de um resíduo (prolina para alanina) na posição 660 de Fks1 que está associada à resistência às equinocandinas (GARCIA-EFFRON et al., 2008).

JUSTIFICATIVAS DO TRABALHO

Diante do exposto, nota-se que o espectro de candidemias tem mudado com a emergência das espécies *Candida não-albicans*, levando a um aumento na morbidade e mortalidade e na resistência às drogas antifúngicas em pacientes hospitalizados em UTIs. Com isso, a correta identificação das espécies de *Candida* e o conhecimento dos possíveis fatores ambientais associados poderão contribuir de forma significativa na elucidação das diferentes formas de aquisição da infecção, tanto as adquiridas por ativação endógena, e principalmente as adquiridas de fontes exógenas (ar, superfícies e mãos de profissionais de saúde). De particular interesse neste trabalho foi aprofundar o conhecimento da ecoepidemiologia do complexo *C. parapsilosis*, dado a sua ocorrência relativamente alta em

nostros hospitais. Dessa forma, procurou-se aqui organizar e responder pelo menos parte das seguintes perguntas: a) teriam todas as espécies do grupo *psilosis* a mesma capacidade de colonização das mãos de profissionais da saúde e também do ambiente físico hospitalar? b) quais são os principais fatores de virulência associados a cada uma destas espécies que explicariam suas diferentes incidências e sua provável influência no desfecho clínico? c) qual/quais os perfis de susceptibilidade aos antifúngicos nos diferentes isolados deste grupo e possíveis mecanismos moleculares de resistência, em especial para as equinocandinas? d) quais são os possíveis significados (biológico e clínico) da provável ocorrência de dois subgrupos geneticamente distintos dentro de *C. orthopsisilosis*? Espera-se que os resultados forneçam informações relevantes para o entendimento dos aspectos microbiológicos e ambientais das candidemias em nosso meio, em particular das espécies pertencentes ao complexo *C. parapsilosis* que ainda é pouco compreendido, e assim contribuir para a melhoria da qualidade de vida e sobrevida destes pacientes.

OBJETIVO GERAL

Caracterizar os aspectos microbiológicos e ambientais das candidemias, com especial atenção para o complexo *Candida parapsilosis*, no hospital terciário HC/FMB/UNESP, Botucatu, localizado na região Centro-Sul do estado de São Paulo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Estimar as frequências de candidemias causadas pelo complexo *C. parapsilosis* das diferentes enfermarias e das UTIs Central e Neonatal do HC/FMB/UNESP, Botucatu, retrospectivamente, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2013; e prospectivamente, num período de 12 meses (de julho de 2014 a julho de 2015);

- b) Identificar as leveduras pertencentes ao complexo *C. parapsilosis* isoladas de mãos de profissionais de saúde (equipe de enfermagem), do ar e superfícies das UTIs Central e Neonatal do HC/FMB/UNESP, Botucatu, SP, prospectivamente em um período de 12 meses (de julho de 2014 a julho de 2015);
- c) Identificar por métodos morfofisiológicos e moleculares pelo sequenciamento de regiões de rDNA (ITS1/ITS2 ou D1/D2) e pelo uso de inteiins VMA e ThrRS as espécies pertencentes ao complexo *C. parapsilosis*;
- d) Determinar o perfil de virulência (produção de proteinase, fosfolipase e biofilme) em isolados do complexo *C. parapsilosis* de hemoculturas, do ar, superfícies e mãos dos profissionais de saúde;
- e) Determinar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, voriconazol, caspofungina e micafungina nos isolados clínicos pertencentes ao complexo *C. parapsilosis* e sua correlação com os padrões gênicos de Fks1 (para a verificação de diminuição da susceptibilidade ou resistência às equinocandinas);
- f) Correlacionar os dados dos pacientes (sexo, idade, enfermarias, recidivas, fatores de virulência, susceptibilidade aos antifúngicos e espécies do complexo *C. parapsilosis*) com os desfechos clínicos dos pacientes.

REFERÊNCIAS

ABI-CHACRA, É. A. et al. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 8, p. 831–48, 2013.

ALANGADEN, G. J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and

Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 25, n. 1, p. 201–225, 2011.

ALENCAR, D.E. et al. Candidaemia due to *Candida parapsilosis* species complex at a hospital in Brazil: Clinical characteristics and antifungal susceptibility profile. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 34, n. 2, p. 106–108, 2017.

ALMIRANTE, B. et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1829–35, 2005.

ALMIRANTE, B. et al. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1681–5, 2006.

APERIS, G. et al. Developments in the treatment of candidiasis: more choices and new challenges. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 15, n. 11, p. 1319–36, 2006.

ARENDRUP, M. C. Epidemiology of invasive candidiasis. **Current Opinion in Critical Care**, v. 16, n. 5, p. 445–452, 2010.

BAGAGLI, E.; MARQUES, S. A. Micologia Médica Molecular: impacto na epidemiologia e ecologia dos fungos. In: **Compendio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 123–137.

BAJWA, S.; KULSHRESTHA, A. Fungal infections in intensive care unit: Challenges in diagnosis and management. **Annals of Medical and Health Sciences Research**, v. 3, n. 2, p. 238, 2013.

BECK-SAGUÉ, C.; JARVIS, W. R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 5, p. 1247–51, 1993.

BEN-AMI, R. et al. Multidrug-Resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, 2017.

BEYDA, N. D.; LEWIS, R. E.; GAREY, K. W. Echinocandin Resistance in *Candida* Species: Mechanisms of Reduced Susceptibility and Therapeutic Approaches. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 46, n. 7–8, p. 1086–1096, 2012.

BLANCO-BLANCO, M. T. et al. *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital: incidence, epidemiology and antifungal susceptibility. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 2, p. 145–8, 2014.

BONEN, L.; VOGEL, J. The ins and outs of group II introns. **Trends in Genetics : TIG**, v. 17, n. 6, p. 322–31, 2001.

BORMAN, A. M.; SZEKELY, A.; JOHNSON, E. M. Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. **mSphere**, v. 1, n. 4, p. e00189-16, 2016.

BRANCHINI, M. L. et al. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 452–6, 1994.

BRIELAND, J. et al. Comparison of pathogenesis and host immune responses to *Candida glabrata* and *Candida albicans* in systemically infected immunocompetent mice. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 5046–55, 2001.

BRUDER-NASCIMENTO A. et al. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Res Notes**, v.3, n.1, p.1, 2010.

BUTLER, M. I.; POULTER, R. T. M. The PRP8 inteins in *Cryptococcus* are a source of phylogenetic and epidemiological information. **Fungal Genetics and Biology : FG & B**, v. 42, n. 5, p. 452–63, 2005.

CALDERONE, R. A.; BRAUN, P. C. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 1–20, 1991.

CALVO, B. et al. First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. **The Journal of Infection**, v. 73, n. 4, p. 369–74, 2016.

CANTÓN, E. et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5590–6, 2011.

CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genetics and Biology : FG & B**, v. 45, n. 5, p. 605–12, 2008.

CHAKRABARTI, A. et al. Change in distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from candidemia cases in a tertiary care center during 1996-2000. **Indian Journal of Medical Research**, v.116, p.5-12, 2002.

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385–94, 2001.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. *In vitro* growth and analysis of *Candida* biofilms. **Nature Protocols**, v. 3, n. 12, p. 1909–1924, 2008.

CHANG, M. R. et al. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 50, n. 5, p. 265–8, 2008.

CHEN, K.-W. et al. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. Pt 3, p. 249–58, 2005.

CHEN, Y. C. et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2302–10, 2000.

CHEN, Y. C. et al. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4042–51, 2001.

CHOW, J. K. et al. Factors Associated with Candidemia Caused by *Non-albicans Candida* Species Versus *Candida albicans* in the Intensive Care Unit. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 8, p. 1206–1213, 2008.

CHOWDHARY, A. et al. New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 10, p. 1670–3, 2013.

CHOWDHARY, A. et al. Multidrug-resistant endemic clonal strain of *Candida auris* in India. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 919–26, 2014.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006290, 2017.

CIARDO, D. E. et al. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 77–84, 2006.

COLOMBO, A. L. et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 5, p. 570–6, 2007.

COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: an Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. [Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599–607, 2003.

COLOMBO, A. L. et al. **Contribuições para o entendimento da epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp.** Tese para obtenção do título de livre docência apresentada a Universidade Federal de São Paulo, SP, 2003.

CORDEIRO, R. A. et al. Isolation of pathogenic yeasts in the air from hospital environments in the city of Fortaleza, northeast Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: an**

Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases, v. 14, n. 1, p. 30–4, 2010.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S. et al. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 365–74, 2008.

DA SILVA, B. V. et al. Species Distribution, Virulence Factors, and Antifungal Susceptibility Among *Candida parapsilosis* Complex Isolates Recovered from Clinical Specimens. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5–6, p. 333–43, 2015.

DING, X. et al. Epidemiology and risk factors for nosocomial *Non-Candida albicans* candidemia in adult patients at a tertiary care hospital in North China. **Medical Mycology**, v. 53, n. 7, p. 684–90, 2015.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 277–81, 2001.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 30–6, 2003.

EDMOND, M. B. et al. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. **Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 29, n. 2, p. 239–44, 1999.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 3, n. 11, p. 685–702, 2003.

EMARA, M. et al. *Candida auris* candidemia in Kuwait, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 1091–2, 2015.

FERNANDES, J. A. L. et al. Evolution and Application of Inteins in *Candida* species: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1585, 2016.

FILIPPIDI, A. et al. The effect of maternal flora on *Candida* colonisation in the neonate. **Mycoses**, v. 57, n. 1, p. 43–8, 2014.

FLEVARI, A. et al. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. **Clinical Interventions in Aging**, v. 8, p. 1199–208, 2013.

FRIDKIN, S. K.; JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 499–511, 1996.

FUX, C. A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 34–40, 2005.

GARCÍA-AGUDO, R.; GARCÍA-MARTOS, P. [Clinical and microbiological aspects of fungal peritonitis in peritoneal dialysis]. **Nefrología : Publicacion Oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia**, v. 29, n. 6, p. 506–17, 2009.

GARCIA-EFFRON, G. et al. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2305–12, 2008.

GARCIA-EFFRON, G.; PARK, S.; PERLIN, D. S. Correlating Echinocandin MIC and Kinetic Inhibition of fks1 Mutant Glucan Synthases for *Candida albicans*: Implications for

Interpretive Breakpoints. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 112–122, 2009.

GE, Y. P. et al. *In vitro* evaluation of phospholipase, proteinase, and esterase activities of *Candida parapsilosis* and *Candida metapsilosis*. **Mycopathologia**, v. 172, n. 6, p. 429–38, 2011.

GOGARTEN, J. P. et al. Inteins: Structure, Function, and Evolution. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 263–287, 2002.

GOGARTEN, J. P.; HILARIO, E. Inteins, introns, and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, n. 1, p. 94, 2006.

GONZÁLEZ, G. M.; ELIZONDO, M.; AYALA, J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 9, p. 2902–5, 2008.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 915–21, 1994.

HORVÁTH, P. et al. The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in *Candida parapsilosis* virulence. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 6, p. 923–33, 2012.

HUANG, Y. C. et al. Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. **Infection**, v. 27, n. 2, p. 97–102, 1999.

IPEK, M. S. et al. Changing pattern of *Candida* species in a neonatal intensive care unit. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, p. 333; author reply 334, 2011.

JARVIS, W. R.; MARTONE, W. J. Predominant pathogens in hospital infections. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 29 Suppl A, p. 19–24, 1992.

KASUGA, T. et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 12, p. 3383–401, 2003.

KHILLAN, V. et al. A rare case of breakthrough fungal pericarditis due to fluconazole-resistant *Candida auris* in a patient with chronic liver disease. **JMM Case Reports**, v. 1, n. 3, 2014.

KIM, M.-N. et al. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. **Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 48, n. 6, p. e57-61, 2009.

KUHN, D. M. et al. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 878–88, 2002.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 1–2, p. 9–27, 1998.

LEAW, S. N. et al. Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 693–699, 2006.

LEE, W. G. et al. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*.

Journal of Clinical Microbiology, v. 49, n. 9, p. 3139–42, 2011.

LIN, D. et al. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources.

Journal of Clinical Microbiology, v. 33, n. 7, p. 1815–21, 1995.

LIU, D. et al. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 493–7, 2000.

LOCKHART, S. R. et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 64, n. 2, p. 134–140, 2017.

LUPETTI, A. et al. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2363–9, 2002.

MAGOBO, R. E. et al. *Candida auris* – Associated Candidemia, South Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 1250–1, 2014.

MARCHETTI, O. et al. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. **Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 38, n. 3, p. 311–20, 2004.

MARTIN, G. S. et al. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1546–1554, 2003.

MEDRANO, D. J. A. et al. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 1, p. 17–20, 2006.

MENEZES, R. DE P. et al. FREQUENCY OF *Candida* SPECIES IN A TERTIARY CARE HOSPITAL IN TRIANGULO MINEIRO, MINAS GERAIS STATE, BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, n. 3, p. 185–91, 2015.

MORALES-LÓPEZ, S. E. et al. Invasive Infections with Multidrug-Resistant Yeast *Candida auris* , Colombia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 162–164, 2017.

MORAN, G.P; SULLIVAN, D.J; COLEMAN, D.C. Emergence of *non-Candida albicans* and *Candida* species as pathogens. In *Candida* and Candidiasis. Edited by CALDERONE R.A.Washington D.C.: **ASM** p.341-48, 2002.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.681-693.

NAKAMURA, T.; TAKAHASHI, H. Epidemiological study of *Candida* infections in blood: susceptibilities of *Candida* spp. to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 12, n. 3, p. 132–138, 2006.

NÉMETH, T. et al. Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species. **PloS One**, v. 8, n. 7, p. e68704, 2013.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561–570, 2010.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e59373, 2013.

ODDS, F. C. et al. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. Pt 8, p. 1066–75, 2007.

OLIVEIRA, V. K. P. et al. Candidemia and death by *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in neonates and children. **Pediatrics and Neonatology**, v. 55, n. 1, p. 75–6, 2014.

PACHÓN, J. et al. [Treatment of invasive fungal infections. 2005. Andalusian Infectious Disease Society]. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 24, n. 4, p. 254–63, 2006.

PAMMI, M. et al. *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 5, p. e206-16, 2013.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive Fungal Infections among Organ Transplant Recipients: Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). **doi.org**, v. 50, n. 8, p. 1101–1111, 2010.

PARMELAND, L. et al. *Candida albicans* and *non-Candida albicans* fungemia in an institutional hospital during a decade. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 33–7, 2013.

PATTERSON, T. F. Advances and challenges in management of invasive mycoses. **Lancet (London, England)**, v. 366, n. 9490, p. 1013–25, 2005.

PEREIRA, G. H. et al. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of *non-C. albicans* *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 48, n. 6, p. 839–42, 2010.

PERLIN, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resistance Updates**, v. 10, n. 3, p. 121–130, 2007.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical Mycology**, v. 45, n. 4, p. 321–346, 2007.

PFALLER, M. A. et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3254–9, 2001.

PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1735–1745, 2007.

PFALLER, M. A. et al. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 842–9, 2008.

PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1366–77, 2010.

PFALLER, M. A. et al. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 561–6, 2011.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3551–7, 2002.

PRANDINI, T. H. R. et al. Analysis of inteins in the *Candida parapsilosis* complex for simple and accurate species identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 9, p. 2830–6, 2013.

PRYSZCZ, L. P. et al. Genome comparison of *Candida orthopsilosis* clinical strains reveals the existence of hybrids between two distinct subspecies. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 5, p. 1069–78, 2014.

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

RAMAGE, G. et al. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

RANGEL-FRAUSTO, M. S. et al. National Epidemiology of Mycoses Survey (NEMIS): Variations in Rates of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species in Seven Surgical Intensive Care Units and Six Neonatal Intensive Care Units. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 2, p. 253–258, 1999.

RANI, R. et al. Changing trends of *Candida* species in neonatal septicaemia in a tertiary North Indian hospital. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 42–4, 2002.

RESENDE, J. C. P. **Análise fenotípica e genotípica de amostras de *Candida* spp. de origem humana e ambiental.** 2002. 118f. Tese (Doutorado) da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

RICCOMBENI, A. et al. Sequence and Analysis of the Genome of the Pathogenic Yeast *Candida orthopsilosis*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35750, 2012.

RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56 Suppl 1, n. suppl 1, p. i5–i11, 2005.

RODERO, L. et al. [Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina]. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 37, n. 4, p. 189–95, 2005.

RÜCHEL, R. et al. Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of the enzyme during infection in vitro. **Infect Immunology**, v.53, p. 411-419, 1986.

RUDRAMURTHY, S. M. et al. *Candida auris* candidaemia in Indian ICUs: analysis of risk factors. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 6, p. 1794–1801, 2017.

SABINO, R. et al. Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 180, 2011.

SAI, S. et al. Evolution of mating within the *Candida parapsilosis* species group. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 4, p. 578–87, 2011.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science (New York, N.Y.)**, v. 230, n. 4732, p. 1350–4, 1985.

SALES-JÚNIOR, J. A. L. et al. [An epidemiological study of sepsis in Intensive Care Units: Sepsis Brazil study]. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 9–17, 2006.

SCHELENZ, S. et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a

European hospital. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 5, n. 1, p. 35, 2016.

SCHRÖDER, M. S. et al. Multiple Origins of the Pathogenic Yeast *Candida orthopsilosis* by Separate Hybridizations between Two Parental Species. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 11, p. e1006404, 2016.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, A. P. et al. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2392–7, 2009.

STORTI, L. R. et al. *Candida* spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the Pediatric Unit at the University Hospital of the Jundiaí Medical College, State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 225–31, 2012.

TAVANTI, A. et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284–92, 2005.

TAVANTI, A. et al. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1455–62, 2007.

TAVANTI, A. et al. Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis sensu stricto* strains isolated from different geographic regions and body sites. **BMC Microbiology**,

v. 10, n. 1, p. 203, 2010.

TAY, S. T. et al. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. **Medical Mycology**, v. 49, n. 5, p. 556–60, 2011.

THEODORO, R. C.; BAGAGLI, E. Inteins in pathogenic fungi: a phylogenetic tool and perspectives for therapeutic applications. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 497–504, 2009.

TORTORANO, A. M. et al. A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. **Infection**, v. 41, n. 3, p. 655–62, 2013.

TOSUN, I. et al. Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from clinical samples. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 483–92, 2013.

TREVIÑO-RANGEL, R. DE J. et al. Evaluation of *in vivo* pathogenicity of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* with different enzymatic profiles in a murine model of disseminated candidiasis. **Medical Mycology**, v. 52, n. 3, p. 240–5, 2014.

TROFA, D.; GACSER, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606–625, 2008.

VALLABHANENI, S. et al. Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus — United States, May 2013–August 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 44, p. 1234–1237, 2016.

VERMA, A. K. et al. Candidaemia in patients of a tertiary health care hospital from north India. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 117, p. 122–8, 2003.

VOSS, A. et al. Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in five Dutch university hospitals. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 909–12, 1996.

WEEMS, J. J. et al. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 1029–32, 1987.

WEY, S. B. et al. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. **Archives of Internal Medicine**, v. 148, n. 12, p. 2642–5, 1988.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 39, n. 3, p. 309–17, 2004.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 1, p. 78–81, 2014.

WU, H.; HU, Z.; LIU, X. Q. Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC6803. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 16, p. 9226–31, 1998.

ZAOUTIS, T. E. et al. The Epidemiology and Attributable Outcomes of Candidemia in

Adults and Children Hospitalized in the United States: A Propensity Analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 9, p. 1232–1239, 2005.

ZICCARDI, M. et al. *Candida parapsilosis (sensu lato)* isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. **International Journal of Medical Microbiology : IJMM**, v. 305, n. 8, p. 848–59, 2015.