



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS
RELAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO**

LAÍS CARNEIRO NAZIASENE LIMA

**Identificação das espécies de *Candida*, avaliação da ultraestrutura e
perfil de suscetibilidade de biofilmes aos antifúngicos**

**Goiânia
2014**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Laís Carneiro Naziasene Lima		
E-mail:	laiscnlima@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	☒ Sim	☐ Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás	Sigla:	FAPEG
País:	Brasil	UF:	GO
		CNPJ:	08.156.102/0001-02
Título:	Identificação das espécies de <i>Candida</i> , avaliação da ultraestrutura e perfil de suscetibilidade de biofilmes aos antifúngicos		
Palavras-chave:	Biofilme. <i>Candida</i> spp.. Microscopia eletrônica de varredura. PCR em tempo real multiplex. Teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> .		
Título em outra língua:	Identification of <i>Candida</i> species, evaluation of the ultrastructure and susceptibility profile of biofilms to antifungal agents		
Palavras-chave em outra língua:	Biofilm. <i>Candida</i> spp.. Scanning electron microscopy. Real-time multiplex PCR. <i>In vitro</i> susceptibility testing		
Área de concentração:	Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	08/05/2014		
Programa de Pós-Graduação:	Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro		
Orientador (a):	Carolina Rodrigues Costa		
E-mail:	carolrc80@yahoo.com.br		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do (a) autor (a)

Data: ____ / ____ / ____

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

LAÍS CARNEIRO NAZIASENE LIMA

**Identificação das espécies de *Candida*, avaliação da ultraestrutura e
perfil de suscetibilidade de biofilmes aos antifúngicos**

Dissertação de Mestrado apresentado
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia das Relações Parasito-
Hospedeiro da Universidade Federal de
Goiás para obtenção do Título de
Mestre

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina
Rodrigues Costa

**Goiânia
2014**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Lima, Laís Carneiro Naziasene
Identificação das espécies de Candida, avaliação da ultraestrutura e
perfil de suscetibilidade de biofilmes aos antifúngicos [manuscrito] /
Laís Carneiro Naziasene Lima. - 2014.
xvi, 83 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Rodrigues Costa.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós
Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2014.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Biofilme. 2. Candida spp.. 3. Microscopia eletrônica de varredura.
4. PCR em tempo real multiplex. 5. Teste de suscetibilidade in vitro. I.
Costa, Carolina Rodrigues, orient. II. Título.

**Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-
Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: Laís Carneiro Naziasene Lima

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Rodrigues Costa

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Carolina Rodrigues Costa

2. Prof^a. Dr^a. Maria do Rosário Rodrigues da Silva

3. Prof^a. Dr^a. Rosália Santos Amorim Jesuino

Data: 08/05/2014

"Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos".

Friedrich Nietzsche

DEDICATÓRIA...

Dedico esta dissertação aos meus pais, Ângela Carneiro Naziasene Lima e Jonei Naziasene Lima, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e ao meu marido, Ricardo Neves Marreto, por sua dedicação, carinho e compreensão que garantiram que esse meu sonho se tornasse possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todo amparo e pela força nos momentos de dificuldades.

Agradeço em especial a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Carolina Rodrigues Costa que acreditou na minha capacidade, me mostrou o caminho a ser seguido e fez parte em diversos momentos dessa minha caminhada. As professoras do laboratório de micologia do IPTSP/UFG, Dr^a. Maria do Rosário Rodrigues Costa, Dr^a. Lucia Kioko Hasimoto e Souza e Dr^a. Orionalda de Fátima L. Bernardes, companheiras sempre presentes e prontificadas a ajudar no necessário. Aos colegas do laboratório que fizeram parte dessa rotina trazendo felicidade em momentos de sacrifício, em particular ao Fernando Yano Abrão que sempre me apoiou, acalmou e ajudou em todos os momentos.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (Labmic) da Faculdade de Física/UFG, pela ajuda da Tatiane Oliveira dos Santos, por toda a disponibilidade e desenvolvimento de parte experimental deste trabalho.

Aos professores Dr. André Kipnis e Dr^a. Menira Borges de Lima Dias e Souza que muito auxiliaram no desenvolvimento dos procedimentos de biologia molecular.

Ao programa de pós-graduação Biologia das Relações Parasito Hospedeiro do IPTSP/UFG, sob coordenação do professores Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira e Dr^a. Menira Borges de Lima Dias e Souza, o qual tenho orgulho de fazer parte e a FAPEG pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	xi
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1 GENERALIDADES	1
1.2 INFECÇÕES HOSPITALARES POR <i>Candida</i> spp.	1
1.2.1 <i>Candida albicans</i>	3
1.2.2 <i>Candida parapsilosis</i>	3
1.2.3 <i>Candida tropicalis</i>	4
1.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Candida</i>	4
1.3.1 Reação em cadeia da polimerase em tempo real	5
1.3.1.1 Amplificação em região do DNA ribossomal	7
1.3.1.2 Diferenciação de espécies pela temperatura de fusão dos amplicons	8
1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA	10
1.4.1 Aderência	10
1.4.2 Morfogênese	10
1.4.3 Secreção de enzimas hidrolíticas.....	12
1.4.4 Formação de biofilme.....	13
1.4.4.1 Avaliação ultraestrutural do biofilme.....	14
1.4.4.2 Resistência a agentes antifúngicos associada ao biofilme	15
1.5 ANTIFÚNGICOS NO TRATAMENTO DA CANDIDÍASE: MECANISMO DE AÇÃO E DE RESISTÊNCIA	17
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 OBJETIVO GERAL.....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22

4 MÉTODOS	23
4.1 AMOSTRAS	23
4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Candida</i>	23
4.2.1 CHROMagar	23
4.2.2 Técnica de assimilação de carbono	24
4.2.3 Formação de Clamidoconídios	25
4.3 PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES.....	25
4.3.1 Extração de DNA.....	25
4.3.2 PCR em tempo real multiplex	26
4.3.2.1 Oligonucleotídeos	26
4.3.2.2 Reação de qPCR multiplex	27
4.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME	27
4.4.1 Avaliação ultraestrutural do biofilme por microscopia eletrônica de varredura.....	30
4.5 SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i>	30
4.5.1 Antifúngicos.....	30
4.5.2 Procedimento da metodologia de suscetibilidade <i>in vitro</i> para células planctônicas	31
4.5.3 Procedimento da metodologia de suscetibilidade <i>in vitro</i> para as células sésseis	33
4.6 ESTATÍSTICA	35
5 RESULTADOS	36
5.1 PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Candida</i>	36
5.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME	37
5.4 TESTES DE SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i>	40
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS	60
Anexo 1: Parecer Comitê de Ética I.....	60
Anexo 2: Parecer Comitê de Ética II.....	61
Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido I.....	62

Anexo 4: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido II	64
Anexo 5. Artigo: Identification of <i>Candida</i> species, evaluation of ultrastructure and susceptibility profile of biofilms to antifungals	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curva de fluorescência da qPCR. Linha “threshold”: limiar de fluorescência. Fase log: amplificação exponencial. Fase platô: não ocorrem amplificações (saturação da reação). Fonte: adaptado de Kubista et al. (2006). 6
- Figura 2.** Estrutura molecular do corante fluorescente derivado de cianina assimétrica. Fonte: Kubista et al. (2006). 7
- Figura 3.** Transcrição tricistrônica do rDNA. As subunidades 18S, 5.8S e 28S são transcritas a partir de uma única sequência de DNA, enquanto que a subunidade 5S é transcrita em outro local. 8
- Figura 4.** Gráfico da curva de fusão em relação à fluorescência normalizada demonstrando a fase de fusão. 9
- Figura 5.** Gráfico da curva de fusão em relação à derivada negativa taxa de variação da temperatura. A T_f corresponde ao ponto de inflexão da curva (região em que metade dos produtos está em fita simples). 9
- Figura 6.** Morfologia de pseudo-hifa e hifa. A) Hifa; B) Pseudo-hifa, as setas apontam o local de constrição das pseudo-hifas; barra = 10 μ m. Fonte: adaptado de Sudbery et al. (2004). 11
- Figura 7.** Mecanismo de patogenicidade das hifas de *C. albicans*. A) Lesão e invasão tecidual. B) Lesão tecidual endotelial e disseminação. Fonte: adaptado de Gow et al. (2012). C) Lise de macrófagos. Fonte: Jimenez-Lopez & Lorenz (2013). 12
- Figura 8.** Desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*. A) Aderência das leveduras ao substrato; B) Proliferação; C) Maturação do biofilme; D) Etapa de dispersão com formação de células leveduriformes não aderentes. Fonte: adaptado de Douglas (2003). 14
- Figura 9.** Ultraestrutura da espécie *C. albicans*. Apresentação de camada basal com leveduras e camada de hifas menos compacta. Imagem por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Barra = 10 μ m. Fonte: Thein et al. (2007). 14
- Figura 10.** A) Ultraestrutura da espécie *C. parapsilosis* com grande maioria de blastoconídios. Imagem por MEV (barra = 20 μ m). Fonte: Lattif et al. (2010). B) Ultraestrutura da espécie *C. tropicalis*; evidência de estruturas filamentosas. Imagem por MEV (barra = 10 μ m). Fonte: Bizerra et al. (2008). 15
- Figura 11.** Esquema representativo dos alvos para os fármacos antifúngicos utilizados no tratamento da candidíase. Fonte: adaptado de Kathiravan et al. (2012). 19
- Figura 12.** Macroscopia das colônias de *Candida* em meio CHROMagar. A: *C. albicans* (colônias verdes). B: *C. tropicalis* (colônias azuis). C: outras espécies de *Candida*. Fonte: adaptado de Horvath et al. (2003). 24
- Figura 13.** Placa de petri mostrando assimilação de carbono. Os halos opacos ao redor da glicose, sacarose, maltose, trealose, celobiose e galactose mostram assimilação positiva do microrganismo. Fonte: Laboratório de Micologia – IPTSP/UFG. 24
- Figura 14.** Microscopia óptica (400x) de clamidoconídios produzidos em ágar Corn Meal. Fonte: Laboratório de Micologia – IPTSP/UFG. 25

Figura 15. Estratégia da qPCR multiplex. Organização dos genes ribossomais com os alvos e sentidos dos oligonucleotídeos universal e específicos indicados pelas setas.	27
Figura 16. Gráfico da curva de fusão das espécies de <i>Candida</i> . A) <i>C. albicans</i> B) <i>C. parapsilosis</i> C) <i>C. tropicalis</i> . A linha inferior é o controle negativo.	37
Figura 17. Ultraestrutura do biofilme das espécies de <i>Candida</i> formado em tiras de cateter venoso periférico de poliuretano. Microscopia eletrônica de varredura (MEV), 100 X, a barra representa 100 µm.	38
Figura 18. Ultraestrutura do biofilme das espécies de <i>Candida</i> . A) <i>C. albicans</i> B) <i>C. parapsilosis</i> C) <i>C. tropicalis</i> . Microscopia eletrônica de varredura (MEV), 1500 X, a barra representa 10 µm.	39
Figura 19. Resultado do teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> das células planctônicas e sésseis frente aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol. Os valores expressos nas colunas são as médias e as barras representam o desvio padrão.	42

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Etapas necessárias para o procedimento de avaliação da formação de células sésseis pelas espécies de <i>Candida</i>	29
Fluxograma 2. Etapas necessárias para o procedimento teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> das células planctônicas.	32
Fluxograma 3. Etapas necessárias para o procedimento teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> de células sésseis para fungos do gênero <i>Candida</i>	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Distribuição de frequência das cinco espécies de <i>Candida</i> mais prevalentes em estudos epidemiológicos de candidemia.	2
Quadro 2. Valores definidos para o teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> de células planctônicas das espécies de <i>Candida</i>	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos universal* e específicos utilizados na amplificação das espécies de <i>Candida</i>	26
Tabela 2. Resultado do teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> de células planctônicas das espécies de <i>Candida</i> frente aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol.....	40
Tabela 3. Variação da concentração inibitória mínima das células sésseis das espécies de <i>Candida</i> testadas frente aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol.	41

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>CDR1</i>	Gene codificante para a proteína de multirresistência
CF	Curva de fusão
CIMp	Concentração inibitória mínima das células planctônicas
CIMs	Concentração inibitória mínima das células sésseis
CNA	<i>Candida</i> não <i>albicans</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
<i>ERG3</i>	Gene codificante para a enzima C-5 esterol desaturase
<i>ERG6</i>	Gene codificante para a enzima Δ -(24)-esterol metiltransferase
<i>ERG11</i>	Gene codificante para a enzima 14- α -demetilase
ETS	Espaço transcrito externo
FB	Formação de biofilme
<i>FKS1P</i>	Gene codificante da subunidade catalítica de 1,3- β -D-glucana
ITS	Espaço transcrito interno
<i>MDR1</i>	Gene codificante para a proteína principal facilitadora de transporte
ME	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Sal tetrazólio - brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NTS	Espaço não transcrito
PU	Poliuretano
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
rDNA	DNA ribossomal
rRNA	RNA ribossomal
Tf	Temperatura de fusão

RESUMO

O aumento no número de infecções fúngicas por espécies de *Candida*, como resultado do expressivo aumento de pacientes imunocomprometidos destaca a importância de estudos relacionados a esse gênero. A resistência destas leveduras aos fármacos antifúngicos é observada em isolados específicos, assim como em infecções associadas com a formação de biofilme (FB). O objetivo deste estudo foi comparar o perfil de suscetibilidade *in vitro* de células sésseis e planctônicas de diferentes isolados de *Candida*, diferenciando as espécies por qPCR multiplex e microscopia eletrônica de varredura. A amostra foi composta de 10 *C. albicans*, 10 *C. parapsilosis* e 1 *C. tropicalis*. O material genético foi extraído pelo método de extração fenol-clorofórmio da amostra de *C. tropicalis*, ATCC 28367 (*C. albicans*) e ATCC 22019 (*C. parapsilosis*) para utilização no ensaio espécie-específico qPCR multiplex com avaliação das diferenças na curva de fusão. Foram realizados teste de microdiluição em placa e redução do sal tetrazólio para 21 isolados a fim de determinar a suscetibilidade de células livres e sésseis, respectivamente. A avaliação da ultraestrutura do biofilme foi realizada em tiras de poliuretano com visualização por microscopia eletrônica de varredura. Os produtos amplificados de *C. albicans*, obtiveram três picos de fusão com valores de 75,2°C, 76,8°C e 79,8°C, enquanto *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* mostraram um pico de valores 73,5°C e 78,5°C, respectivamente. O teste de identificação apresentou-se confiável para a identificação das espécies mais comuns no estudo. Todas as leveduras de *Candida* foram capazes de formar biofilme com organização própria de cada espécie. O teste de suscetibilidade *in vitro* das células planctônicas demonstrou que anfotericina B e caspofungina apresentaram melhor atividade em comparação com o fluconazol e voriconazol que obtiveram 19% das amostras resistentes, sendo todas *C. albicans*. Na avaliação da CIMs50% e CIMs80% das células sésseis, observou-se um aumento de pelo menos 60 vezes dos valores das células planctônicas. Foi observada porcentagem elevada de FB que demonstra a necessidade do diagnóstico e combate à essa biomassa formada pelas espécies de *Candida*, pois é um fator de virulência determinante para a diminuição da suscetibilidade aos antifúngicos comprometendo assim a terapêutica antifúngica.

Palavras-chave: biofilme, *Candida* spp., microscopia eletrônica de varredura, PCR em tempo real multiplex, teste de suscetibilidade *in vitro*.

ABSTRACT

The increase in the number of fungal infections by *Candida* species, as a result of the significant increase of immunocompromised patients emphasizes the importance of studies associated to this genre. The resistance of these strains to antifungal drugs is observed in specific isolates, as well as infections associated with biofilm formation (BF). The aim of this study was to compare the susceptibility profile of sessile and planktonic cells of different *Candida* isolates, differentiating species by multiplex qPCR and scanning electron microscopy. The sample consisted of 10 *C. albicans*, 10 *C. parapsilosis* and 1 *C. tropicalis*. The genetic material was extracted by phenol-chloroform extraction of the sample *C. tropicalis*, ATCC 28367 (*C. albicans*) and ATCC 22019 (*C. parapsilosis*) for use in a species-specific multiplex qPCR assay with analysis of differences in the curve fusion. Microdilution plate test and reduction of the tetrazolium salt for 21 isolates were performed for the susceptibility of sessile and free cells, respectively. The evaluation of the ultrastructure of the biofilm was performed on strips of polyurethane with visualization by scanning electron microscopy. The amplified products from *C. albicans* obtained three melting peaks with values of 75,2 °C, 76,8 °C and 79,8 °C, while *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* showed one peak with values 73,5 °C and 78,5 °C, respectively. The identification test showed to be reliable for the identification of the most common species in the study. All of *Candida* yeasts were able to form biofilm with own organization of each specie. The *in vitro* susceptibility test of planktonic cells demonstrated that amphotericin B and caspofungin showed better activity compared to fluconazole and voriconazole who obtained 19% of resistant strains, all *C. albicans*. In assessing of the CIMs50% and CIMs80% of sessile cells, we observed an increase of at least 60 times the values of planktonic cells. It was observed a high percentage of BF that demonstrates the need for diagnosis and combat against this biomass formed by *Candida* species. The BF is a virulence factor determinant for decrease of susceptibility to antifungal agents thus compromising antifungal therapy.

Keywords: biofilm, *Candida* spp, scanning electron microscopy, multiplex qPCR, *in vitro* susceptibility testing.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 GENERALIDADES

As infecções causadas por espécies de *Candida* são essencialmente oportunistas e denominadas candidíases. Fungos desse gênero são encontrados na forma comensal em vários sítios anatômicos como áreas de pele flexoras, trato gastrointestinal e urogenital (Lim et al. 2012), entretanto, o desequilíbrio da relação parasito-hospedeiro permite que essas leveduras causem infecção (Mitchell 2006, van der Velden et al. 2010).

Os principais fatores predisponentes para a infecção relacionados ao hospedeiro incluem o tempo prolongado de permanência hospitalar (Resende et al. 2002), medicamentos imunossupressores para o tratamento de câncer e de pacientes transplantados (Safdar & Armstrong 2002, Person et al. 2010, Fortun et al. 2012), antibioticoterapia (Ruhnke et al. 2011) e corticoterapia prolongadas (Anil Kumar et al. 2008). Além desses, indivíduos com doença de base, como aids (*acquired immunodeficiency syndrome*) (Nweze & Ogbonnaya 2011, Corti et al. 2013) e diabetes *mellitus* descompensado (Khosravi et al. 2008) e utilização por longo período de dispositivos invasivos, tais como válvulas cardíacas, articulações artificiais, cateter venoso periférico e central também propiciam o desenvolvimento da infecção (Mavor et al. 2005, Giri & Kindo 2012, Rosado et al. 2013).

Os fatores relacionados às espécies de *Candida* estão vinculados à virulência do fungo e compreendem a capacidade de aderência ao hospedeiro, produção de enzimas hidrolíticas na invasão tecidual e formação de biofilme com aumento de resistência aos antifúngicos (Mavor et al. 2005).

Dentre as manifestações clínicas da candidíase, a infecção hematogênica (candidemia) se destaca por apresentar alta gravidade e ser potencialmente fatal em pacientes nosocomiais (Wisplinghoff et al. 2003, Blanco & Garcia 2008, Pappas et al. 2009, Miceli et al. 2011).

1.2 INFECÇÕES HOSPITALARES POR *Candida* spp.

As espécies de *Candida* pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Cryptococcales, família Cryptococcaceae e gênero *Candida* (Anaissie et al. 2009, Kurtzman et al. 2011). Esse gênero é constituído

por mais de 150 espécies sendo que apenas uma minoria (aproximadamente 20) é capaz de estabelecer uma doença. As principais espécies de interesse médico são *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae* (Lim et al. 2012).

Espécies de *Candida* constituem o terceiro agente etiológico mais comum em casos de infecção sanguínea hospitalar (Hobson 2003, Walsh et al. 2004), sendo *C. albicans* isolada com maior frequência (quadro 1).

Quadro 1. Distribuição de frequência das cinco espécies de *Candida* mais prevalentes em estudos epidemiológicos de candidemia.

Local do estudo	Nº de isolados	Proporção das espécies (%)						Referência
		CA	CP	CT	CG	CK	OEC	
Brasil	313	44	14,4	21,7	11,2	3,5	5,2	Moretti et al. (2013)
Brasil	248	41	15	20	12	3	9	Bergamasco et al. (2013)
EUA e Canadá	3648	42,1	15,9	8,7	26,7	3,4	3,2	Pfaller et al. (2012)
Filadélfia (PA)	81	33,3	17,3	7,4	33,3	6,3	2,4	Nace et al. (2009)
Iowa (EUA)	108	47	12	6	29	0	6	Diekema et al. (2012)
Tailândia	147	39	6	28	22	0	5	Boonyasiri et al. (2013)

CA: *Candida albicans*; CP: *Candida parapsilosis*; CT: *Candida tropicalis*; CG: *Candida glabrata*; CK: *Candida krusei*; OEC: outras espécies de *Candida*.

Com o aumento no número de infecções fúngicas hematogênicas no decorrer dos anos, foi possível observar uma mudança epidemiológica com a elevação do número de infecções por espécies de *Candida* não *albicans* (CNA). Anteriormente, as infecções por espécies *C. albicans* ultrapassavam 50% dos casos (Pfaller & Diekema 2007, Sardi et al. 2013). Além disso, houve o aparecimento de espécies de *Candida* que não eram isoladas ou apareciam em baixa frequência como *Candida inconspícua*, *Candida norvegensis*, *Candida dubliniensis*, *Candida lipolytica* e *Candida zeylanoides* (Pfaller & Diekema 2007).

A taxa de infecção relacionada às espécies *C. albicans* e CNA é diferente nos casos de candidíase hematogênica, em decorrência de vários fatores, como doença de base (câncer e neutropenia), faixa etária e tipo de internação (leito comum, unidade de terapia intensiva – UTI). Grande número de casos de infecções por CNA, chegando até 71%, foram observados em pacientes com câncer e que faziam uso de cateteres (Krcmery & Barnes 2002).

No Brasil, os agentes etiológicos de *Candida* spp. causadores de infecções são similares ao observado em outros países como Espanha (Peman et al. 2011), Turquia (Ece et al. 2012), Colômbia (Cortes et al. 2011) e Argentina (Cordoba et al. 2011). A levedura *C. albicans* é o principal agente etiológico e quanto às espécies CNA, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são as mais relevantes (Colombo 2000, Antunes et al. 2004, Quindos 2014).

1.2.1 *Candida albicans*

Essa espécie é descrita como a mais frequente nas infecções por esse gênero (Lim et al. 2012). Por ser um microrganismo na maioria das vezes endógeno (coloniza cerca de 70% de indivíduos saudáveis), acredita-se que as infecções tenham origem no próprio hospedeiro (Mavor et al. 2005).

C. albicans é essencialmente sensível aos antifúngicos, porém em diferentes regiões geográficas apresenta variações no número de isolados resistentes aos azólicos, principalmente fluconazol, por se tratar de um fármaco de primeira escolha utilizado como monoterapia ou na profilaxia dessa micose. A resistência a esses fármacos está associada ao tempo e dose de terapia, frequentemente descrita em pacientes HIV (*human immunodeficient virus*) positivos devido ao prolongado tempo de tratamento (Sanglard & Odds 2002, Rautemaa et al. 2008, Morio et al. 2010).

1.2.2 *Candida parapsilosis*

C. parapsilosis aparece como uma das principais espécies nas infecções por CNA no Brasil que pode ser encontrada na forma comensal em mucosas, pele e unhas e em outras fontes como animais domésticos, insetos, solo e ambientes marinhos (Colombo 2000, Antunes et al. 2004, Trofa et al. 2008, van Asbeck et al. 2009).

Infecções por esse fungo estão relacionadas com pacientes pediátricos (Trofa et al. 2008), devido a maior necessidade de manipulação dos profissionais de saúde e pela alta frequência de isolamento dessa espécie das mãos de indivíduos saudáveis (Bonassoli et al. 2005). Além desses casos, *C. parapsilosis* tem sido largamente encontrada em casos de candidíase ungueal (Ataides et al. 2011).

Na maioria dos casos, esse agente etiológico é sensível aos derivados azólicos, equinocandinas e macrolídeos poliênicos. Foram descritos poucos casos de resistência *in vitro* à anfotericina B (2-3%) e aos azólicos (<5%). *C. parapsilosis*, apesar de apresentar resposta eficaz às equinocandinas, parece ser menos suscetível a esses fármacos. Valores de concentração inibitória mínima de células planctônicas (CIMp) mais elevados têm sido observados para *C. parapsilosis* do que para as outras espécies (Trofa et al. 2008).

1.2.3 *Candida tropicalis*

A infecção fúngica causada por essa espécie tem sido relatada em pacientes com câncer, neutropenia grave, doenças hematológicas ou transplantados de medula óssea (Leung et al. 2002, Goldani & Mario 2003, Weinberger et al. 2005, Nucci & Colombo 2007).

Uma característica importante de *C. tropicalis* está relacionada ao alto índice de mortalidade (59,0 à 85,7%) da infecção causada por esse fungo. Essa espécie, após a colonização, consegue se disseminar rapidamente no paciente imunocomprometido, principalmente em indivíduos com complicações hematológicas e outras infecções disseminadas (Almirante et al. 2005, Chang et al. 2008).

Essa levedura apresenta-se sensível aos antifúngicos poliênicos, equinocandinas e azólicos (Silva et al. 2012). Nucci & Colombo (2007) demonstraram rara resistência por *C. tropicalis*, com uma frequência estimada em 0,5%.

1.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Candida*

A identificação das espécies de *Candida* é extremamente importante, não só do ponto de vista epidemiológico (Hobson 2003), mas principalmente para a otimização da terapia, visto que alguns patógenos possuem particularidades no perfil de sensibilidade aos antifúngicos (Sanglard & Odds 2002).

Em geral, o diagnóstico de uma infecção causada por leveduras baseia-se no exame micológico direto e cultura do material biológico pesquisado. Para identificação de *Candida*, as colônias apresentam-se com as características úmida, cremosa de coloração branco-amarelada, enquanto que nos achados microscópicos são evidenciados blastoconídios e pseudo-hifas (Kurtzman et al.

2011). Ensaios bioquímicos são realizados, como testes de assimilação e fermentação de fontes de carbono e nitrogênio para algumas espécies de leveduras que apresentam um particular comportamento. As características morfológicas como formação de clamidoconídios e tubos germinativos auxiliam na identificação destas leveduras (Kurtzman et al. 2011).

Apesar da existência de inúmeros testes para identificação das espécies de *Candida*, o tempo prolongado para processamento das amostras até a identificação e alguns fatores como temperatura e meios de cultura, podem interferir nas características do patógeno, como maior filamentação, coloração e característica das colônias. Análises genotípicas como os métodos de identificação moleculares, os quais são extremamente sensíveis/específicos e podem ser realizados em um curto período de tempo podem ser úteis na identificação das espécies de *Candida* (Avni et al. 2011).

1.3.1 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

A reação em cadeia da polimerase com capacidade de monitoramento em tempo real (qPCR) é um sistema que, dentre suas aplicações, como avaliação de expressão gênica, determinação de pontos de mutação e genotipagem, é amplamente empregado na detecção, quantificação e identificação de microrganismos (Christen 2008).

Para a utilização dessa técnica é necessário conhecimento prévio da região do DNA do microrganismo a ser amplificada que é obtida em bancos de dados que possuem a sequência inteira ou parcial do genoma desses microrganismos (Benson et al. 2014).

Os oligonucleotídeos, ou seja, iniciadores da reação são utilizados como limitadores da região requerida, possibilitando a polimerização dessa região com a utilização dos quatro desoxirribonucleotídeos (dNTPs) adenina – A, timina – T, guanina – G e citosina – C, de magnésio, de tampão, da DNA polimerase e do material genético do microrganismo (Lugert et al. 2006).

Essa reação *in vitro* tem como princípio a síntese enzimática de milhares de cópias desse seguimento específico de DNA que ocorre de forma exponencial em etapas de variação de temperatura (Dorak 2007). A amplificação é realizada em três etapas, desnaturação do DNA para abertura da dupla fita, anelamento

dos oligonucleotídeos na região complementar específica e extensão da região requerida (Kubista et al. 2006).

Os produtos amplificados (amplicons) são detectados por meio da fluorescência no decorrer dos ciclos (figura 1) de forma semiquantitativa ou quantitativa com base no ciclo que apresenta o limiar da reação exponencial chamado *cycle threshold* ou CT (Kubista et al. 2006).

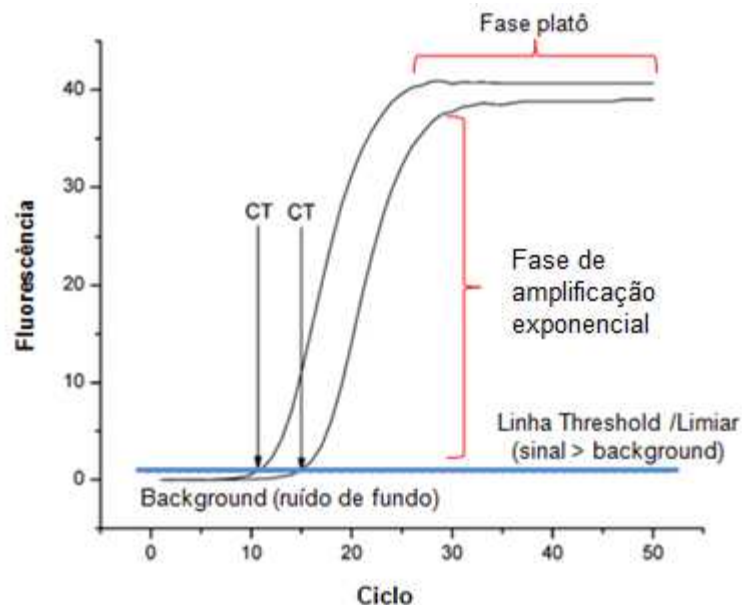


Figura 1. Curva de fluorescência da qPCR. Linha “threshold”: limiar de fluorescência. Fase log: amplificação exponencial. Fase platô: não ocorrem amplificações (saturação da reação). Fonte: adaptado de Kubista et al. (2006).

A fluorescência característica das reações de qPCR ocorre devido à utilização de fluoróforos, como as sondas de sequência específica e os corantes de ligação a dupla fita de DNA. Apesar da sonda apresentar o benefício da especificidade, possui a utilização restrita ao patógeno a que se destina o seu desenho, diferente do fluoróforo ligante de DNA que pode ser aplicado para diferentes patógenos. No entanto, uma grande desvantagem da técnica na utilização dos corantes intercalantes, é a ligação que pode ocorrer em produtos inespecíficos, superestimando a fluorescência da reação (Dorak 2007).

SYBR Green (figura 2) é um corante de fluorescência verde intercalante de DNA, amplamente utilizado devido ao excelente custo-benefício, boa sensibilidade e facilidade de uso (Kubista et al. 2006).

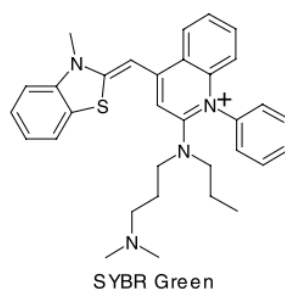


Figura 2. Estrutura molecular do corante fluorescente derivado de cianina assimétrica. Fonte: Kubista et al. (2006).

1.3.1.1 Amplificação em região do DNA ribossomal

Estudos moleculares envolvendo o cluster gênico do DNA ribossomal (rDNA) são amplamente utilizados para a identificação de fungos devido a presença de múltiplas cópias desse gene na célula, o que aumenta a sensibilidade dos ensaios que tem essa região como alvo (Kourkoumpetis et al. 2012).

Os ribossomos são pequenos e extremamente complexos, consistindo de duas subunidades, *maior* e *menor*, adaptadas para desempenho de suas funções, dentre elas, o sítio para a síntese proteica celular. Os ribossomos dos organismos eucariotos são constituídos por proteínas e quatro moléculas de RNA ribossomal (rRNA). Além do complexo proteico, a subunidade maior (60S) é composta pelas moléculas de rRNA 5.8S, 28S e 5S, enquanto a subunidade menor (40S) é composta pela 5S. Três desses rRNAs são derivados de um único transcrito tricistrônico, ou seja, originam o rRNA precursor que dará origem a três subunidades do ribossomo. Essa sequência (figura 3) consiste de regiões codificantes para os genes do rRNA 18S, 5.8S e 28S, um espaço não transcrito (NTS), espaço transcrito externo (ETS) e dois espaços transcritos internos não codificantes, ITS 1 e ITS 2 (Pendrak & Roberts 2011).

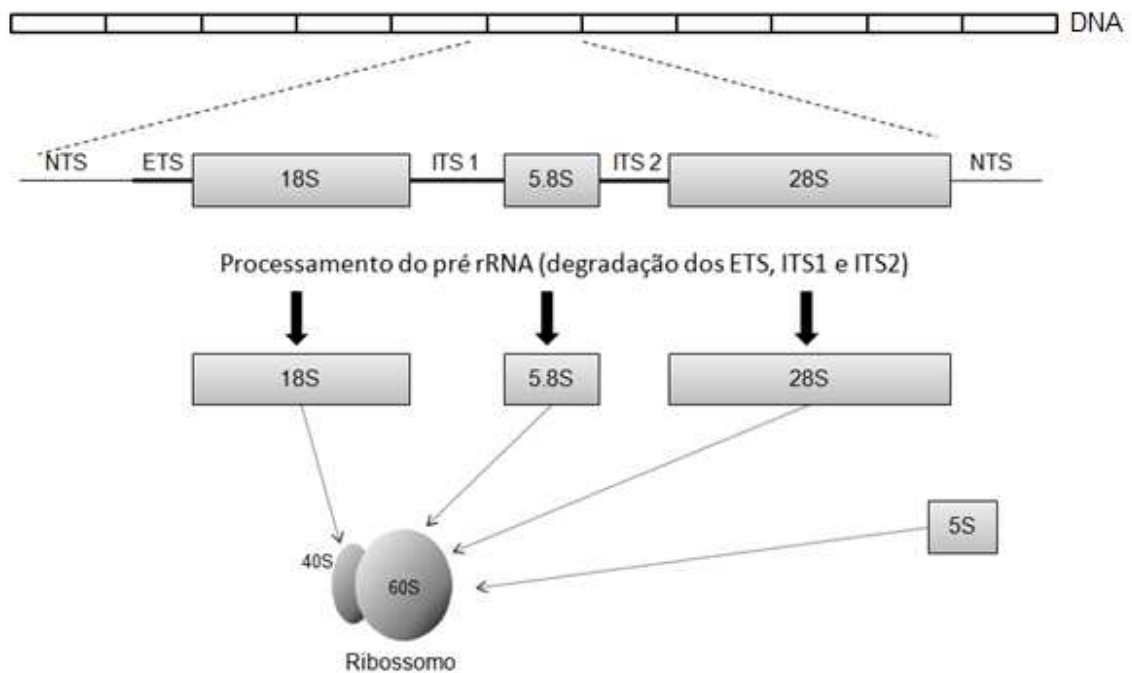


Figura 3. Transcrição tricistônica do rDNA. As subunidades 18S, 5.8S e 28S são transcritas a partir de uma única sequência de DNA, enquanto que a subunidade 5S é transcrita em outro local.

As regiões 18S, 5.8S e 28S são relativamente conservadas e podem ser utilizadas para diferenciação em nível de gênero. As regiões ETS e ITS apresentam um maior número de variações, sendo altamente empregadas para a diferenciação de espécies e subgrupos entre a mesma espécie (Pendrak & Roberts 2011).

1.3.1.2 Diferenciação de espécies pela temperatura de fusão dos amplicons

A análise da curva de fusão (CF) ao final da técnica molecular qPCR com SYBR® Green é amplamente utilizada para identificar várias espécies de patógenos (Alfaresi & Elkosh 2006, Varga & James 2006, Hays et al. 2011, Khademvatan et al. 2011, Decat et al. 2013). A verificação da temperatura de fusão (T_f) é realizada ao final da ciclagem da qPCR. O aparelho de qPCR inicia um aquecimento, com o intuito de ocorrência de fusão/separação das fitas de DNA, de forma que o fluoróforo SYBR® Green é liberado na solução e sua intensidade de fluorescência diminui drasticamente como demonstrado na figura 4 (Dorak 2007).

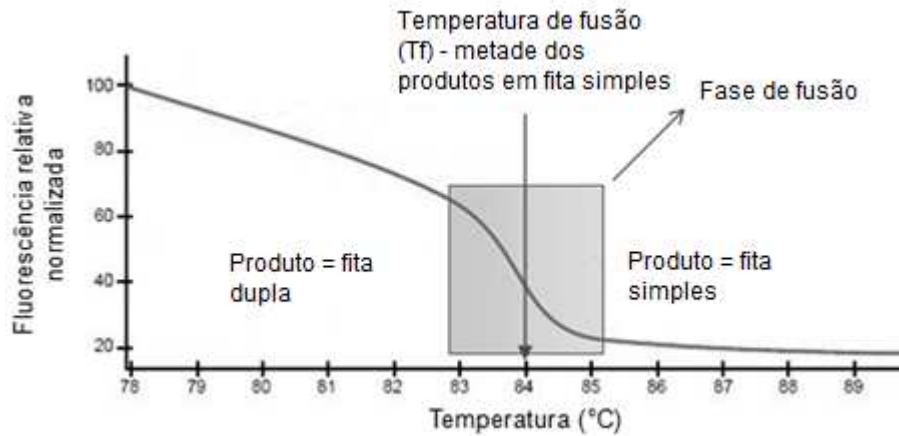


Figura 4. Gráfico da curva de fusão em relação à fluorescência normalizada demonstrando a fase de fusão.

Um gráfico é construído com base na temperatura e a derivada negativa da taxa de variação da fluorescência em relação à temperatura ($-dF/dT$). Quando a região esperada for amplificada, irá aparecer um pico, mas se ocorrer formação de dímeros de oligonucleotídeos ou outros produtos inespecíficos, outro pico irá aparecer em temperaturas inferiores (figura 5) por serem produtos de comprimento menor do que o amplicon (Kubista et al. 2006).

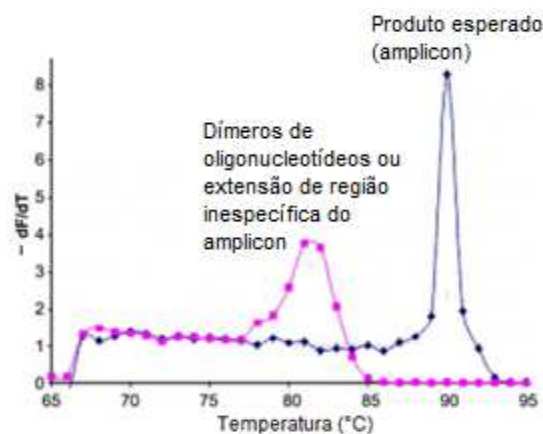


Figura 5. Gráfico da curva de fusão em relação à derivada negativa taxa de variação da temperatura. A T_f corresponde ao ponto de inflexão da curva (região em que metade dos produtos está em fita simples).

As possíveis variações da T_f são utilizadas como base para a diferenciação das espécies de microrganismos que utilizam uma mesma região de amplificação. Cada fragmento de DNA tem uma T_f em que metade dos produtos da PCR se

encontram em fita simples e a outra metade em fita dupla. Essa temperatura depende de diversas características do fragmento, como comprimento do DNA, ordem de sequência dos dNTPs e número de ligações guanina-citosina (Dorak 2007).

1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

Além da identificação precisa da espécie responsável pela infecção, o conhecimento dos fatores de virulência é muito importante, visto que são extremamente relevantes no curso da infecção. Entre os fatores de virulência relacionados às espécies de *Candida* podem ser citados: 1) aderência; 2) morfogênese; 3) secreção de enzimas hidrolíticas e; 4) formação de biofilme (FB), os quais são descritos a seguir.

1.4.1 Aderência

Para o estabelecimento de uma relação comensal e posteriormente uma infecção, a aderência ao tecido do hospedeiro é essencial. Essa ligação é promovida com base na interação de moléculas da superfície celular do hospedeiro (polissacarídeos, glicoproteínas e lipídeos) com estruturas especializadas (adesinas) presentes no fungo (Lim et al. 2012, Tsai et al. 2013).

Essa característica representa o primeiro passo para a colonização, podendo evoluir para invasão tecidual (Gow et al. 2012). Dispositivos implantados no hospedeiro, como cateter para acesso venoso e dietas parenterais, sondas de dietas enterais e urinárias (Lim et al. 2012, Sardi et al. 2013) são propensos à colonização e maior aderência por fungos do gênero *Candida*, favorecendo a FB (Kumamoto 2002).

1.4.2 Morfogênese

A capacidade de mudança na morfologia da forma de levedura para filamentosa (pseudo-hifa e hifa) determina virulência ao fungo (Thompson et al. 2011). Essa mudança pode ser induzida por uma variedade de condições ambientais, como variação de temperatura, pH e composição do meio (Sudbery et al. 2004).

As pseudo-hifas são células alongadas e unidas entre si que formam cadeias de células. Essa morfologia é consequência do processo de reprodução

por brotamento, porém a célula-filha se mantém aderida à mãe e torna-se prolongada. Algumas se tornam tão alongadas que são semelhantes às hifas verdadeiras (Sudbery et al. 2004). As formas filamentosas pseudo-hifa e hifa são diferenciadas com base na observação do local de alongação (figura 6). Na formação da hifa verdadeira não existe constrição entre a célula-mãe e o filamento, enquanto que as pseudo-hifas possuem a constrição nesse local (Sudbery et al. (2004)).

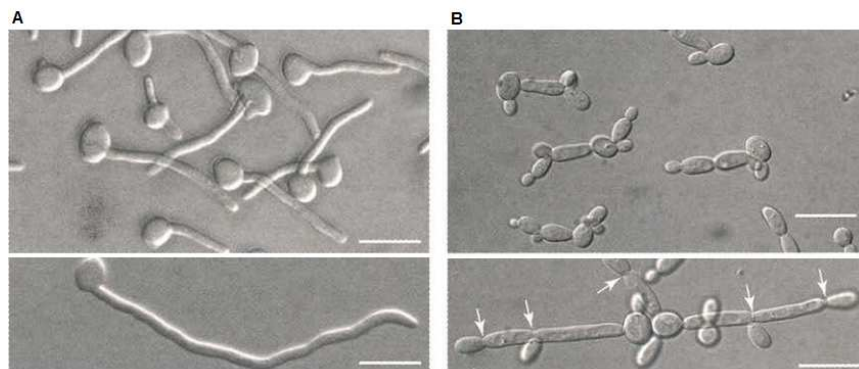


Figura 6. Morfologia de pseudo-hifa e hifa. A) Hifa; B) Pseudo-hifa, as setas apontam o local de constrição das pseudo-hifas; barra = 10 μ m. Fonte: adaptado de Sudbery et al. (2004).

O mecanismo de virulência relacionado à formação de formas filamentosas está relacionado à lesão tecidual por força mecânica, lesão de células endoteliais com disseminação sistêmica, lise de macrófagos e neutrófilos após fagocitose demonstrados na figura 7 (Thompson et al. 2011).

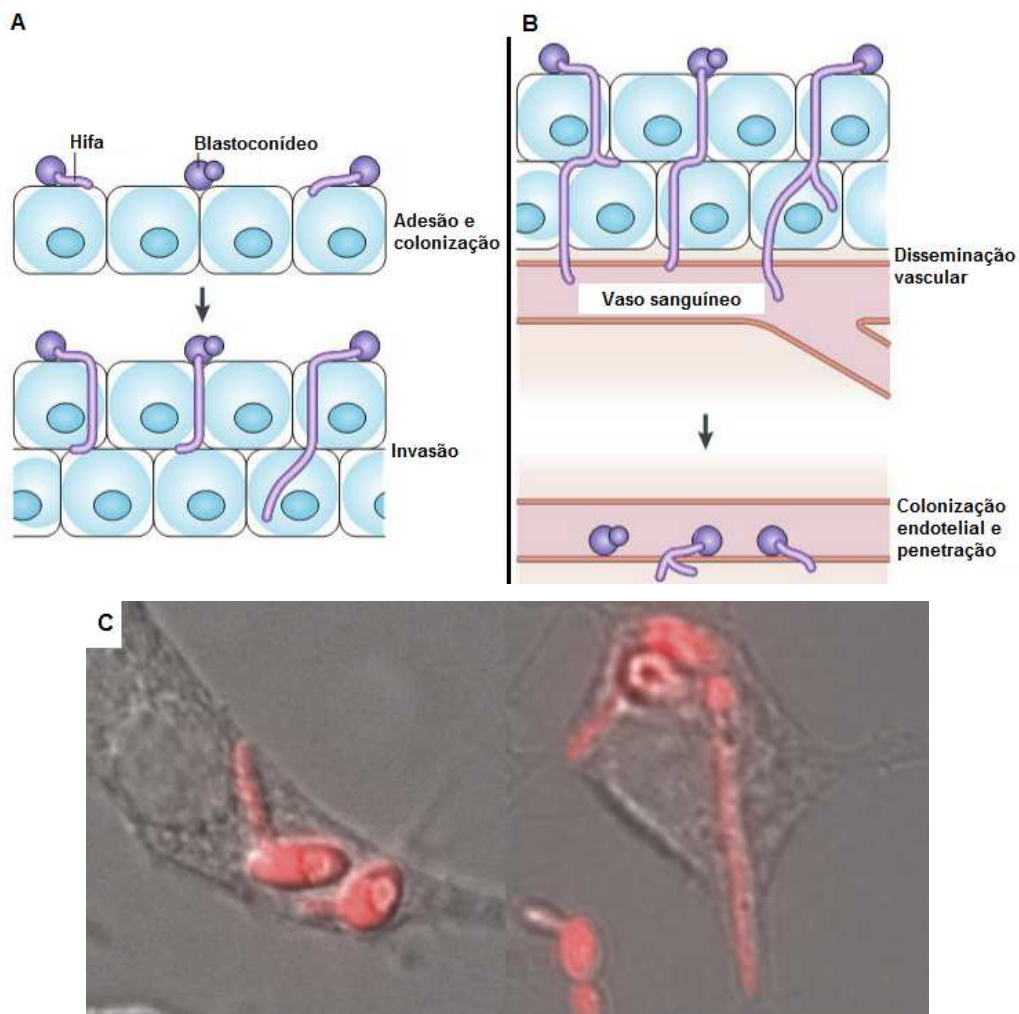


Figura 7. Mecanismo de patogenicidade das hifas de *C. albicans*. A) Lesão e invasão tecidual. B) Lesão tecidual endotelial e disseminação. Fonte: adaptado de Gow et al. (2012). C) Lise de macrófagos. Fonte: Jimenez-Lopez & Lorenz (2013).

1.4.3 Secreção de enzimas hidrolíticas

As proteinases e fosfolipases são duas famílias de enzimas hidrolíticas relevantes para a patogênese das espécies de *Candida* (Lim et al. 2012). As proteinases são capazes de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas e estão relacionadas com a habilidade do microrganismo colonizar o hospedeiro, devido à associação com a aderência e evasão do sistema imune (Naglik et al. 2003). O grupo das fosfolipases é constituído de enzimas capazes de hidrolisar ligações ésteres nos glicerofosfolípidos das membranas e estão relacionadas com lesão, aderência e invasão do microrganismo ao tecido do hospedeiro (Ghannoum 2000).

1.4.4 Formação de biofilme

O biofilme é “uma agregação complexa de microrganismos irreversivelmente ligados a uma superfície ou interface, envolvidos por uma matriz de substâncias poliméricas que é produzida por essas mesmas células. Essas células possuem algumas particularidades como taxa de crescimento alterado e transcrição de genes que os organismos na sua forma planctônica (livre) não possuem” (Donlan & Costerton 2002).

A FB representa um grande problema nosocomial, pois, além das espécies de *Candida* serem capazes de formar essa biomassa no tecido do hospedeiro, também podem desenvolver em dispositivos invasivos de pacientes hospitalizados (Kojic & Darouiche 2004). A ligação das espécies de *Candida* aos substratos é mediada tanto por interações específicas (adesinas), quanto por interações não específicas como hidrofóbicas e eletrostáticas (Sardi et al. 2013). Essa biomassa passa a ser uma fonte de infecção sistêmica para o paciente e possui como característica a menor suscetibilidade aos antifúngicos. Se as células sésseis não forem removidas, essa resistência pode causar danos fatais ao paciente (Ramage et al. 2006).

Para as espécies de *Candida* a composição e organização da biomassa ocorrem de acordo com a capacidade de morfogênese (figura 8). Após a aderência e proliferação no substrato, inicia-se o desenvolvimento das hifas (maturação). O biofilme maduro tem como características a formação reprimida do fungo na sua forma de levedura, grande desenvolvimento de hifas e envolvimento por uma matriz extracelular. Após essa fase, inicia-se uma última etapa, que é de dispersão, em que existe a formação de células leveduriformes não aderentes (Blankenship & Mitchell 2006, Silva et al. 2011).

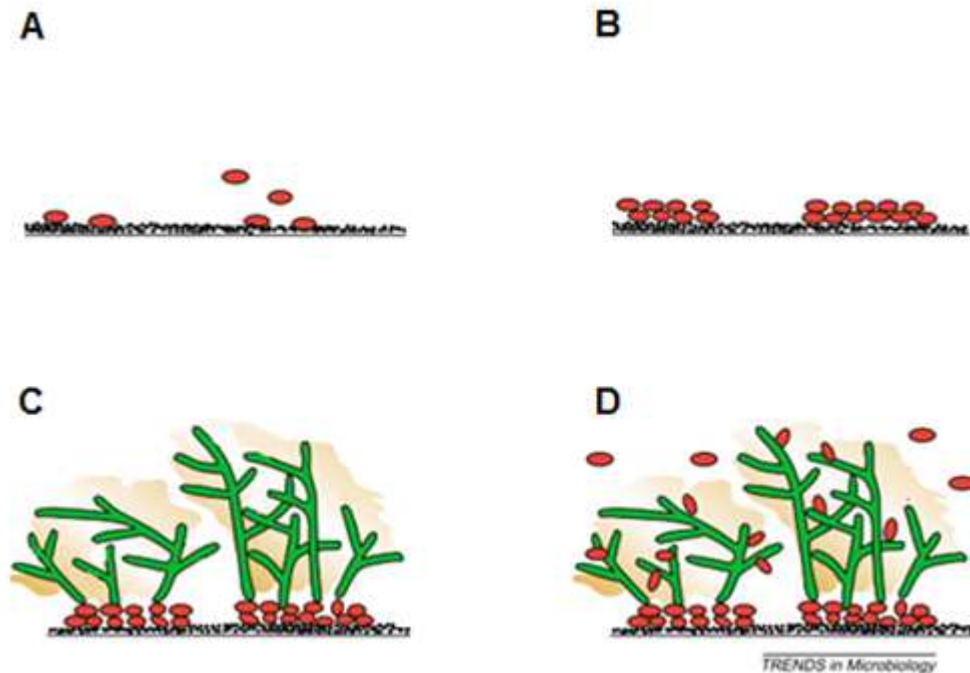


Figura 8. Desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*. A) Aderência das leveduras ao substrato; B) Proliferação; C) Maturação do biofilme; D) Etapa de dispersão com formação de células leveduriformes não aderentes. Fonte: adaptado de Douglas (2003).

1.4.4.1 Avaliação ultraestrutural do biofilme

O biofilme da espécie *C. albicans* é o mais estudado (figura 9). Sua formação está associada com a filamentação e geralmente apresenta duas camadas distintas, fina camada basal de leveduras e grossa camada menos compacta de hifas (Donlan & Costerton 2002).

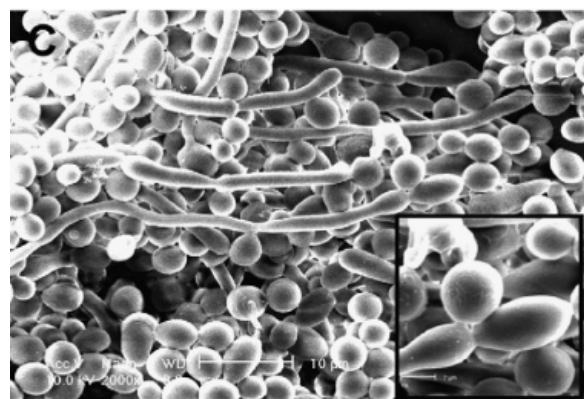


Figura 9. Ultraestrutura da espécie *C. albicans*. Apresentação de camada basal com leveduras e camada de hifas menos compacta. Imagem por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Barra = 10 µm. Fonte: Thein et al. (2007).

C. parapsilosis forma uma biomassa (figura 10 A) que tende a ser menor, menos estruturada e consiste em sua maioria de agregados de blastoconídios (Lattif et al. 2010). Biofilme formado por *C. tropicalis* (figura 10 B) é composto por uma densa rede de células leveduriformes juntamente com filamentos evidentes (Bizerra et al. 2008).

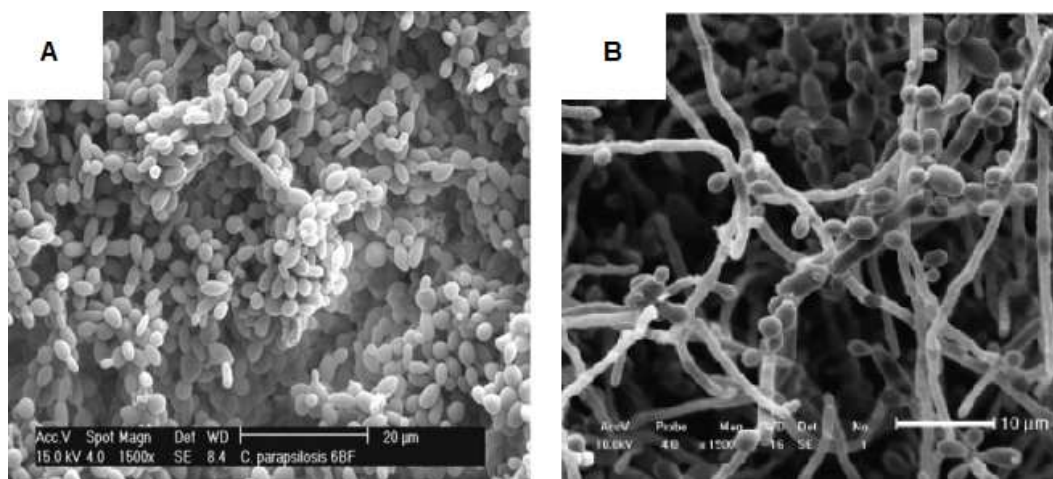


Figura 10. A) Ultraestrutura da espécie *C. parapsilosis* com grande maioria de blastoconídios. Imagem por MEV (barra = 20 µm). Fonte: Lattif et al. (2010). B) Ultraestrutura da espécie *C. tropicalis*; evidência de estruturas filamentosas. Imagem por MEV (barra = 10 µm). Fonte: Bizerra et al. (2008).

1.4.4.2 Resistência a agentes antifúngicos associada ao biofilme

Os biofilmes microbianos assumem grande importância devido à habilidade de expressar resistência contra os agentes antimicrobianos (Donlan & Costerton 2002, Douglas 2003), entretanto, o mecanismo de resistência associado às células sésseis não está bem elucidado.

A resistência do biofilme aparece como um fator intrínseco da biomassa. Células do biofilme ressuspensas e testadas, continuam apresentando menor suscetibilidade, entretanto, quando essas células são cultivadas em meios sólidos, existe o crescimento de células livres que são sensíveis aos antifúngicos, demonstrando que a resistência não é um fator permanente (Kumamoto 2002).

O papel da matriz extracelular (ME) na suscetibilidade antifúngica é complexo e estudos *in vitro* mostraram que sua influência é mínima na resistência ao microrganismo. Tanto em experimentos realizados com células fúngicas em agitação (produção intensa de ME), quanto naquelas produzidas sem agitação (produção mínima de ME), foi possível observar resistência. Além disso, estudos

que avaliaram a taxa de penetração dos fármacos pela membrana também demonstraram que a permeabilidade não é um fator determinante para menor sensibilidade, pois a penetração *in vitro* do fármaco acontece livremente no biofilme (Mukherjee & Chandra 2004). Situação oposta ocorre quando *C. albicans* apresenta-se associada com *Staphylococcus epidermidis* e demonstra diminuição da penetração do fármaco. Esse tipo de biofilme é observado *in vivo*, e desta forma a participação da ME pode ser considerada mais complexa (Blankenship & Mitchell 2006).

A presença aumentada de bombas de efluxo, que funcionam com base no bombeamento ativo de fármacos de dentro para fora da célula, é determinante na resistência de células de *C. albicans* que se apresentam aderidas. Estas células fúngicas demonstram uma maior quantidade de bombas do que células de *C. albicans* na sua forma livre, influenciando na resistência durante os estágios iniciais da FB (Blankenship & Mitchell 2006).

A composição do ergosterol é decisiva para a sensibilidade aos fármacos azólicos e poliênicos que têm como alvo este esterol. Durante o desenvolvimento do biofilme até a fase madura, observa-se uma diminuição de até 50% na quantidade de ergosterol, diminuindo assim, o alvo para esses fármacos (Mukherjee & Chandra 2004).

A quantificação do biofilme associada ao teste de suscetibilidade *in vitro* é amplamente descrita pelo método colorimétrico de redução do sal tetrazólio - MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] com utilização do aceptor de elétrons menadiona (Pierce et al. 2008) que aumenta a eficiência da redução do sal (Meletiadiis et al. 2001). Esse ensaio é baseado na capacidade das enzimas mitocondriais de células viáveis converterem o sal MTT amarelo, que é solúvel em água, em cristais roxos insolúveis (cristais formazan) pelo sistema desidrogenase. Após solubilização desses cristais por solventes orgânicos como o dimetilsulfóxido (DMSO), o produto pode ser quantificado por espectrofotometria e os valores são diretamente proporcionais ao número de células metabolicamente ativas (van Meerloo et al. 2011).

1.5 ANTIFÚNGICOS NO TRATAMENTO DA CANDIDÍASE: MECANISMO DE AÇÃO E DE RESISTÊNCIA

A terapia medicamentosa indicada para a candidíase é realizada com fármacos antifúngicos de três principais classes, os derivados poliênicos, azólicos e equinocandidas (Pappas et al. 2009, Kathiravan et al. 2012).

Originada a partir do actinomiceto *Streptomyces nodosus*, a anfotericina B é um derivado poliênico que possui como mecanismo de ação, a sua interação com o ergosterol da membrana fúngica (ligação hidrofóbica) que resulta em estruturas complexas semelhantes a poros (figura 11). Esses poros irão alterar a permeabilidade da membrana fazendo com que a célula perca importantes componentes celulares e assim, morte celular (Kathiravan et al. 2012).

A resistência adquirida a anfotericina B é rara e está relacionada, na maioria das vezes, com alterações genéticas que modificam a composição dos esteróis na membrana celular. A alteração dos genes que codificam as enzimas C-5 esterol desaturase (*ERG3*) e Δ -(24)-esterol metiltransferase (*ERG6*), envolvidas na biossíntese do ergosterol, faz com que ocorra o acúmulo de outros esteróis, que não o ergosterol, diminuindo o alvo para esse antifúngico (Vandeputte et al. 2007, Kanafani & Perfect 2008).

O grupo dos fármacos sintéticos azólicos é formado pelos derivados imidazólicos, tais como miconazol e cetoconazol, e pelos triazólicos, como fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol (Carrillo-Munoz et al. 2006, Pappas et al. 2009).

Os azólicos também possuem como alvo o ergosterol (figura 11). O mecanismo de ação é a inibição da síntese desse esterol que ocorre pelo bloqueio da enzima 14- α -demetilase, essencial para a biossíntese do ergosterol, codificada pelo gene *ERG11*. Esse bloqueio ocorre pela ligação do átomo de nitrogênio do anel imidazólico ou triazólico ao grupo heme da 14- α -demetilase que se encontra no sítio ativo da enzima, impedindo sua atividade (Odds et al. 2003, Kathiravan et al. 2012).

A resistência aos azólicos é descrita por quatro mecanismos: redução da concentração do fármaco, alteração do sítio alvo, regulação positiva da enzima alvo e desenvolvimento de desvio na via de biossíntese (Kanafani & Perfect 2008).

A redução da concentração do fármaco ocorre pela regulação positiva de genes codificantes para as proteínas de multirresistência (*CDR*) e principal

facilitadora de transporte (*MDR*), que constituem as bombas de efluxo responsáveis pelo bombeamento do fármaco do meio intracelular para o meio extracelular (Kanafani & Perfect 2008).

A alteração do sítio alvo é realizada através da mutação do gene *ERG11* que irá alterar a sequência de DNA que codifica a enzima. Consequentemente terá mudança na composição da enzima alvo e não haverá o reconhecimento pelo fármaco (Kanafani & Perfect 2008).

Regulação positiva dessa enzima tem como objetivo a manutenção da alta concentração desse alvo, e assim, mesmo que haja atuação do fármaco, não será suficiente para inibir toda a quantidade de enzima disponível. Pode ocorrer com aumento da tradução do gene para RNA mensageiro (RNAm) que contém a informação para a tradução na enzima, aumento da taxa de transcrição do RNAm, diminuição da degradação do RNAm ou da enzima produzida (Kanafani & Perfect 2008).

O desenvolvimento de desvio na via de biossíntese é consequência da inibição da 14- α -demetilase, que cataliza um passo essencial na biossíntese do ergosterol. Com isso, não ocorre a síntese do ergosterol e existe o acúmulo do precursor lanosterol, que é convertido em 14- α -metilfecosterol e sofre ação da enzima Δ -5,6-desaturase, resultando em produtos tóxicos. Entretanto, com a inativação da Δ -5,6-desaturase, ocorre o acúmulo do 14- α -metilfecosterol, mantendo as membranas intactas e anulando a ação dos azólicos (Kanafani & Perfect 2008).

A classe das equinocandinas é a primeira a atuar contra a parede da célula fúngica (figura 11) e possui como fármaco amplamente prescrito, a caspofungina. São antifúngicos formados durante a fermentação de alguns fungos como *Aspergillus nidulans* e *Glorea luzonensis* (Odds et al. 2003).

As equinocandinas têm como mecanismo de ação a inibição da subunidade catalítica de 1,3- β -D-glucana, codificada pelo gene *FKS1*, essencial para a formação da estrutura da β -glucana, que é um importante componente da parede celular fúngica. Essa inativação faz com que a parede celular se rompa, resultando em instabilidade e morte celular. Por se tratar de um alvo que não é encontrado em células de mamíferos, os efeitos adversos são mínimos (Kathiravan et al. 2012).

Resistência às equinocandinas aparece em casos de mutação no gene *FKS1*. Sensibilidade reduzida é observada em testes de suscetibilidade *in vitro* para esse antifúngico em consequência do chamado “efeito paradoxal”. Neste efeito, o fungo suporta altas concentrações desse fármaco nos testes *in vitro*, devido ao aumento da síntese de quitina que aumenta a rigidez da parede celular da célula fúngica (Odds et al. 2003, Kanafani & Perfect 2008).

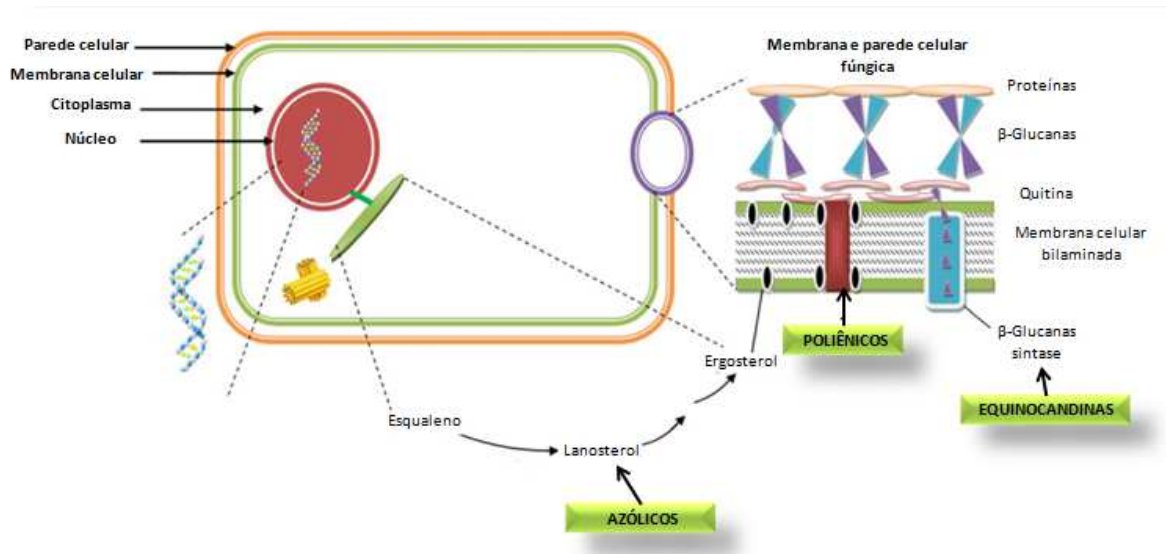


Figura 11. Esquema representativo dos alvos para os fármacos antifúngicos utilizados no tratamento da candidíase. Fonte: adaptado de Kathiravan et al. (2012).

2 JUSTIFICATIVA

O aumento crescente das infecções fúngicas está relacionado ao expressivo crescimento no número de pacientes imunocomprometidos, visto que a grande maioria dos patógenos fúngicos, apesar de possuírem diversos fatores de virulência, necessita da debilitação imunológica do hospedeiro para que haja o sucesso da infecção. Diversos são os fatores que predispõem a infecção, como o tempo prolongado de permanência hospitalar, a presença de uma doença de base e utilização de dispositivos invasivos. Dessa forma, estudos epidemiológicos de micoses com associação aos fatores relacionados ao hospedeiro, suscetibilidade aos fármacos antifúngicos e identificação das espécies de fungos causadores de infecção merecem destaque.

Interesse em particular necessita ser dado às infecções fúngicas causadas por espécies do gênero *Candida*, e dentre as manifestações clínicas causadas na patogenia desses fungos, a candidemia é responsável por altas taxas de mortalidade em pacientes hospitalizados. Além da gravidade da infecção nestes pacientes nosocomiais, o gênero *Candida* apresenta elevada prevalência, perfazendo cerca de 80% do total de infecções fúngicas sistêmicas hospitalares. As espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, são os principais patógenos causadores de candidemia. Cada espécie possui próprio perfil de patogenia quanto à epidemiologia, características clínicas do paciente acometido, suscetibilidade aos antifúngicos e expressão dos fatores de virulência. Apesar da mudança epidemiológica, evidenciada com o aumento das infecções fúngicas por espécies de CNA, *C. albicans* aparece ainda como principal agente etiológico na grande maioria das infecções por espécies de *Candida*.

Diante das particularidades das espécies de *Candida* que apresentam influência direta no percurso da infecção fúngica, é extremamente necessária uma identificação precisa e rápida do patógeno. Apesar da existência de grande número de ensaios para identificação de *Candida* spp., esses testes convencionais apresentam demora para a conclusão da identificação do patógeno e estão sujeitos a diversas influências, como temperatura, tempo de incubação e composição dos meios de cultura. Dentre as possíveis alterações das características que são importantes para a identificação do fungo, temos a ocorrência de mudança no aspecto das colônias, filamentação e até ausência de

crescimento fúngico, observado nos resultados falso-negativos. Diante disso, a utilização de ferramentas da biologia molecular, visando a detecção e diferenciação das espécies desses patógenos é de grande relevância do ponto de vista do custo-benefício, agilidade, sensibilidade e especificidade do ensaio.

Além da identificação das espécies de *Candida*, o conhecimento dos fatores de virulência desses patógenos é necessário, visto que a expressão desses fatores determina o sucesso e desfecho da infecção fúngica. Diversas são as características que determinam a virulência do fungo, merece destaque a capacidade de FB, o qual é responsável por produzir um agregado de células sobre um substrato, revestido de uma matriz extracelular que possui a organização ultraestrutural específica da espécie acometida. A presença de biofilme microbiano é um agravante para os pacientes imunocomprometidos, pois sua formação em dispositivos invasivos representa uma porta de entrada para as infecções hematogênicas e, além disso, essas células sésseis apresentam na sua grande maioria, resistência aos fármacos antifúngicos com consequente falha na terapia farmacológica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar isolados clínicos de *Candida*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as espécies de *Candida* por qPCR multiplex.
- Determinar a capacidade de formação de biofilme e as características da morfologia ultraestrutural das diferentes espécies de *Candida*.
- Determinar a suscetibilidade *in vitro* das células planctônicas e sésseis frente aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol.

4 MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

O material de estudo foi constituído de 21 isolados de *Candida* spp. procedentes da micoteca do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Goiás (UFG). Dentre o total, 10 eram *C. albicans*, 10 *C. parapsilosis* e 1 *C. tropicalis*. Os isolados foram provenientes do sangue de 21 pacientes da UTI do Hospital Araújo Jorge e do Hospital das Clínicas da UFG com aprovação do Comitê de Bioética (anexos 1 e 2) e mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes (anexos 3 e 4).

4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Candida*

Para identificar as espécies de *Candida* foram utilizados métodos convencionais bioquímicos e morfológicos como CHROMagar, produção de clamidoconídios e técnica de assimilação de carbono (Kurtzman et al. 2011).

4.2.1 CHROMagar

Cada isolado do estudo foi previamente inoculado pela técnica de esgotamento no meio CHROMagar™ *Candida* (Difco) e mantido em temperatura ambiente por 48 horas. Após esse período, foi analisada a coloração de colônias: cores diferentes determina a ocorrência de contaminação da cepa ou infecção mista. *C. albicans* e *C. tropicalis* desenvolvem cor verde e azul, respectivamente. As outras espécies possuem colorações similares entre si e devem ser identificadas por provas bioquímicas (figura 12).



Figura 12. Macroscopia das colônias de *Candida* em meio CHROMagar. A: *C. albicans* (colônias verdes). B: *C. tropicalis* (colônias azuis). C: outras espécies de *Candida*. Fonte: adaptado de Horvath et al. (2003).

4.2.2 Técnica de assimilação de carbono

As fontes de carbono utilizadas foram: glicose (controle positivo), sacarose, lactose, galactose, rafinose, celobiose, trealose e maltose.

Utilizando a técnica de profundidade (*pour plate*), o inóculo de cada isolado (escala 5 de McFarland) foi colocado nas placas de petri esterilizadas, acrescentando 20 mL do meio ágar livre de carbono yeast *nitrogen base* (YNB) a 0,67% homogeneizando-se bem. Após solidificação, as fontes de carbono foram adicionadas na placa em locais equidistantes e mantidas em temperatura ambiente por 24 a 48 horas. A leitura foi realizada com o aparecimento de um halo opaco ao redor do açúcar, indicando assimilação (figura 13).



Figura 13. Placa de petri mostrando assimilação de carbono. Os halos opacos ao redor da glicose, sacarose, maltose, trealose, celobiose e galactose mostram assimilação positiva do microrganismo. Fonte: Laboratório de Micologia – IPTSP/UFG.

4.2.3 Formação de Clamidoconídios

A capacidade de formação de clamidoconídios é um teste confirmatório para identificação das espécies *C. albicans* e *Candida dubliniensis*, com a utilização do ágar Corn Meal (Difco). *Candida dubliniensis* apresenta clamidoconídios com disposição intercalar na hifa enquanto *C. albicans* apresenta clamidoconídios terminais na hifa.

Os isolados foram inoculados em tubos de ensaios contendo ágar Corn Meal e mantidos em temperatura ambiente (25 °C) por 5 dias, período pelo qual foram realizadas leituras para verificação da presença de células geralmente arredondadas, de volume aumentado, com paredes espessas e localização apical, denominadas clamidoconídios (figura 14).



Figura 14. Microscopia óptica (400x) de clamidoconídios produzidos em ágar Corn Meal. Fonte: Laboratório de Micologia – IPTSP/UFG.

4.3 PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

4.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada segundo a metodologia de Casali et al. (2003) com algumas modificações. Em um eppendorf contendo 0,5 mL de pérolas de vidro de 0,45 mm e 0,5 mL de TENTS [tris hidrocloreto (Tris-HCL) 10 mM pH 7.5; ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM pH 8.0; cloreto de sódio (NaCl) 200 mM; Triton 2%; dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%] foram adicionadas colônias de *Candida* sp. e acrescidas de 0,5 mL de

fenol/clorofórmio. O eppendorf foi agitado em vórtex por 2 minutos e posteriormente centrifugado por 15 minutos a 13.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e o mesmo volume (500 µL) de etanol absoluto foi adicionado e incubado por 1 hora a -20 °C para precipitação de DNA.

O eppendorf foi centrifugado (15 minutos; 13.000 rpm) e o DNA precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de TE (Tris-HCl 1 M pH 7.5; EDTA 0,5 M pH 8.0), adicionado de 2,5 µL de RNase (50 µg/mL), e incubado a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente foi adicionado 0,5 mL de fenol/clorofórmio, agitado em vórtex por 2 minutos e centrifugado por 15 minutos à 13.000 rpm. A fase aquosa foi transferida novamente para outro eppendorf, e adicionado 20 µL de NaCl (5 M). O DNA foi precipitado com adição de 500 µL de etanol absoluto por 1 hora.

Após centrifugação (15 min; 13.000 rpm) o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 500 µL de álcool 70%. Posteriormente, esse foi novamente centrifugado, descartado o sobrenadante e após completa secagem, o DNA foi ressuspenso em 25 µL de TE para o armazenamento (-20 °C).

Foram utilizados um isolado de *C. tropicalis* e ATCC 28367 (*C. albicans*) e ATCC 22019 (*C. parapsilosis*).

4.3.2 PCR em tempo real multiplex

4.3.2.1 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos universal ITS3 e específicos CA (*C. albicans*), CP (*C. parapsilosis*), CT (*C. tropicalis*), ITS2-CAI (*C. albicans*) e ITS2-CAII (*C. albicans*) foram utilizados para amplificar os espaços transcritos interno I e II, incluindo parte do rDNA 5.8S (tabela 1 e figura 15).

Tabela 1. Oligonucleotídeos universal* e específicos utilizados na amplificação das espécies de *Candida*.

Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')	Referência
ITS3 (antisenso)*	AGCTGCCGCCAGAGGTCTAA	Chen et al. (2000)
CA (senso)	AGCTGCCGCCAGAGGTCTAA	Carvalho et al. (2007)
CP (senso)	GTCAACCGATTATTTAATAG	Carvalho et al. (2007)
CT (senso)	GATTTGCTTAATTGCCCCAC	Carvalho et al. (2007)
ITS2-CAI (senso)	GGTTTGCTTGAAAGACGGTAG	Liguori et al. (2010)
ITS2-CAII (antisenso)	AGTTTGAAGATATACGTGGTAG	Liguori et al. (2010)

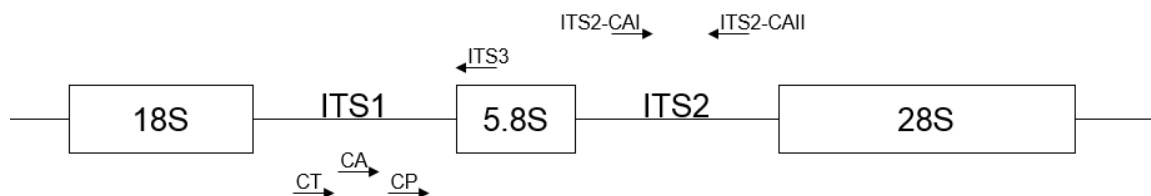


Figura 15. Estratégia da qPCR multiplex. Organização dos genes ribossomais com os alvos e sentidos dos oligonucleotídeos universal e específicos indicados pelas setas.

4.3.2.2 Reação de qPCR multiplex

A reação foi realizada em termociclador iQ5® Optical System Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) com volume final de 25 µL contendo 12,5 µL do mix de reação do kit RT² SYBR® Green Fluor qPCR Mastermix (SABiosciences/Qiagen, Hilden, Germany), 1 µL de DNA extraído (aproximadamente 50 ng), 0,5 µL do oligonucleotídeo CP (0,2 µM), 0,5 µL do CT (0,2 µM), 1,25 µL do CA (0,5 µM), 1,25 µL do ITS2-CAI (0,5 µM), 1,25 µL do ITS2-CAII (0,5 µM), 2,5 µL do ITS3 (1,0 Mm) e 4,5 µL de água milliQ.

A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 10 minutos à 95 °C no ciclo 1, seguido de 40 ciclos de 15 segundos à 95 °C e 60 segundos a 55 °C. Programação final da curva de fusão (Cf) foi realizada com variação de temperatura de 50 °C a 95 °C a uma proporção de 0,1 °C/s.

Todas as reações de PCR foram realizadas em duplicata simultaneamente com o controle negativo (isento de DNA) e a amostra controle positivo constituída de 50 ng de DNA e oligonucleotídeos para amplificação da região conservada do rDNA 18S (5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3' e 5'-CCGATCCCTAGTCGGCATAG-3').

4.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME

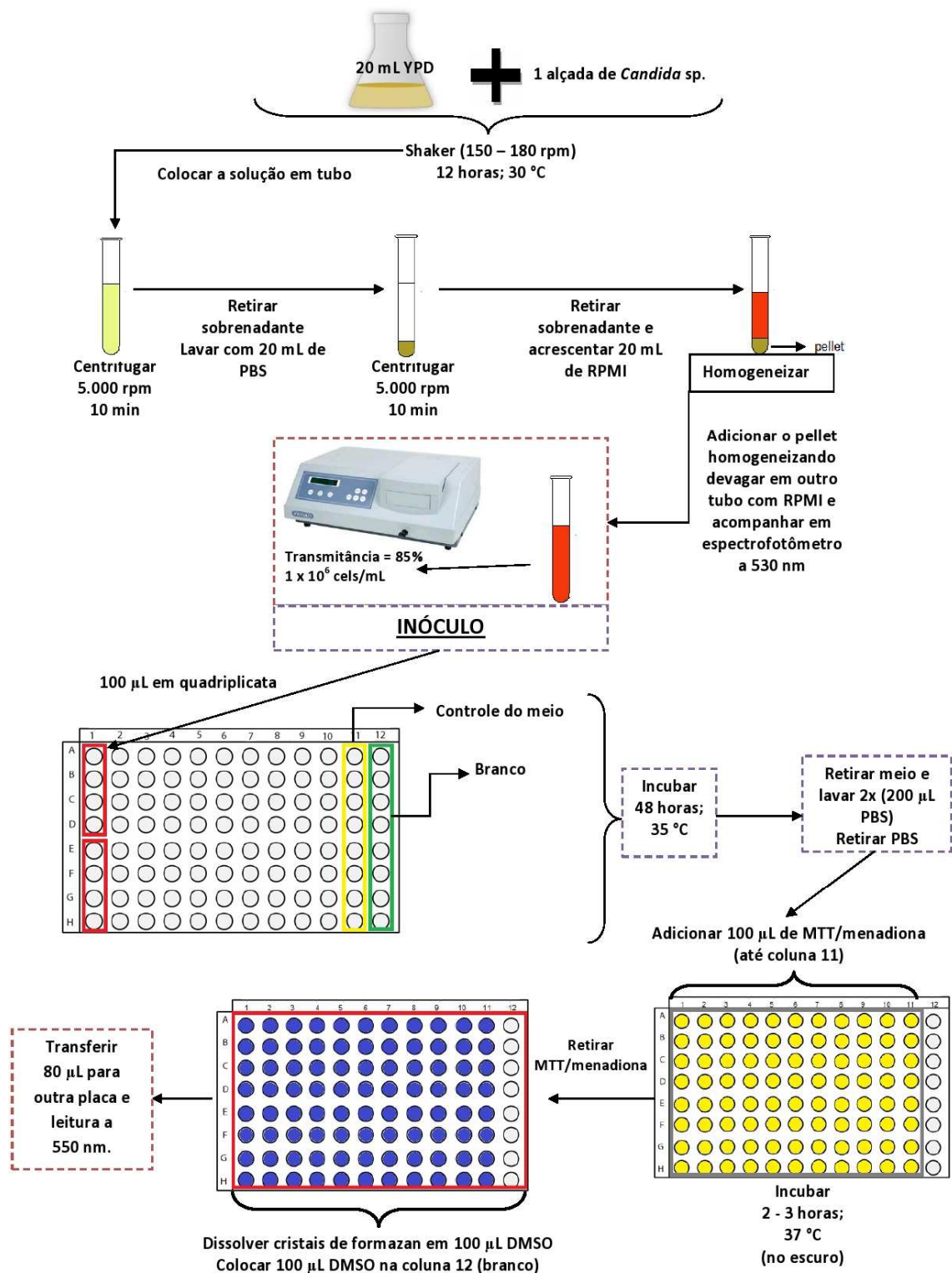
A FB (fluxograma 1) seguiu a metodologia modificada de Pierce et al. (2008). Em um erlenmeyer de 200 mL foram adicionados 20 mL do meio líquido estéril YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%) e uma alçada da amostra de *Candida* sp. de 24 a 48 horas de crescimento. Esse recipiente foi incubado em um shaker orbital (150 - 180 rpm) por 12 - 16 horas a temperatura de 30 °C. O sobrenadante das células resultantes do crescimento da cultura

líquida foi removido por centrifugação (5.000 rpm; 10 minutos; temperatura ambiente) e as células foram lavadas duas vezes com PBS (tampão fosfato salino- 0,099% Na₂HPO₄, 0,027% KH₂PO₄, 0,88% NaCl) estéril gelado (ressuspensão do pellet com 20 mL, vigorosa agitação em vórtex, seguido por centrifugação). O pellet final foi ressuspenso em 20 mL de meio RPMI 1640 (HIMEDIA) e a densidade do inóculo foi ajustada para aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/mL (85% de transmitância a 530 nm em espectrofotômetro) os quais 100 µL deste foram colocados nos orifícios da placa de microtitulação (colunas 1 - 11). A placa foi selada com papel filme e mantida a 37 °C por 48 horas para maturação do biofilme. Após esse período, o meio RPMI 1640 foi retirado com cuidado para não romper o biofilme e lavado duas vezes com 200 µL de PBS para retirar todas as células não aderidas.

A FB foi quantificada medindo a atividade metabólica das células pelo ensaio colorimétrico de redução do sal tetrazólio - MTT. Para cada tubo contendo 10 mL de solução de MTT (0,5%), foi adicionado 1 µL de solução estoque de menadiona (10 mM) e 100 µL dessa mistura foram adicionados em cada orifício (colunas 1 - 11). A placa foi recoberta com papel alumínio e incubada no escuro por 2 - 3 horas a 37 °C.

Ao final da reação, a solução MTT/menadiona foi retirada de todos os orifícios e os cristais de formazan resultantes da redução do MTT, foram dissolvidos em 100 µL de uma solução DMSO. Após total dissolução, 80 µL de cada orifício foram transferidos para nova placa e a absorbância foi medida a um comprimento de onda de 550 nm definindo a coluna 12 como branco da leitura (apenas DMSO).

Cada isolado foi avaliado em quadruplicata e a produção de biofilme foi definida como densidade óptica (DO) maior do que 0,2 (550 nm).



Fluxograma 1. Etapas necessárias para o procedimento de avaliação da formação de células sésseis pelas espécies de *Candida*.

4.4.1 Avaliação ultraestrutural do biofilme por microscopia eletrônica de varredura

Tiras de poliuretano (PU) obtidas de cateter venoso periférico foram assepticamente cortadas e colocadas em placas de cultura celular de 24 orifícios. Um inóculo padrão de 1×10^6 células/mL dos isolados de *Candida* de crescimento de 24 a 48 horas, foram preparados em 2,0 mL de meio RPMI 1640 para formar o biofilme nas tiras de PU. O inóculo padrão foi adicionado aos orifícios das placas que continham as tiras de PU e a placa foi incubada de forma estática a 35 °C por 48 horas. Após o período de incubação, as células não aderidas foram gentilmente lavadas duas vezes com tampão fosfato de sódio e potássio 0,15 M (pH 7,0). Os biofilmes formados nas tiras de PU foram fixadas com 1,25% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio e potássio 0,15 M (pH 7,0) por 24 horas a 4 °C. Após a fixação, as células foram desidratadas com uma série de diluições de álcool etílico (30%, 50%, 70%, 90%, 95% e 100%) à temperatura ambiente, colocadas em câmara de ponto crítico de CO₂ para finalização do processo de desidratação, (Autosamdri®, 815, Series A), revestidas com ouro (Denton Vacuum, Desk V.) e examinadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging).

4.5 SUSCETIBILIDADE *IN VITRO*

4.5.1 Antifúngicos

O teste de suscetibilidade *in vitro* foi realizado com os antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol. Anfotericina B (Pfizer Central Research), caspofungina (Merck & Co) e voriconazol (Bristol-Myers Squibb) foram dissolvidos em DMSO, enquanto o fluconazol (Pfizer) foi dissolvido em água. Esses fármacos foram posteriormente diluídos em meio RPMI 1640 para a obtenção de diferentes concentrações de acordo com o antifúngico.

No teste de suscetibilidade *in vitro* para as células planctônicas o fluconazol foi avaliado em uma concentração inicial de 64 µg/mL, voriconazol e anfotericina B de 16 µg/mL, enquanto para caspofungina de 8 µg/mL. Para as células do biofilme, foram avaliadas concentrações 16 vezes superiores, fluconazol com concentração inicial de 1024 µg/mL, voriconazol e anfotericina B de 256 µg/mL e caspofungina de 128 µg/mL.

4.5.2 Procedimento da metodologia de suscetibilidade *in vitro* para células planctônicas

O teste de suscetibilidade *in vitro* das células na sua forma livre (fluxograma 2) foi realizado por microdiluição em caldo segundo o documento M27-A3 e M27-S4 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008, 2012).

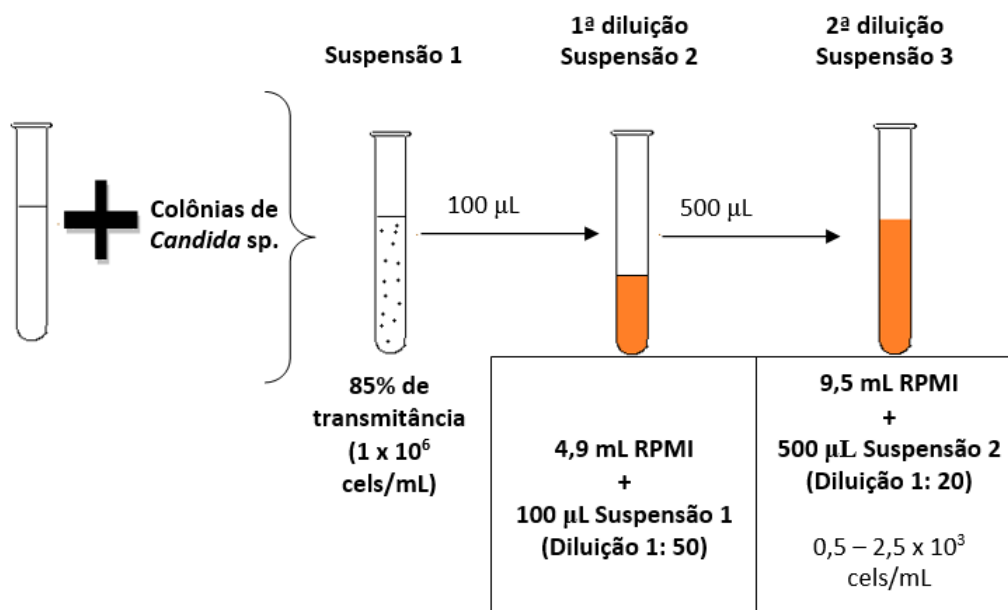
Para o preparo do inóculo, uma suspensão do fungo em salina foi ajustada no espectrofotômetro para transmitância de 85% em comprimento de onda de 530 nm (equivalente a aproximadamente 1×10^6 células/mL). Posterior diluição foi realizada em caldo RPMI 1640 para obtenção da concentração de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/mL.

Foram colocados 200 µL do antifúngico numa concentração ao dobro na primeira coluna da placa de microtitulação de 96 orifícios. Nos outros orifícios (colunas 2 a 11) foram adicionados 100 µL do meio RPMI 1640 e então realizada a diluição seriada ao dobro até a coluna 10. As concentrações variaram de 0,25 a 128 µg/mL para fluconazol, de 0,06 a 32 µg/mL para anfotericina B, caspofungina e de 0,03 a 16 µg/mL para voriconazol.

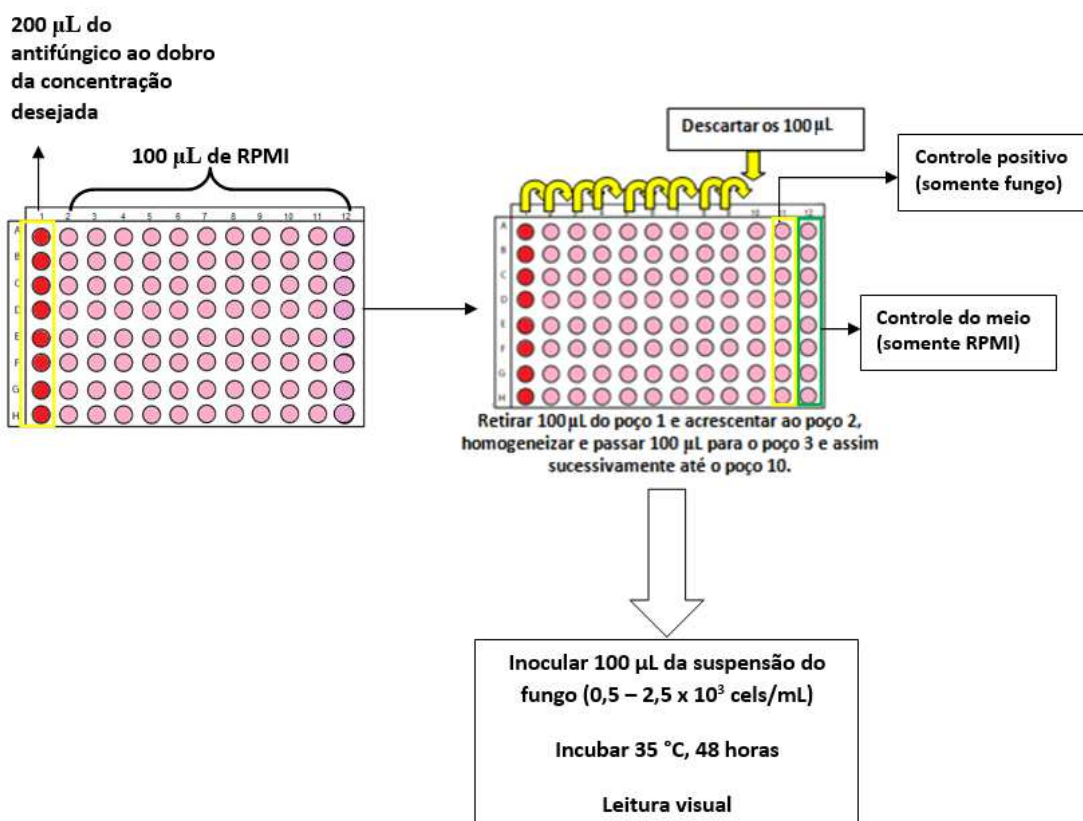
Após a realização da diluição, foram adicionados 100 µL do inóculo de tal modo que as concentrações diluíram ao dobro para cada agente antifúngicos. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas para posterior leitura visual.

A leitura da CIMp foi determinada pela inibição de 50% do crescimento comparada ao controle para azólicos (fluconazol e voriconazol) e caspofungina e inibição total de crescimento para anfotericina B. *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foi utilizada como controle de qualidade. Cada teste de suscetibilidade foi realizado em duplicata.

- **PREPARO DO INÓCULO: CONCENTRAÇÃO FINAL DE $0,5 - 2,5 \times 10^3$ cels/mL**



- **PREPARO DA PLACA PARA O TESTE DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO***



Fluxograma 2. Etapas necessárias para o procedimento teste de suscetibilidade *in vitro* das células plancônicas.

Não existem valores de *breakpoints* estabelecidos no CLSI para anfotericina B, porém, como espécies de *Candida* apresentam sensibilidade com

valores entre 0,25 e 1,0 µg/mL, foram estabelecidos valores resistentes acima de 1 µg/mL (Rex et al. 2001, Pappas et al. 2004, Park et al. 2006). O resultado do teste de suscetibilidade *in vitro* foi definido como sensível, sensível dose-dependente e resistente para os demais antifúngicos de acordo com o CLSI descritos no quadro 2 (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008, 2012).

Quadro 2. Valores definidos para o teste de suscetibilidade *in vitro* de células planctônicas das espécies de *Candida*.

Antifúngico	Espécies	Interpretação (µg/mL)		
		Sensível	Sensível dose-dependente	Resistente
Caspofungina	<i>C. albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1,0
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1,0
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2,0	4,0	≥8,0
Fluconazol	<i>C. albicans</i>	≤2,0	4,0	≥8,0
	<i>C. tropicalis</i>	≤2,0	4,0	≥8,0
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2,0	4,0	≥8,0
Voriconazol	<i>C. albicans</i>	≤0,12	0,25-0,5	≥1,0
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,12	0,25-0,5	≥1,0
	<i>C. parapsilosis</i>	≤0,12	0,25-0,5	≥1,0

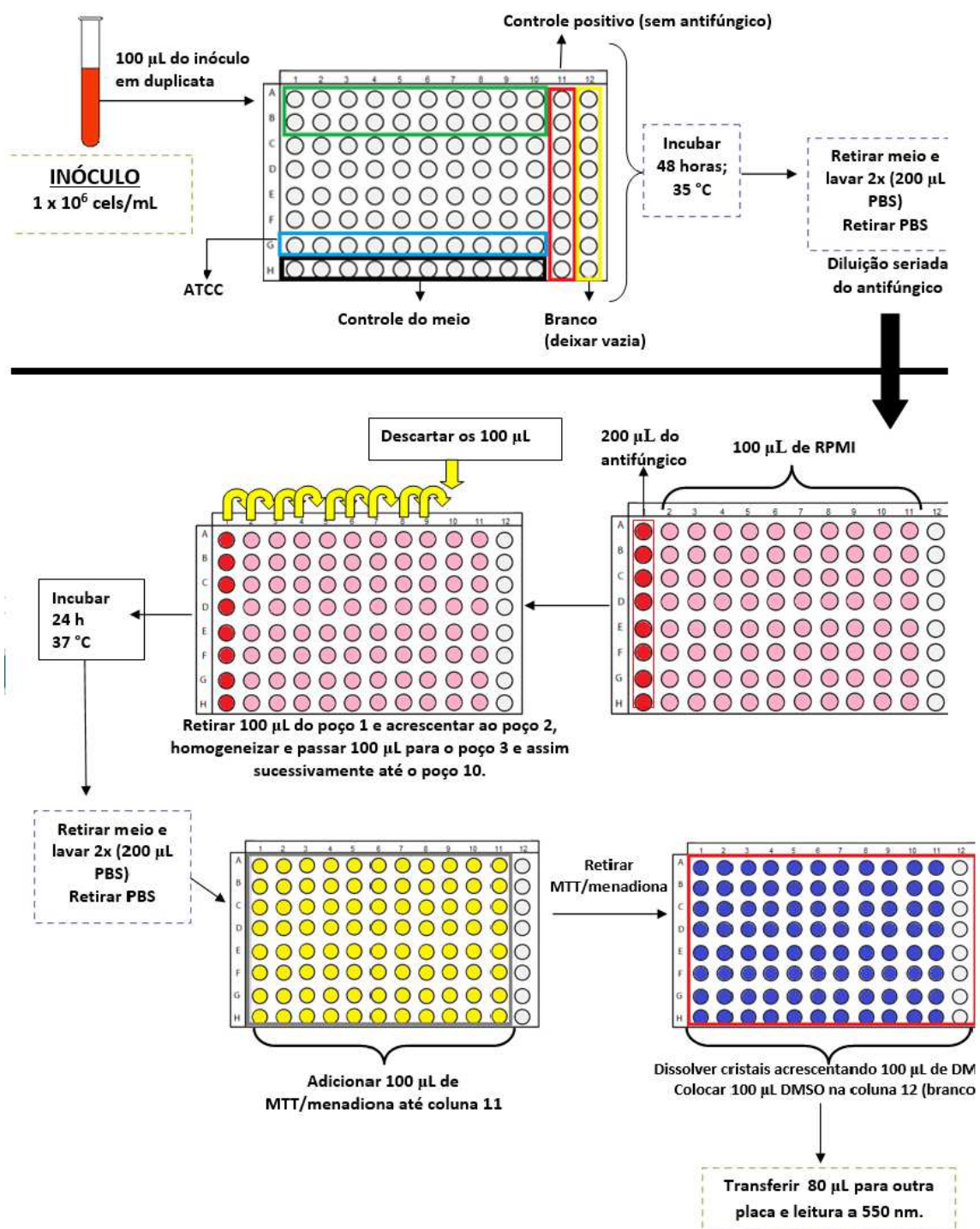
Fonte: Clinical and Laboratory Standards Institute (2008, 2012).

4.5.3 Procedimento da metodologia de suscetibilidade *in vitro* para as células sésseis

O procedimento de determinação da concentração inibitória mínima de células sésseis (CIMS) seguiu a metodologia de Pierce et al. (2008) modificada (fluxograma 3). O inóculo foi preparado de acordo com o procedimento citado no item 4.4. Foram adicionados 100 µL do inóculo em duplicata na placa de microtitulação de 96 orifícios, e incubado por 48 horas a 35 °C. O meio RPMI 1640 foi retirado suavemente e a placa foi lavada duas vezes com 200 µL de PBS para retirar as células não aderidas.

Foram adicionados 200 µL do antifúngico na primeira coluna da placa na concentração inicial conforme descrito em 4.5.1, 100 µL do meio RPMI 1640 nos demais orifícios (colunas 2 a 11) e em seguida realizada uma diluição seriada ao dobro até a coluna 10. Fluconazol teve variação na concentração de 2,0 a 1024

$\mu\text{g/mL}$, anfotericina B e caspofungina tiveram variação de 0,5 a 256 $\mu\text{g/mL}$ e voriconazol de 0,25 a 128 $\mu\text{g/mL}$.



Fluxograma 3. Etapas necessárias para o procedimento teste de suscetibilidade *in vitro* de células sésseis para fungos do gênero *Candida*.

A placa foi selada novamente com papel filme e incubada por 24 horas a 37°C. Após esse período a ação dos antifúngicos foi quantificada utilizando o ensaio de redução do MTT como citado no item 4.4.

A concentração inibitória mínima das células sésseis (CIMs) foi definida como a menor concentração capaz de reduzir a absorbância em 50% (CIMs50%) e 80% (CIMs80%) em comparação ao controle.

4.6 ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi apresentada com média, desvio padrão e porcentagem. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0 para a inferência estatística com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) no teste exato de Fisher utilizado para a avaliação dos resultados qualitativos dos testes de suscetibilidade *in vitro*.

5 RESULTADOS

5.1 PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Candida*

A utilização da qPCR multiplex com oligonucleotídeos específicos para as espécies de *Candida*, demonstrou diferenças na Tf. Após determinação da Tf de cada amostra, foi observado que a espécie *C. albicans* apresentou mais de um pico de fusão, enquanto a espécie *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* mostrou um pico de fusão, no entanto, para diferenciar estas duas espécies, *C. tropicalis* mostrou-se com Tf superior a de *C. parapsilosis* em consequência do tamanho dos fragmentos amplificados.

O gráfico da curva de fusão dos produtos de amplificação da levedura *C. albicans*, apresentou três picos de fusão, com valores de 75,2 °C, 76,8 °C e 79,8 °C, enquanto *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, apresentaram apenas um pico de fusão com valores 73,5°C e 78,5°C, respectivamente (figura 16), demonstrando ser possível a diferenciação das espécies com a metodologia empregada.

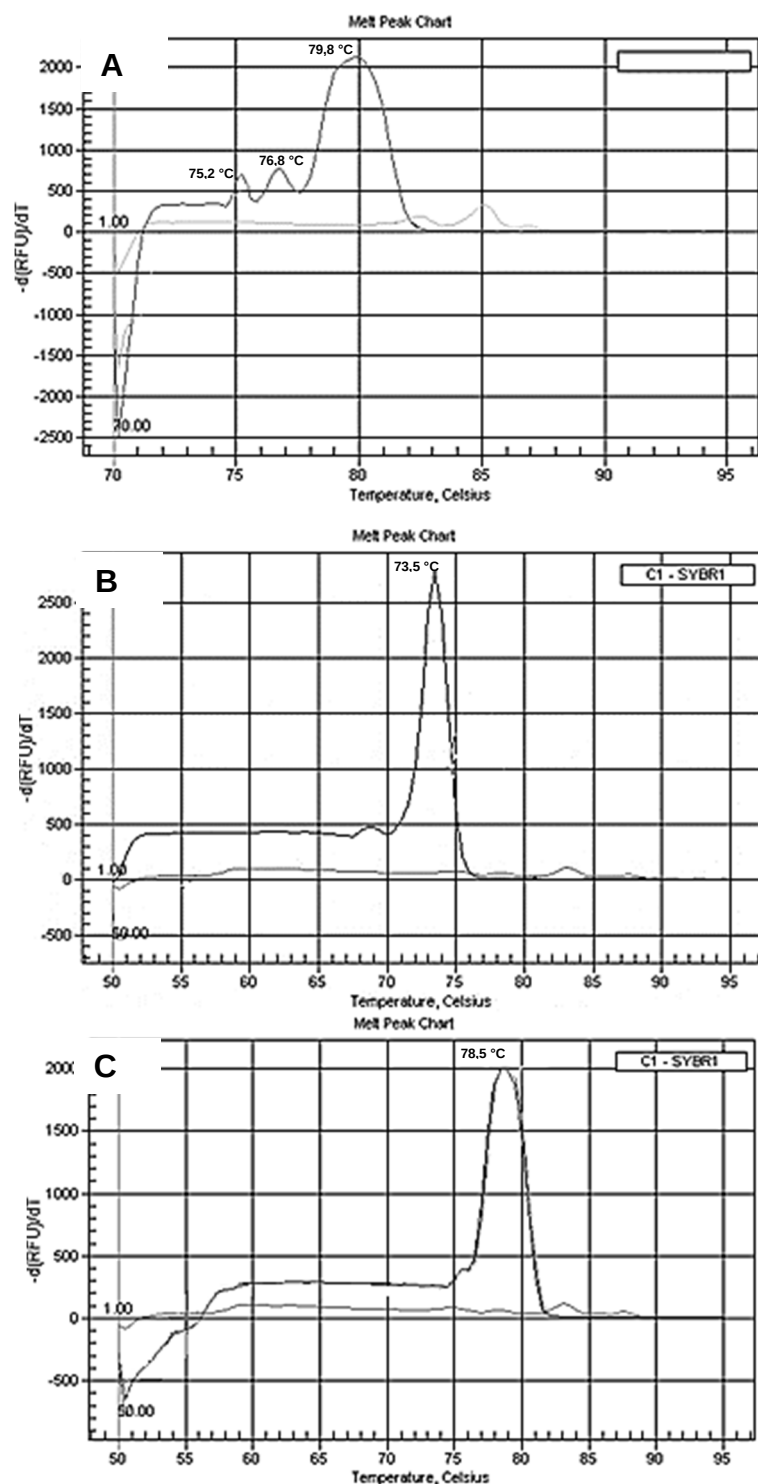


Figura 16. Gráfico da curva de fusão das espécies de *Candida*. A) *C. albicans* B) *C. parapsilosis* C) *C. tropicalis*. A linha inferior é o controle negativo.

5.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME

Na avaliação da capacidade de FB, todas as amostras deste estudo apresentaram capacidade de formar células sésseis (figura 17).

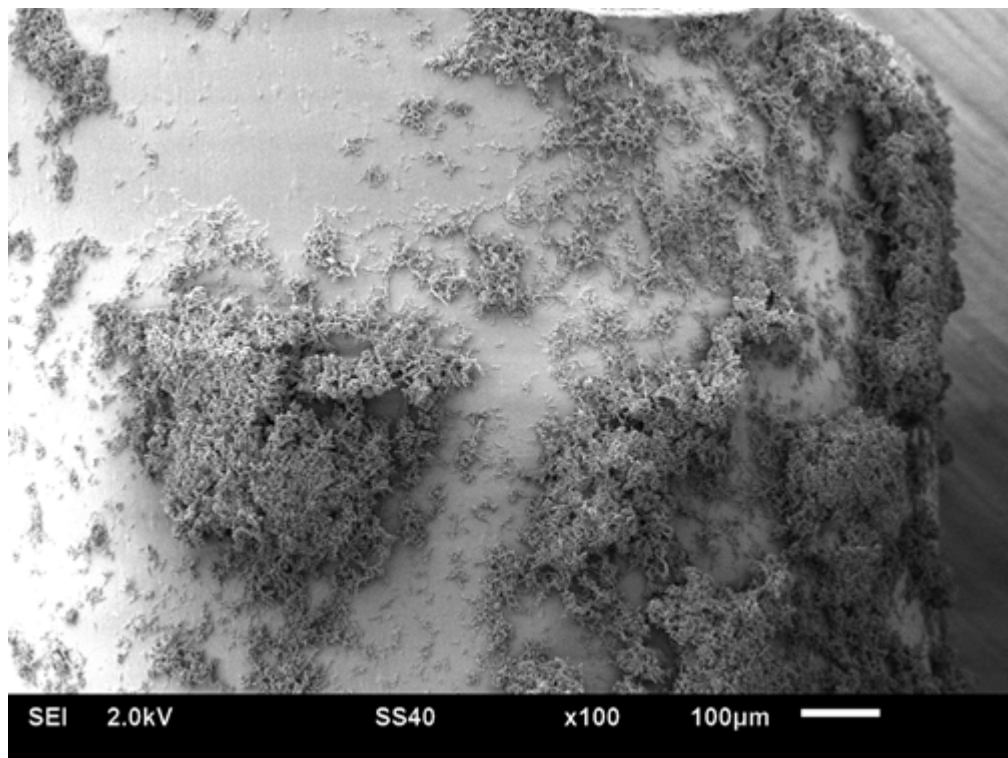


Figura 17. Ultraestrutura do biofilme das espécies de *Candida* formado em tiras de cateter venoso periférico de poliuretano. Microscopia eletrônica de varredura (MEV), 100 X, a barra representa 100 µm.

A ultraestrutura do biofilme das espécies de *Candida* apresentou-se característico de cada espécie. A organização do biofilme da espécie *C. albicans* (figura 18 A) apresentou número elevado de blastoconídios e hifas, morfologia semelhante a de *C. tropicalis* (figura 18 C), no entanto, essa última espécie apresentou menor quantidade de hifas. A levedura *C. parapsilosis* (figura 18 B) evidenciou a presença de blastoconídios, sendo estas marjoritárias, e de pseudohifas.

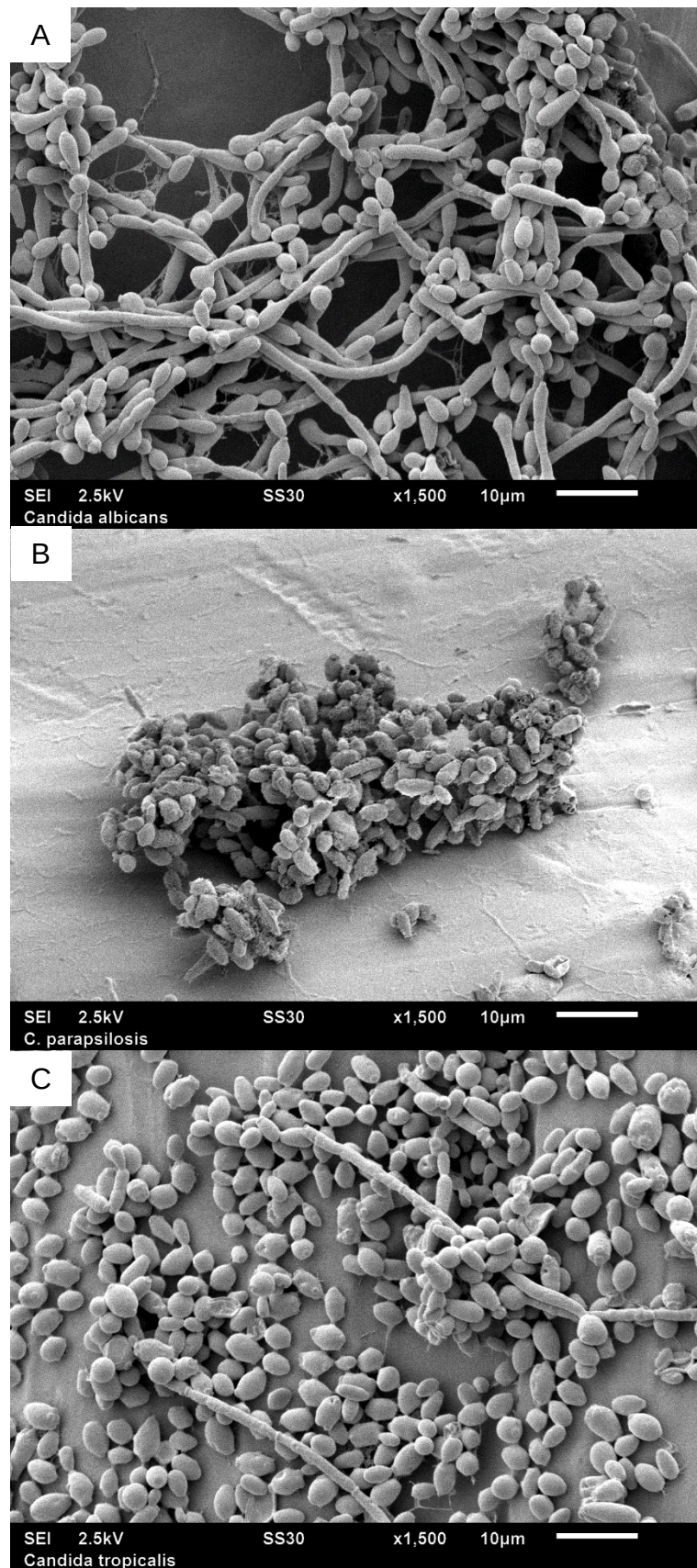


Figura 18. Ultraestrutura do biofilme das espécies de *Candida*. A) *C. albicans* B) *C. parapsilosis* C) *C. tropicalis*. Microscopia eletrônica de varredura (MEV), 1500 X, a barra representa 10 µm.

5.4 TESTES DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO*

O teste de suscetibilidade *in vitro* das células planctônicas de todas as espécies demonstrou que anfotericina B e caspofungina apresentaram melhor atividade em comparação com o fluconazol e voriconazol que obtiveram 19% das amostras resistentes. Dentre as amostras que apresentaram resistência ao fluconazol e voriconazol, a espécie *C. albicans* demonstrou menor suscetibilidade aos fármacos azólicos (tabela 2).

Tabela 2. Resultado do teste de suscetibilidade *in vitro* de células planctônicas das espécies de *Candida* frente aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol.

	AGENTE ANTIFÚNGICO			
	Anfotericina B	Caspofungina	Fluconazol	Voriconazol
<i>Candida albicans</i>				
Sensível [n (%)]	10 (100)	10 (100)	6 (60)	6 (60)
Resistente [n (%)]	-	-	4 (40)*	4 (40)*
Variação da CIMp (µg/mL)	0,125 - >64	<0,03 - 0,25	0,125 - >64	<0,03 - >16
<i>Candida parapsilosis</i>				
Sensível [n (%)]	10 (100)	10 (100)	10 (100%)	10 (100)
Resistente [n (%)]	-	-	-	-
Variação da CIMp (µg/mL)	0,125 – 0,5	0,125 - 1	0,125 - 2	<0,03 – 0,25
<i>Candida tropicalis</i>				
Sensível [n (%)]	1 (100)	1 (100)	1 (100%)	1 (100)
Resistente [n (%)]	-	-	-	-
Variação da CIMp (µg/mL)	0,5	0,25	0,5	<0,03
Total				
Sensível [n (%)]	21 (100%)	21 (100)	17 (81)**	17 (81)**
Resistente [n (%)]	-	-	4 (19)	4 (19)
Variação da CIMp (µg/mL)	0,125 - >64	<0,03 - 1	0,125 - >64	<0.03 - >16

* $p = 0,0351$ (teste exato de Fisher; comparação das amostras sensíveis e resistentes de espécies *C. albicans* e CNA); ** $p = 0,0017$ (teste exato de Fisher; comparação entre anfotericina B/caspofungina com fluconazol/voriconazol).

Na avaliação da atividade antifúngica exercida no biofilme (tabela 3), os derivados azólicos (fluconazol e voriconazol) tiveram baixa influência nas células

sésseis enquanto anfotericina B e caspofungina apresentaram melhor atividade contra os isolados (tabela 3).

Tabela 3. Variação da concentração inibitória mínima das células sésseis das espécies de *Candida* testadas frente aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol.

	AGENTE ANTIFÚNGICO			
	Anfotericina B	Caspofungina	Fluconazol	Voriconazol
<i>Candida albicans</i>				
CIMs50% (µg/mL)	<0,5 - 4	16 - >128	512 - >1024	128 - 256
CIMs80% (µg/mL)	0,5 - 32	64 - >128	1024 - >1024	256 - > 256
<i>Candida parapsilosis</i>				
CIMs50% (µg/mL)	1 - 128	16 - >128	>1024	32 - >256
CIMs80% (µg/mL)	16 - 256	32 - > 128	>1024	128 - >256
<i>Candida tropicalis</i>				
CIMs50% (µg/mL)	1	64	>1024	64
CIMs80% (µg/mL)	64	>128	>1024	128
Total				
CIMs50% (µg/mL)	<0,5 - 128	16 - >128	512 - >1024	32 - >256
CIMs80% (µg/mL)	0,5 - 256	32 - >128	1024 - >1024	128 - >256

Os dados obtidos nos testes de suscetibilidade *in vitro* demonstram um aumento da CIMs50% e CIMs80% de todos os fármacos avaliados em comparação aos valores observados para as células planctônicas. A média aproximada destes resultados das células sésseis demonstrou um aumento de pelo menos 70, 203, 77 e 63 vezes do valor obtidos das células planctônicas para os fármacos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol, respectivamente (figura 19).

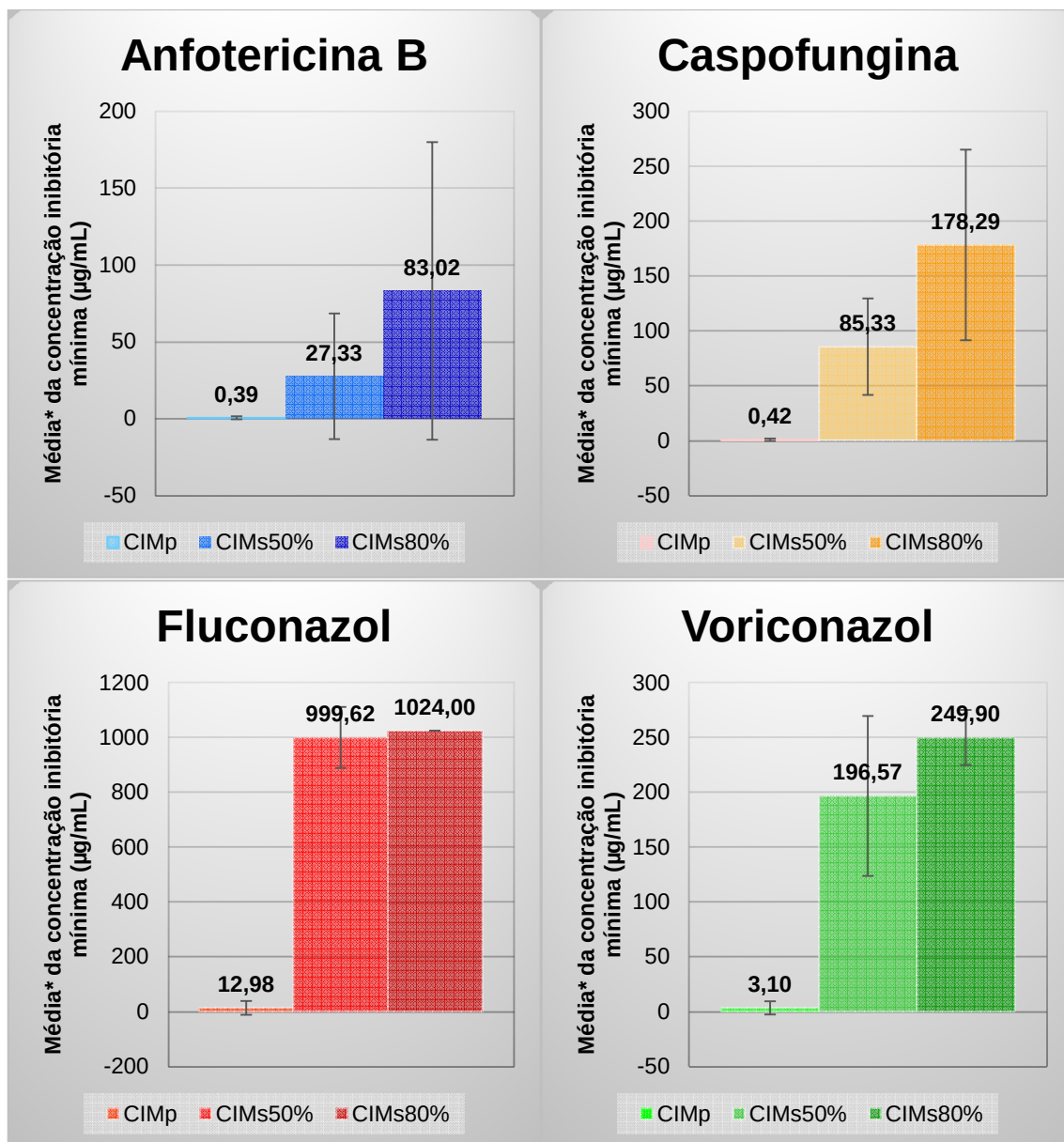


Figura 19. Resultado do teste de suscetibilidade *in vitro* das células planctônicas e sésseis frente aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol. Os valores expressos nas colunas são as médias e as barras representam o desvio padrão.

6 DISCUSSÃO

É evidente a importância da identificação das espécies dos patógenos fúngicos que são responsáveis pelas infecções nosocomiais, visto que, dependendo do patógeno acometido, existe predisposição para a existência de resistência aos fármacos antifúngicos (Ramage et al. 2006).

Diversos estudos empregam a qPCR multiplex para identificação de espécies de *Candida* (Carvalho et al. 2007, Romeo et al. 2009, Mallus et al. 2013), no entanto a identificação de muitas espécies em um ensaio com oligonucleotídeos espécie-específicos implica em uma maior probabilidade de interação entre os iniciadores e consequentemente diminuição da sensibilidade do teste (Wei et al. 2008). Apesar das diversas possibilidades para evitar a interação dos oligonucleotídeos, como a escolha correta da temperatura de anelamento, a possibilidade de interação demonstra ser mais um obstáculo no desenvolvimento da técnica, sendo assim, a técnica deve ser direcionada para as espécies de maior prevalência acometidas na região do estudo.

Ensaio para a diferenciação de espécies de *Candida* pela avaliação da curva de fusão ao final da qPCR multiplex geralmente apresentam T_f com baixa faixa de variação entre os picos de fusão apresentados pelas espécies. A variação entre a T_f das espécies deve ser suficiente para que não haja sobreposição de valores quando existem mutações pontuais no material genético do patógeno nas regiões amplificadas (Lyon 2001, Herrmann et al. 2007). Isto ocorre na análise de regiões não codificantes do material genético, como os espaços transcritos internos 1 (ITS1) e 2 (ITS2) do DNA ribossomal (rDNA), locais com maior probabilidade de alteração do que as regiões codificantes desse mesmo gene.

Nas condições analíticas empregadas neste estudo houve uma variação considerável de 5 °C entre as T_f das espécies *C. parapsilosis* (73,5 °C) e *C. tropicalis* (78,5 °C) na amplificação da região ITS1 do rDNA (figura 16B e 16C). Essa diferença permitiu uma aplicação segura do proposto teste no diagnóstico laboratorial dessas espécies. Por outro lado, a amplificação dessa região da espécie *C. albicans* demonstrou um pico de fusão próximo (79,8 °C) ao observado pela espécie *C. tropicalis*, no entanto, é importante ressaltar que eles não estão sobrepostos. Utilizando outro par de oligonucleotídeos para a região ITS2 do DNAr específicos para *C. albicans* foi proposto o aumento da confiança da

identificação de *C. albicans*, pois a inclusão desses iniciadores no meio reacional possibilitou a diferenciação precisa dessa espécie pela apresentação de mais dois picos de fusão com valores de 75,2 °C e 76,8 °C (figura 16A).

As leveduras do gênero *Candida* apresentam como importante fator de virulência a capacidade de FB (Lim et al. 2012) e todas as amostras de *Candida* deste estudo apresentou capacidade de formar células sésseis. As espécies de *Candida* estudadas foram obtidas de infecção da corrente sanguínea, mas se desconhece a formação de biofilme, embora todos os pacientes faziam uso de cateter e foi constatado neste estudo a capacidade de FB destas espécies. Dessa forma, a presença de biomassa se torna uma fonte de reinfecção com consequentes quadros recorrentes e aumento da mortalidade dos pacientes (Lim et al. 2012).

Com relação a capacidade de FB, Pannanusorn et al. (2013) observaram que 40,3% de *C. albicans*, 66,7% de *C. parapsilosis* e 100% dos isolados de *C. tropicalis* apresentaram a formação de biomassa. Interessante observar que todos os isolados das espécies deste estudo apresentaram a característica de FB.

A presença de uma forma grave de infecção, além de ser consequência da imunodepressão do paciente, está relacionada com a expressão de fatores de virulência do microrganismo (Mitchell 2006). Sendo assim, pressupõe-se que as espécies deste estudo apresentam virulência aumentada, visto que são originados de pacientes com a infecção fúngica instalada e apresentam como fator de virulência expresso a capacidade de FB.

O desenvolvimento de biofilme pelas espécies de *Candida* ocorre em diversos dispositivos invasivos com frequência elevada (Crump & Collignon 2000, Ramage et al. 2006, Seddiki et al. 2013). A presença dessas estruturas em cateter venoso central é de grande preocupação, uma vez que representam a porta de entrada direta para as células fúngicas na corrente sanguínea que apresentam resistência a fármacos antifúngicos (Ramage et al. 2006). Além disso, a definição de um diagnóstico é difícil, sendo necessário o isolamento dos agentes patogênicos do sangue e do cateter venoso central.

Uma possível forma de aperfeiçoar o diagnóstico é a análise de cateteres suspeitos de envolvimento por biofilme por meio da microscopia eletrônica de varredura, a fim de detectar a presença de células sésseis e realizar a identificação preliminar da espécie. A organização das células do biofilme de

fungos do gênero *Candida* com maior prevalência de isolamento de pacientes com candidíase nosocomial em diversos países (Quindos 2014), muitas vezes se apresenta diferente entre as espécies, como pode ser observado para *C. albicans* (Thein et al. 2007), *C. parapsilosis* (Lattif et al. 2010) e *C. tropicalis* (Bizerra et al. 2008).

No presente estudo, as características ultraestruturais de biofilmes formados pelas espécies de *Candida* estão de acordo com os relatados na literatura. *C. albicans* e *C. tropicalis* possuem blastoconídios com hifas, mas a espécie *C. albicans* forma filamentos em maior número (Thein et al. 2007, Bizerra et al. 2008) e *C. parapsilosis*, basicamente, mostra a formação de blastoconídios com pseudohifas (Lattif et al. 2010).

Apesar do atual elevado custo e dificuldade de acesso aos equipamentos para desenvolvimento da MEV, é extremamente importante que seja realizado o diagnóstico de resistência antifúngica em consequência da formação de biofilme pelo patógeno que acarreta dificuldades no tratamento do paciente. Essa análise da presença de biomassa pode ser realizada diretamente da ponta do cateter retirado do paciente por meio de análise por MEV, como realizado neste trabalho.

Anfotericina B e caspofungina são antifúngicos amplamente utilizados no tratamento da candidíase (Rautemaa et al. 2008), assim como o voriconazol e fluconazol (Diekema et al. 2009, Pappas et al. 2009). Dentre esses fármacos, existem relatos da espécie *C. albicans* com redução da suscetibilidade ao fluconazol (Prasad & Kapoor 2005, Coste et al. 2007, Mishra et al. 2007) como observado neste estudo.

A resistência aos azólicos parece ter relação com pacientes imunodeprimidos, como indivíduos infectados com o HIV, pacientes com câncer e transplantados que fazem uso de medicamentos imunossupressores. Nesses casos, a menor sensibilidade aos antifúngicos se desenvolve devido à associação do status do sistema imune com o longo período de terapia antifúngica que possibilita ao fungo, desenvolver mecanismos de resistência ao fármaco, como a maior expressão de genes que codificam as bombas de efluxo, responsáveis pelo transporte dos fármacos do meio intracelular para o extracelular (Walmsley et al. 2001, Ribeiro et al. 2005, Robenshtok et al. 2007, Prehn & Prehn 2010, Avery 2011, Trudeau et al. 2013).

As células planctônicas deste estudo que tiveram resistência ao fluconazol, apresentaram resistência ao antifúngico voriconazol. Pfaller et al. (2002), com base na análise de quase 7.000 amostras de *Candida* de 200 centros médicos, constataram diminuição da suscetibilidade ao voriconazol em cepas dose-dependentes e resistentes ao fluconazol. Esses dados evidenciam a existência de resistência cruzada por parte dos isolados entre os compostos azólicos que apresentam como principal mecanismo de resistência o aumento da expressão de genes codificantes de bombas de efluxo (Muller et al. 2000, Wakiec et al. 2007).

Apesar da observação de atividade antifúngica contra as células do biofilme, a grande maioria das concentrações definidas é considerada alta e terapia com elevadas concentrações desses fármacos apresenta risco ao paciente devido à potencial toxicidade. Anfotericina B tem nefrotoxicidade intrínseca por apresentar esse efeito mesmo em concentrações baixas (Fanos & Cataldi 2000) e caspofungina também é nefrotóxica, mas com atuação menor do que o macrolídeo poliênico (Wilke 2011). Para os derivados azólicos, o fluconazol apresenta como principais efeitos adversos hepatotoxicidade e efeitos gastrointestinais, como náusea, diarreia e vômitos (Egunsola et al. 2013), enquanto que voriconazol, além da elevação das enzimas hepáticas, também apresenta toxicidade neurológica como confusão, alucinação e agitação (Hamada et al. 2013).

Bujdakova et al. (2012) observaram que o biofilme pode ser inibido por fármacos azólicos, entretanto apenas nas primeiras fases de formação dessa biomassa que ocorre antes de 48 horas. Os isolados que apresentaram um biofilme pequeno e com inibição nos estágios iniciais, após a maturação, não mostraram células sésseis sensíveis a esses fármacos.

Jain et al. (2007) apresentaram resultados semelhantes aos observados neste estudo nos testes para todas as espécies de *Candida* na sua forma livre e na conformação de biofilme para a anfotericina B e caspofungina. Todas as células planctônicas foram sensíveis à anfotericina B e caspofungina, enquanto que para as células sésseis houve um aumento considerável na CIMs. No entanto, diminuição da suscetibilidade foi observada em menor proporção para a anfotericina B, que aumentou em 70 vezes a CIMs, quando comparado a caspofungina (200 vezes). Apesar da toxicidade do macrolídeo poliênico, anfotericina B, é um fármaco eficaz, amplamente utilizado no ambiente hospitalar,

sendo que este, em determinadas situações de candidemia, apresenta-se como o fármaco de primeira escolha (Pappas et al. 2009).

Os dados obtidos neste estudo demonstram alta frequência de formação de biofilme, enfatizando a importância do diagnóstico e combate a essa biomassa formada pelas espécies de *Candida*, visto que foi demonstrado um aumento considerável na concentração inibitória mínima dos fármacos antifúngicos no combate das células sésseis que implica em um mau prognóstico para o paciente mediante a terapia antifúngica.

7 CONCLUSÕES

- A metodologia qPCR multiplex empregada demonstrou ser uma técnica de grande importância na identificação das principais espécies de *Candida* observadas em isolamento de pacientes com candidíase nosocomial;
- A capacidade de formação de biofilme por todos os isolados de *Candida*, mostra que este fator de virulência pode ocorrer e provavelmente dificulta a terapia antifúngica, acarretando muitas vezes em um processo grave de doença;
- Os achados de espécies resistentes aos derivados azólicos e com elevados valores de CIMs de células de *Candida* em biofilme, mostram a importância do método de suscetibilidade *in vitro* para a terapêutica adequada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfaresi M, Elkosh A. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species using real-time PCR with SYBR Green and melting-curve analysis. *J Med Microbiol* 55(Pt 12): 1711-1715, 2006.

Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A, Barcelona Candidemia Project Study G. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 43(4): 1829-1835, 2005.

Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. Elsevier. China, 2009.

Anil Kumar MS, Irfan Saeed M, Ranganna K, Malat G, Sustento-Reodica N, Kumar AM, Meyers WC. Comparison of four different immunosuppression protocols without long-term steroid therapy in kidney recipients monitored by surveillance biopsy: five-year outcomes. *Transpl Immunol* 20(1-2): 32-42, 2008.

Antunes AG, Pasqualotto AC, Diaz MC, d'Azevedo PA, Severo LC. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 46(5): 239-241, 2004.

Avery RK. Antifungal prophylaxis in lung transplantation. *Semin Respir Crit Care Med* 32(6): 717-726, 2011.

Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 49(2): 665-670, 2011.

Ataides FS, Chaul MH, Costa CR, Souza LKH, Fernandes OFL, Silva MRR. Antifungal susceptibility patterns of yeasts and filamentous fungi isolated from nail infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1, 2011.

Benson DA, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res* 42(Database issue): D32-37, 2014.

Bergamasco MD, Garnica M, Colombo AL, Nucci M. Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. *Mycoses* 56(3): 256-263, 2013.

Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res* 8(3): 442-450, 2008.

Blanco JL, Garcia ME. Immune response to fungal infections. *Vet Immunol Immunopathol* 125(1-2): 47-70, 2008.

Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* 9(6): 588-594, 2006.

Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TI. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect* 59(2): 159-162, 2005.

Boonyasiri A, Jearanaisilavong J, Assanasen S. Candidemia in Siriraj Hospital: epidemiology and factors associated with mortality. *J Med Assoc Thai* 96 Suppl 2: S91-97, 2013.

Bujdakova H, Kulkova N, Cernakova L. Susceptibility to caspofungin and fluconazole and *Als1/Als3* gene expression in biofilm and dispersal cells of *Candida albicans*. *Arh Hig Rada Toksikol* 63(4): 497-503, 2012.

Carrillo-Munoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindos G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter* 19(2): 130-139, 2006.

Carvalho A, Costa-De-Oliveira S, Martins ML, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Ludovico P, Rodrigues F. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med Mycol* 45(7): 619-627, 2007.

Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK, Ribeiro AM, Amaral AA, Alves SH, Schrank A, Meyer W, Vainstein MH. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res* 3(4): 405-415, 2003.

Chang MR, Correia FP, Costa LC, Xavier PC, Palhares DB, Taira DL, Paniago AM, Pontes ER, Machado VE. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50(5): 265-268, 2008.

Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol* 38(6): 2302-2310, 2000.

Christen R. Global sequencing: a review of current molecular data and new methods available to assess microbial diversity. *Microbes Environ* 23(4): 253-268, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd ed. Document M27-A3, 2008

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Fourth Informational Supplement. Document M27-S4, 2012

Colombo AL. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. *Braz J Infect Dis* 4(3): 113-118, 2000.

Cordoba S, Vivot W, Bosco-Borgeat ME, Taverna C, Szusz W, Murisengo O, Isla G, Davel G. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 43(3): 176-185, 2011.

Cortes JA, Reyes P, Gomez C, Buitrago G, Leal AL. Fungal bloodstream infections in tertiary care hospitals in Colombia. *Rev Iberoam Micol* 28(2): 74-78, 2011.

Corti M, Solari R, De Carolis L, Cangelosi D, Arechavala A, Negroni R. *Candida parapsilosis* meningitis in a patient with AIDS. Report of a case and review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 30(2): 122-124, 2013.

Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux ME, d'Enfert C, Berman J, Sanglard D. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* 6(10): 1889-1904, 2007.

Crump JA, Collignon PJ. Intravascular catheter-associated infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19(1): 1-8, 2000.

Decat E, Van Mechelen E, Saerens B, Vermeulen SJ, Boekhout T, De Blaiser S, Vaneechoutte M, Deschaght P. Rapid and accurate identification of isolates of *Candida* species by melting peak and melting curve analysis of the internally transcribed spacer region 2 fragment (ITS2-MCA). *Res Microbiol* 164(2): 110-117, 2013.

Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73(1): 45-48, 2012.

Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Kroeger J, Jones RN, Pfaller MA. A global evaluation of voriconazole activity tested against recent clinical isolates of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63(2): 233-236, 2009.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15(2): 167-193, 2002.

Dorak MT. Real-Time PCR. Taylor & Francis Group. New York, 2007.

Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 11(1): 30-36, 2003.

Ece G, Samlioglu P, Akkoclu G, Atalay S, Kose S. The evaluation of the distribution of yeast like fungi 'Candida Species' at a tertiary care center in western Turkey. *Int J Med Sci* 9(7): 617-620, 2012.

Egunsola O, Adefurin A, Fakis A, Jacqz-Aigrain E, Choonara I, Sammons H. Safety of fluconazole in paediatrics: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol* 69(6): 1211-1221, 2013.

- Fanos V, Cataldi L. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. *J Chemother* 12(6): 463-470, 2000.
- Fortun J, Ruiz I, Martin-Davila P, Cuenca-Estrella M. Fungal infection in solid organ recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30 Suppl 2: 49-56, 2012.
- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13(1): 122-143, table of contents, 2000.
- Giri S, Kindo AJ. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian J Med Microbiol* 30(3): 270-278, 2012.
- Goldani LZ, Mario PS. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. *J Infect* 46(3): 155-160, 2003.
- Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 10(2): 112-122, 2012.
- Hamada Y, Tokimatsu I, Mikamo H, Kimura M, Seki M, Takakura S, Ohmagari N, Takahashi Y, Kasahara K, Matsumoto K, Okada K, Igarashi M, Kobayashi M, Mochizuki T, Nishi Y, Tanigawara Y, Kimura T, Takesue Y. Practice guidelines for therapeutic drug monitoring of voriconazole: a consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring. *J Infect Chemother* 19(3): 381-392, 2013.
- Hays C, Duhamel C, Cattoir V, Bonhomme J. Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis. *J Med Microbiol* 60(Pt 4): 477-480, 2011.
- Herrmann MG, Durtschi JD, Wittwer CT, Voelkerding KV. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin Chem* 53(8): 1544-1548, 2007.
- Hobson RP. The global epidemiology of invasive *Candida* infections--is the tide turning? *J Hosp Infect* 55(3): 159-168; quiz 233, 2003.
- Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol* 41(6): 2629-2632, 2003.
- Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T, Fries BC. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Appl Environ Microbiol* 73(6): 1697-1703, 2007.
- Jimenez-Lopez C, Lorenz MC. Fungal immune evasion in a model host-pathogen interaction: *Candida albicans* versus macrophages. *PLoS Pathog* 9(11): e1003741, 2013.

Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis* 46(1): 120-128, 2008.

Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, Gadhwe S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg Med Chem* 20(19): 5678-5698, 2012.

Khademvatan S, Neisi N, Maraghi S, Saki J. Diagnosis and identification of *Leishmania* spp. from Giemsa-stained slides, by real-time PCR and melting curve analysis in south-west of Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 105(8): 559-565, 2011.

Khosravi AR, Yarahmadi S, Baiat M, Shokri H, Pourkabireh M. Factors affecting the prevalence of yeasts in the oral cavity of patients with diabetes mellitus. *J Mycol Med* 18: 83-88, 2008.

Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 17(2): 255-267, 2004.

Kourkoumpetis TK, Fuchs BB, Coleman JJ, Desalermos A, Mylonakis E. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* 54(9): 1322-1331, 2012.

Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 50(4): 243-260, 2002.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27(2-3): 95-125, 2006.

Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 5(6): 608-611, 2002.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier. United States of America, 2011.

Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart SR, Diekema DJ, Pfaller MA, Ghannoum MA. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol* 300(4): 265-270, 2010.

Leung AY, Chim CS, Ho PL, Cheng VC, Yuen KY, Lie AK, Au WY, Liang R, Kwong YL. *Candida tropicalis* fungaemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors. *J Hosp Infect* 50(4): 316-319, 2002.

Liguori G, Galle F, Lucariello A, Di Onofrio V, Albano L, Mazzarella G, D'Amora M, Rossano F. Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida* spp. identification. *New Microbiol* 33(1): 63-67, 2010.

Lim CS, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(1): 21-31, 2012.

Lugert R, Schettler C, Gross U. Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR for the detection of fungal pathogens in vitro. *Mycoses* 49(4): 298-304, 2006.

Lyon E. Mutation detection using fluorescent hybridization probes and melting curve analysis. *Expert Rev Mol Diagn* 1(1): 92-101, 2001.

Mallus F, Martis S, Serra C, Loi G, Camboni T, Manzin A. Usefulness of capillary electrophoresis-based multiplex PCR assay for species-specific identification of *Candida* spp. *J Microbiol Methods* 92(2): 150-152, 2013.

Mavor AL, Thewes S, Hube B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets* 6(8): 863-874, 2005.

Meletiadiis J, Mouton JW, Meis JF, Bouman BA, Donnelly JP, Verweij PE, Network E. Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 39(9): 3402-3408, 2001.

Miceli MH, Diaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 11(2): 142-151, 2011.

Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, Singh R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 54(3): 201-235, 2007.

Mitchell AP. Host-microbe interactions: fungi. *Curr Opin Microbiol* 9: 331-332, 2006.

Moretti ML, Trabasso P, Lyra L, Fagnani R, Resende MR, de Oliveira Cardoso LG, Schreiber AZ. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. *Med Mycol* 51(3): 225-230, 2013.

Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66(4): 373-384, 2010.

Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat* 7(4-5): 301-309, 2004.

Muller FM, Weig M, Peter J, Walsh TJ. Azole cross-resistance to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole in clinical *Candida albicans* isolates from HIV-infected children with oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother* 46(2): 338-340, 2000.

Nace HL, Horn D, Neofytos D. Epidemiology and outcome of multiple-species candidemia at a tertiary care center between 2004 and 2007. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64(3): 289-294, 2009.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(3): 400-428, table of contents, 2003.

Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58(1): 77-82, 2007.

Nweze EI, Ogbonnaya UL. Oral *Candida* isolates among HIV-infected subjects in Nigeria. *J Microbiol Immunol Infect* 44(3): 172-177, 2011.

Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11(6): 272-279, 2003.

Pannanusorn S, Fernandez V, Romling U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses* 56(3): 264-272, 2013.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Jr., Calandra TF, Edwards JE, Jr., Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Infectious Diseases Society of A. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48(5): 503-535, 2009.

Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE, Infectious Diseases Society of A. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 38(2): 161-189, 2004.

Park BJ, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA, Iqbal N, Ciblak MA, Lee-Yang W, Hairston MD, Phelan M, Plikaytis BD, Sofair AN, Harrison LH, Fridkin SK, Warnock DW. Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 50(4): 1287-1292, 2006.

Peman J, Canton E, Minana JJ, Florez JA, Echeverria J, Ortega DN, Alarcon JM, Fontanals D, Sard BG, Moreno BB, Torroba L, Ayats J, Perez MA, Fernandez MA, Reus FS, Natal IF, Garcia GR, Ezpeleta G, Martin-Mazuelos E, Iglesias I, Rezusta A, de Ocariz IR, Nieto AG. Changes in the epidemiology of fungaemia and fluconazole susceptibility of blood isolates during the last 10 years in Spain: results from the FUNGEMYCA study. *Rev Iberoam Micol* 28(2): 91-99, 2011.

Pendrak ML, Roberts DD. Ribosomal RNA processing in *Candida albicans*. *RNA* 17(12): 2235-2248, 2011.

Person AK, Kontoyiannis DP, Alexander BD. Fungal infections in transplant and oncology patients. *Infect Dis Clin North Am* 24(2): 439-459, 2010.

Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the

Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance(R)) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74(4): 323-331, 2012.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20(1): 133-163, 2007.

Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Diekema DJ. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 46(6): 1723-1727, 2002.

Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Jr., Mowat E, Ramage G, Lopez-Ribot JL. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc* 3(9): 1494-1500, 2008.

Prasad R, Kapoor K. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int Rev Cytol* 242: 215-248, 2005.

Prehn RT, Prehn LM. Cancer immunotherapy by immunosuppression. *Theor Biol Med Model* 7: 45, 2010.

Quindos G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol* 31(1): 42-48, 2014.

Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 6(7): 979-986, 2006.

Rautemaa R, Richardson M, Pfaller MA, Perheentupa J, Saxen H. Activity of amphotericin B, anidulafungin, caspofungin, micafungin, posaconazole, and voriconazole against *Candida albicans* with decreased susceptibility to fluconazole from APECED patients on long-term azole treatment of chronic mucocutaneous candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 62(2): 182-185, 2008.

Resende JC, de Resende MA, Saliba JL. Prevalence of *Candida* spp. in hospitalized patients and their risk factors. *Mycoses* 45(8): 306-312, 2002.

Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 14(4): 643-658, table of contents, 2001.

Ribeiro MA, Paula CR, John R, Perfect JR, Cox GM. Phenotypic and genotypic evaluation of fluconazole resistance in vaginal *Candida* strains isolated from HIV-infected women from Brazil. *Med Mycol* 43(7): 647-650, 2005.

Robenshtok E, Gafter-Gvili A, Goldberg E, Weinberger M, Yeshurun M, Leibovici L, Paul M. Antifungal prophylaxis in cancer patients after chemotherapy or

hematopoietic stem-cell transplantation: systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 25(34): 5471-5489, 2007.

Romeo O, Scordino F, Pernice I, Lo Passo C, Criseo G. A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. *J Microbiol Methods* 79(1): 117-120, 2009.

Rosado V, Camargos PA, Clemente WT, Romanelli RM. Incidence of infectious complications associated with central venous catheters in pediatric population. *Am J Infect Control* 41(9): e81-84, 2013.

Ruhnke M, Rickerts V, Cornely OA, Buchheidt D, Glockner A, Heinz W, Hohl R, Horre R, Karthaus M, Kujath P, Willinger B, Presterl E, Rath P, Ritter J, Glasmacher A, Lass-Flörl C, Groll AH, German Speaking Mycological S, Paul-Ehrlich-Society for C. Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Mycoses* 54(4): 279-310, 2011.

Safdar A, Armstrong D. Prospective evaluation of *Candida* species colonization in hospitalized cancer patients: impact on short-term survival in recipients of marrow transplantation and patients with hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 30(12): 931-935, 2002.

Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2(2): 73-85, 2002.

Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* 62(Pt 1): 10-24, 2013.

Seddiki SM, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, Badsì-Amir S, Taleb M, Kunkel D. Assessment of the types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria. *Int J Gen Med* 6: 1-7, 2013.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol* 19(5): 241-247, 2011.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 36(2): 288-305, 2012.

Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12(7): 317-324, 2004.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol* 52(8): 761-767, 2007.

Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell* 10(9): 1173-1182, 2011.

Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21(4): 606-625, 2008.

Trudeau RE, Bowman LJ, Wills AR, Crippin JS, Chapman WC, Anderson C. Once weekly fluconazole for antifungal prophylaxis post-liver transplantation. *HPB (Oxford)* 15(7): 541-547, 2013.

Tsai P-W, Chen Y-T, Hsu P-C, Lan C-Y. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. *BioMedicine* 3: 51-64, 2013.

van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol* 35(4): 283-309, 2009.

van der Velden WJ, Plantinga TS, Donnelly JP, Kullberg BJ, Blijlevens NM, Netea MG. Host-microbe interactions in stem cell transplantation: recognizing *Candida* in infection and inflammation. *Virulence* 1(3): 180-184, 2010.

van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol* 731: 237-245, 2011.

Vandeputte P, Tronchin G, Berges T, Hennequin C, Chabasse D, Bouchara JP. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the *ERG6* gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. *Antimicrob Agents Chemother* 51(3): 982-990, 2007.

Varga A, James D. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of Plum pox virus strains C, EA, and W: effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. *J Virol Methods* 132(1-2): 146-153, 2006.

Wakiec R, Prasad R, Morschhauser J, Barchiesi F, Borowski E, Milewski S. Voriconazole and multidrug resistance in *Candida albicans*. *Mycoses* 50(2): 109-115, 2007.

Walmsley S, King S, McGeer A, Ye Y, Richardson S. Oropharyngeal candidiasis in patients with human immunodeficiency virus: correlation of clinical outcome with in vitro resistance, serum azole levels, and immunosuppression. *Clin Infect Dis* 32(11): 1554-1561, 2001.

Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect* 10 Suppl 1: 48-66, 2004.

Wei T, Lu G, Clover G. Novel approaches to mitigate primer interaction and eliminate inhibitors in multiplex PCR, demonstrated using an assay for detection of three strawberry viruses. *J Virol Methods* 151(1): 132-139, 2008.

Weinberger M, Leibovici L, Perez S, Samra Z, Ostfeld I, Levi I, Bash E, Turner D, Goldschmied-Reouven A, Regev-Yochay G, Pitlik SD, Keller N. Characteristics of candidaemia with *Candida-albicans* compared with non-albicans *Candida* species and predictors of mortality. *J Hosp Infect* 61(2): 146-154, 2005.

Wilke M. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin and its impact on use and costs: review of the literature. *Eur J Med Res* 16(4): 180-186, 2011.

Wisplinghoff H, Seifert H, Tallent SM, Bischoff T, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibilities. *Pediatr Infect Dis J* 22(8): 686-691, 2003.

ANEXOS

Anexo 1: Parecer Comitê de Ética I

PROTOCOLO CEPACCG Nº 055/08

Goiânia, 03/11/2008

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Profª. Drª. Maria do Rosário Rodrigues Silva, Prof. Milton Camplesi Júnior e Bióloga Núbia Pontes Pereira.

TÍTULO: Caracterização e identificação de fungos causadores de infecções nosocomiais em pacientes transplantados de medula óssea.

Área Temática: Grupo III

Área de Conhecimento: Ciências Biológicas/Microbiologia

Local de Realização: Hospital Araújo Jorge/ACCG e Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFMG

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG analisou e aprovou o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Todas as exigências deste CEP/ACCG foram atendidas pelos pesquisadores.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões).


DRA. JULIANA CASTRO DOURADO PINEZI
Coordenadora do CEP/ACCG



ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

(62) 3878-7000 / 3243-7000
Rua 239, nº 206, St. Universitário
Goiânia - Goiás - Brasil - CEP 74.605-070
www.accg.org.br

Anexo 2: Parecer Comitê de Ética II



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 019/ 03

Em, 27/03/2003.

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Prof. Xisto Sena Passos

TÍTULO: "Isolamento, identificação, fatores de virulência e sensibilidade IN VITRO de leveduras envolvidas em infecções nosocomiais".

Área Temática: GRUPO III

Patrocinador:

Número do Estudo do Patrocinador:

Comunicamos- lhe (s) que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal/HC/UFG, **analisou e aprovou o projeto de pesquisa** protocolado neste CEPMHA/HC/UFG sob o nº **019/03**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, e estes foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

- Informamos que **não há** necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa. Área Temática: GRUPO III.
- O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

Prof. Luiz Antonio Zanini
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, na pesquisa intitulada: “CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE MEDULA ÓSSEA”. O documento sobre o trabalho a ser realizado será por mim lido e então você poderá aceitar fazer parte do estudo ou não.

Se você aceitar, ira assinar ao final deste documento, que está em duas cópias, sendo que uma cópia será sua e a outra do pesquisador responsável. Se você recusar, não será prejudicado de forma alguma em seu tratamento. Além disso, se você aceitar participar e, depois se arrepender você poderá retirar seu consentimento sem prejuízo algum em seu tratamento. Caso você tenha alguma dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores, Milton Camplesi Junior nos telefones (62) 3255 96 05 ou 9607 35 72.

Se você tiver alguma dúvida sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG, no telefone: (62) 3243 70 50.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ DEVE SABER SOBRE A PESQUISA Título: “CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE MEDULA ÓSSEA”. **INFORMAÇÃO SOBRE QUEM ESTA APLICANDO O TERMO DE CONSENTIMENTO:**

PESQUISADORES PARTICIPANTES: Prof^a Dr^a Maria do Rosário Rodrigues Silva - Investigadora responsável - Fone: 62 3209 61 27. Milton Camplesi Junior – Biomédico / Pesquisador. Fones - (62) 32559605 ou 96073572.

OBJETIVO DA PESQUISA A pesquisa terá como objetivo avaliar grupos de pacientes expostos ao transplante de medula óssea atendidos no Hospital Araújo Jorge para: a. Verificar quais são as principais micoses que ocorrem nos pacientes transplantados de medula óssea. b. Determinar os possíveis riscos envolvidos nestas micoses. c. Determinar qual o melhor medicamento a ser utilizado para combater esta micose. d. Determinar qual o diagnóstico é mais rápido para essas micoses.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO

O material coletado de você irá ser encaminhado ao Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), onde será analisado para pesquisa de fungos. Os resultados serão fornecidos para seu médico para ajudar no seu tratamento.

ESPECIFICAÇÕES DOS RISCOS, PREJUÍZOS, DESCONFORTO, LESÕES QUE PODEM SER PROVOCADAS PELA PESQUISA.

O material que será colhido em você, se for sangue, poderá ficar com uma pequena picadinha em seu braço ou um pequeno hematoma. Se o material for colhido em sua pele ou em outra superfície do seu corpo poderá ficar com uma

mancha avermelhada, mas isto desaparecerá entre dois a três dias. Qualquer tratamento, o qual você estiver sendo submetido não será prejudicado com a coleta do material para exame da micose.

BENEFÍCIOS

Você participando da nossa pesquisa poderá auxiliar nas descobertas sobre métodos de diagnóstico para micoses e assim o tratamento poderá ser melhorado.

CONFIDENCIALIDADE

Se você concordar em participar, as informações clínicas e laboratoriais sobre o material fornecido, por você, serão guardadas e mantidas sem que ninguém tome conhecimento do seu nome ou das iniciais do seu nome.

PARTICIPAÇÃO AUTORIZADA

A participação deste estudo será uma decisão sua onde, você poderá aceitar ou recusar. A sua participação será somente o fornecimento do material e não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira para isso.

PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO

Neste estudo serão incluídos todos os pacientes (autorizados) que foram expostos ao transplante de medula óssea atendidos no Hospital Araújo Jorge.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, com voluntário, em uma pesquisa intitulada “**Caracterização de fungos envolvidos em infecções nosocomiais**”. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. Se aceitar participar e decidir retirar seu consentimento, não será prejudicado em seu tratamento. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Ms. Xisto Sena Passos nos telefones: 3255-9858 / 9972-4158.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA “Caracterização de fungos envolvidos em infecções nosocomiais”.

PESQUISADORES PARTICIPANTES

Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva – Investigadora responsável

Fone: (0XX62) 3209-6127

Ms. Xisto Sena Passos – Biólogo / Pesquisador

Fones: (0XX62) 3209-6127 / 3255-9858 / 9972-4158

OBJETIVO DO ESTUDO

Será avaliado um grande grupo de pacientes, os quais se encontram internados na UTI do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, durante o período de fevereiro de 2003 a dezembro de 2004. Provavelmente você já deve ter ouvido falar em micose. Esta doença é causada por fungos que produzem lesões na pele ou em qualquer parte do organismo humano, através deste estudo o responsável pelo paciente terá acesso aos exames laboratoriais que ajudará o médico a tratá-la.

Neste trabalho, após a devida identificação e caracterização do fungo, será realizado um teste, chamado suscetibilidade, no qual será verificado a sensibilidade do fungo isolado frente a três medicamentos, anfotericina B, itraconazol e fluconazol. Através das informações obtidas no laboratório e com ajuda do médico, nós tentaremos controlar melhor a doença e possivelmente evitar que outros indivíduos a adquiram.

CONDUÇÃO DO ESTUDO

O paciente será submetido inicialmente à colheita de sangue e urina, pelo profissional responsável pela UTI, assim que for internado. Durante a permanência do paciente na UTI serão realizadas colheitas de sangue e urina a cada sete dias. O material coletado será levado para o laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFGO, onde será submetido a exame micológico. Estes exames não serão pagos pelo paciente.

PARTICIPAÇÃO AUTORIZADA

Participar deste estudo será uma decisão autorizada pela responsável e este poderá se recusar a participar ou desistir deste estudo a qualquer momento, sem explicar o porquê.

PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO

Neste estudo serão incluídos todos os pacientes (autorizados), que apresentarem características ou não de fungemia internados na UTI do Hospital das Clínicas da UFG.

RISCOS

Não há riscos para o paciente. Nenhum tipo de medicamento será utilizado por nós. Para colheita do material, o paciente não será maltratado. A colheita do sangue e da urina, não implicará em mal estar para o paciente.

BENEFÍCIOS

O estudo realizado por nós possivelmente contribuirá enormemente para a redução de infecções nos hospitais por fungos.

CONFIDENCIALIDADE

Se o responsável concordar com a participação do paciente, as informações clínicas e laboratoriais relacionadas ao paciente serão confidencialmente mantidas em sigilo o tempo todo, nem o nome ou mesmo iniciais irão constar em qualquer registro nesta pesquisa. O Comitê de Ética poderá necessitar ter acesso aos seus registros médicos para verificação dos formulários de estudo, no entanto, sua identidade será mantida em sigilo absoluto.

RESPONSÁVEL

Este estudo será conduzido por:

Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva pelo fone (0XX62) 3209-6127 (Investigadora responsável).

Ms. Xisto Sena Passos pelo fone (0XX62) 209-6127 (Biólogo / Pesquisador).

Anexo 5. Artigo: Identification of *Candida* species, evaluation of ultrastructure and susceptibility profile of biofilms to antifungals

Candida species and biofilms

Identification of *Candida* species, evaluation of ultrastructure and susceptibility profile of biofilms to antifungals

Laís Carneiro Naziasene Lima

*Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health,
Federal University of Goiás, Goiás, Brazil*

Fernando Yano Abrão

*Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health,
Federal University of Goiás, Goiás, Brazil*

Tayse Silva dos Santos

*Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health,
Federal University of Goiás, Goiás, Brazil*

Viviane Lopes Rocha

*Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health,
Federal University of Goiás, Goiás, Brazil*

André Kipnis

*Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health,
Federal University of Goiás, Goiás, Brazil*

Maria do Rosário Rodrigues da Silva

*Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health,
Federal University of Goiás, Goiás, Brazil*

Carolina Rodrigues Costa

*Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health,
Federal University of Goiás, Goiás, Brazil*

Abstract: The increase in the number of fungal infections by *Candida* species, as a result of the significant increase of immunocompromised patients emphasizes the importance of studies associated to this genre. The resistance of these strains to antifungal drugs is observe in specific isolates, as well as infections associated with biofilm formation (BF). The aim of this study was to compare the susceptibility profile of sessile and planktonic cells of different *Candida* isolates, differentiating species by multiplex qPCR and scanning electron microscopy. The sample consisted of 10 *C. albicans*, 10 *C. parapsilosis* and 1 *C. tropicalis*. The genetic material was extracted by phenol-chloroform extraction of the sample *C. tropicalis* and ATCC 28367 (*C. albicans*) and 22019 (*C. parapsilosis*) for use in a species-specific multiplex qPCR assay with analysis of differences in the curve fusion.

Microdilution plate test and reduction of the tetrazolium salt for 21 isolates were performed for the susceptibility of sessile and free cells, respectively. The evaluation of the ultrastructure of the biofilm was performed on strips of polyurethane with visualization by scanning electron microscopy. The amplified products from *C. albicans* obtained three melting peaks with values of 75,2 °C, 76,8 °C and 79,8 °C, while *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* showed one peak with values 73,5 °C and 78,5 °C, respectively. The identification test showed to be reliable for the identification of the most common species in the study. All of *Candida* yeasts were able to form biofilm with own organization of each specie. The *in vitro* susceptibility test of planktonic cells demonstrated that amphotericin B and caspofungin showed better activity compared to fluconazole and voriconazole who obtained 19% of resistant strains, all *C. albicans*. In assessing of the CIMs50% and CIMs80% of sessile cells, we observed an increase of at least 60 times the values of planktonic cells. It was observed a high percentage of BF that demonstrates the need for diagnosis and combat against this biomass formed by *Candida* species. The BF is a virulence factor determinant for decrease of susceptibility to antifungal agents thus compromising antifungal therapy.

Key words: Biofilm, *Candida* spp., *in vitro* susceptibility test, multiplex qPCR species identification, scanning electron microscopy,

INTRODUCTION

Nosocomial fungal infections are an important cause of mortality (Danziger-Isakov et al. 2008, Xie et al. 2008, Brizendine et al. 2013) and have as major etiologic agent the *Candida* species, with a prevalence of around 90% (Marra et al. 2011).

The ability of biofilm formation (BF) by *Candida* species in invasive devices such as catheters is an important virulence factor, because these structures exhibit cells with increased resistance to antifungal drugs (Ramage et al. 2006). The complexity of the biofilm structure is relate to the ability of filamentation of fungal species and has a direct influence on virulence of isolate (Hasan et al. 2009).

BF stands out in various studies by be able to form in the host tissue and in invasive devices of patients hospitalized (Kojic & Darouiche 2004). This biomass becomes a source of systemic infection to the patient if not removed and the characteristic resistance of these cells will bring therapeutic failure and fatal consequences to the patient (Ramage et al. 2006).

In Brazil, the epidemiological evidence of infection by *Candida* spp. (candidiasis) is similar to those reported in several countries like Spain (Peman et al. 2011), Turkey (Ece et al. 2012), Colombia (Cortes et al. 2011) and Argentina (Cordoba et al. 2011). The yeast *Candida albicans* is the main agent and *Candida parapsilosis* and *C. tropicalis* are the non-*albicans* *Candida* species more relevant (Quindos 2014). The identification of *Candida* species is important not only from an epidemiological perspective (Diekema et al. 2012), but especially for optimization of therapy, since some species possess characteristics on the sensitivity profile to antifungal (Sanglard & Odds 2002, Grim et al. 2012).

Despite the existence of numerous tests for identification of *Candida* species, prolonged time to sample processing and frequency of false negative, may results to compromise accurate identification of isolates (Ellepola & Morrison

2005, Ammann et al. 2007). Thus, should be considerate the use of molecular identification methods, which are extremely sensitive/specific and are performed in a short period of time (Avni et al. 2011).

The melting curve analysis at the end of the molecular technique of polymerase chain reaction in real time (qPCR) with SYBR® Green is widely used in the identification of species of various pathogens (Alfaresi & Elkosh 2006, Varga & James 2006, Hays et al. 2011, Khademvatan et al. 2011, Decat et al. 2013). The change in melting temperature (T_m) of the amplicon allows the identification and differentiation of the species according to the percentage of the content of guanine/cytosine, length and amount of amplicons (Espy et al. 2006).

The purpose of this study was to identify the species *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* by use the multiplex qPCR method with specific primers, making association with the ultrastructure of the biofilm formed by these species and to compare the *in vitro* susceptibility profile of sessile and planktonic cells of these different *Candida* species.

MATERIALS AND METHODS

Sample.—The sample was consisted of 21 *Candida* spp. isolates originated of mycology collection from the *Laboratório de Micologia* of the *Universidade Federal de Goiás* (UFG). Ten were *C. albicans*, 10 *C. parapsilosis* and 1 *C. tropicalis*. The isolates were obtained from the blood of 21 patients of the intensive care unit of *Hospital Araújo Jorge* and *Hospital das Clínicas* of UFG. All the isolates were identified using conventional methods. In addition, the isolates were cultured on Sabouraud's Dextrose Agar and used for further testing. This study was approved by the Ethics Committee (CEPMHA/HC/UFG N° 019/03 and CEPACCG/HA N° 55/08).

DNA extraction.—Genomic DNA was extracted of the sample *C. tropicalis*, ATCC 28367 (*C. albicans*) and ATCC 22019 (*C. parapsilosis*) by a slight modification of the method described by Casali et al. (2003). Two loopsfull of the strains grown on YEPD agar (yeast extract peptone dextrose) were suspended in 0,5 mL TENTS (10 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 8,0, 200 mM NaCl, 2% Triton®, 1% SDS). Then, 0,2 mL of 0,45 mm glass beads and 0,5 mL phenol:chloroform (1:1, v/v) were added, and samples were vortexed for 2 min. The samples were then centrifuged for 10 min at 13 000 rpm, the aqueous phase was transferred to a eppendorf tube, and an equal volume of absolute ethanol was added. Next, the samples were placed at freezer for 1 h. Precipitated DNA was collected, resuspended in 0,5 mL TE (10 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 8,0), containing 50 µg/mL of RNase, and incubated at 37 °C for 30 min. The DNA was then extracted once with phenol:chloroform (1:1, v/v), reprecipitated with 20 µL NaCl 5 M and equal volume of 100% ethanol, washed with 70% ethanol, resuspended in 100 µL of TE, and stored at -20 °C.

Primers, multiplex qPCR assay and melting curve analysis.—The ITS3-R universal primer and specific CA-F (*C. albicans*), CP-F (*C. parapsilosis*), CT-F (*C. tropicalis*), ITS2-CAI-F (*C. albicans*) and ITS2-CAII-R (*C. albicans*) primers were used to amplify the internal transcribed spaces I and II, including part of the 5.8S rDNA (Table 1). The 25 µL of reaction mixture consisted by 12,5 µL RT² SYBR® Green Fluor qPCR Mastermix 2 × (SABiosciences/Qiagen, Hilden, Germany), 1 µL DNA sample (aprox. 50 ng), 0,5 µL of CP-F primer (0,2 µM), 0,5 µL of CT-F primer (0,2 µM), 1,25 µL of CA-F primer (0,5 µM), 1,25 µL of ITS2-CAI-F primer (0,5 µM), 1,25 µL of ITS2-CAII-R primer (0,5 µM), 2,5 µL of ITS3-R primer (1,0 µM) and 4,5 µL distilled water. Multiplex real-time PCR and melting curve analysis were carried out using iQ5® Optical System Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). The experimental conditions used were as follows: 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 55 °C. Melting curves were generated after the last extension step. The temperature was ramped from 55 °C to 95 °C, 0.5 °C every 5 s. After determining the T_m of each specie, a comparison was performed according to the temperature value and the number of melting peaks.

Table 1. Sequences of primers used in multiplex real-time PCR assay.

Primer	Sequence (5' – 3')	Reference
ITS3-R	AGCTGCCGCCAGAGGTCTAA	Chen et al. (2000)
CA-F	AGCTGCCGCCAGAGGTCTAA	Carvalho et al. (2007)
CP-F	GTCAACCGATTATTTAATAG	Carvalho et al. (2007)
CT-F	GATTTGCTTAATTGCCCCAC	Carvalho et al. (2007)
ITS2-CAI-F	GGTTTGCTTGAAAGACGGTAG	Liguori et al. (2010)
ITS2-CAII-R	AGTTTGAAGATATACGTGGTAG	Liguori et al. (2010)

Biofilm formation and scanning electron microscopy (SEM).—These experiments were done using peripheral venous catheter. For this purpose, polyurethane (PU) strips were aseptically cut and placed in 24 wells cell culture plates. A standard inoculum of 10⁶ cells/mL of *Candida* isolates, were prepared in 2,0 mL of RPMI 1640 medium to form a biofilm on the PU strips. The standard inoculum was added to the wells of plates containing the PU strips and the plate was incubated at 35°C for 48 hours. After the incubation period, non-adherent cells were gently washed twice with phosphate sodium-potassium buffer (0.15M, pH 7.0). The biofilm formed on the PU strips was fixed with 1,25% glutaraldehyde in phosphate sodium-potassium buffer (0.15M, pH 7.0) for 24 hours at 4°C. After fixation, the cells were dehydrated with a series of dilutions of ethanol (30%, 50%, 70%, 90%, 95% and 100%) at room temperature, subjected to the critical point of CO₂ chamber (Autosamdri®, 815, Series A), coated with gold (Denton Vacuum Desk V.) and examined in a scanning electron microscope (JEOL , JSM - 6610 , equipped with EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging) .

Antifungal. — Amphotericin B (Pfizer Central Research), caspofungin (Merck & Co), and voriconazole (Bristol-Myers Squibb) were dissolved in DMSO while fluconazole (Pfizer) was dissolved in water. These antifungal agents were

subsequently diluted in RPMI 1640 medium to the required concentrations. For the *in vitro* susceptibility testing of planktonic cells, the fluconazole was evaluated in an initial concentration of 64 µg/mL, voriconazole and amphotericin B of 16 µg/mL while caspofungin initial concentration of 8 µg/mL. For cells of the biofilm were evaluated concentrations 16 times higher for the antifungal fluconazole with initial concentration of 1024 µg/mL, voriconazole and amphotericin B of 256 µg/mL, and caspofungin of 128 µg/mL.

In vitro susceptibility of planktonic cells. — Testing *in vitro* susceptibility of the cells in its free form was performed by broth microdilution according to the CLSI document M27-A3 and M27-S4 (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008, 2012). Were placed 200 µL of antifungal in concentration twice on the first column of a 96-well microtiter plate, the other wells were added 100 µL of RPMI 1640 and then performed twice serial dilution. Upon completion of the dilution were added 100 µL of inoculum (1×10^6 cells/mL). For the fluconazole the concentration was 0,125 – 64 µg/mL, for amphotericin B and voriconazole of 0,03 – 16 µg/mL and caspofungin of 0,015 – 8 µg/mL. The plates were incubated at 35 °C for 48 hours to later read visually. The minimum inhibitory concentration (pMIC) of planktonic cells was determined for 50% inhibition of growth compared to the control for caspofungin and azoles (fluconazole, voriconazole) and complete inhibition of growth for amphotericin B. *C. parapsilosis* (ATCC 22019) was used as quality control. There are no breakpoint values in the CLSI established for amphotericin B, however, as *Candida* species are sensitive in values between 0,25 – 1 mg/mL, resistance values above 1 µg/mL were established (Rex et al. 2001, Pappas et al. 2004, Park et al. 2006). The results of *in vitro* susceptibility test was defined as sensitive, sensitive dose-dependent and resistant to other antifungals according with picture 1.

Picture 2. Values defined for the susceptibility testing of *Candida* species.

Antifungal	Species	Interpretation (µg/mL)		
		Sensitive	Sensitive dose-dependent	Resistant
Caspofungin	<i>C. albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1,0
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1,0
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2,0	4,0	≥8,0
Fluconazole	<i>C. albicans</i>	≤2,0	4,0	≥8,0
	<i>C. tropicalis</i>	≤2,0	4,0	≥8,0
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2,0	4,0	≥8,0
Voriconazole	<i>C. albicans</i>	≤0,12	0,25 - 0,5	≥1,0
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,12	0,25 - 0,5	≥1,0
	<i>C. parapsilosis</i>	≤0,12	0,25 - 0,5	≥1,0

Biofilm formation and in vitro susceptibility of sessile cells. — The procedure for BF and determination of minimum inhibitory concentration of sessile cells (sMIC) followed the methodology of Pierce et al. (2008) modified. In an erlenmeyer of 200 mL were added 20 mL of sterile liquid YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% dextrose) and a sample of *Candida* sp. (24 - 48 hours of growth). This erlenmeyer was incubated on an orbital shaker (150 - 180 rpm; 12 - 16 h, 30 °C). The supernatant resulting from the growth of cells in liquid culture was removed by centrifugation (5000 rpm, 10 min, room temperature) and the cells were washed twice with PBS (phosphate buffered saline, 0,099% Na₂HPO₄ 0.027% KH₂PO₄, 0,88% NaCl) cold sterile. The pellet was used for preparation of inoculum at a concentration of 1 x 10⁶ cells/mL. Were added in duplicate 100 µL of inoculum in 96-well microtiter plate and incubated for 48 hours at 35°C. The RPMI 1640 medium was gently removed and washed twice with 200 µL of PBS to remove non-adherent cells. Then, 200 µL of the antifungal agent were added in the first column of the plate, 100 µL of RPMI 1640 medium in the remaining wells and then a serial dilution performed twice. Fluconazole concentration ranged from 2,0 - 1024 µg/mL, amphotericin B and voriconazole of 0,5 - 256 µg/mL and caspofungin of 0,25 – 128 µg/mL. The plate was sealed with film paper and incubated for 24 hours at 37 °C. After this period the action of antifungals were quantified using the MTT reduction assay. Was defined as the formation of biofilms, isolates that showed the positive control well (drug-free), optical density equal to or greater than 0,2 (550 nm). The sMIC was defined as the lowest concentration capable of reducing by 50% the absorbance (sMIC50%) and 80% (sMIC80%) compared to control.

Statistics. — Descriptive statistics were presented with mean, standard deviation and percentage. GraphPad Prism 5.0 software was used for statistical inference, with a confidence level of 95% (p <0.05) in Fisher's exact test used to assess the qualitative results of *in vitro* susceptibility testing.

RESULTS

The use of multiplex qPCR with specific primers for *Candida* species, resulted in melting curves with different values of T_m and number of melting peaks distincts for the samples. The melting curve of amplification products from *C. albicans* (Figure 1A) showed three melting peaks, with values of 75,2°C, 76,8°C and 79,8°C, while *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* showed only one melting peak with values of 73,5°C and 78,5°C, respectively (Figure 1B and 1C).

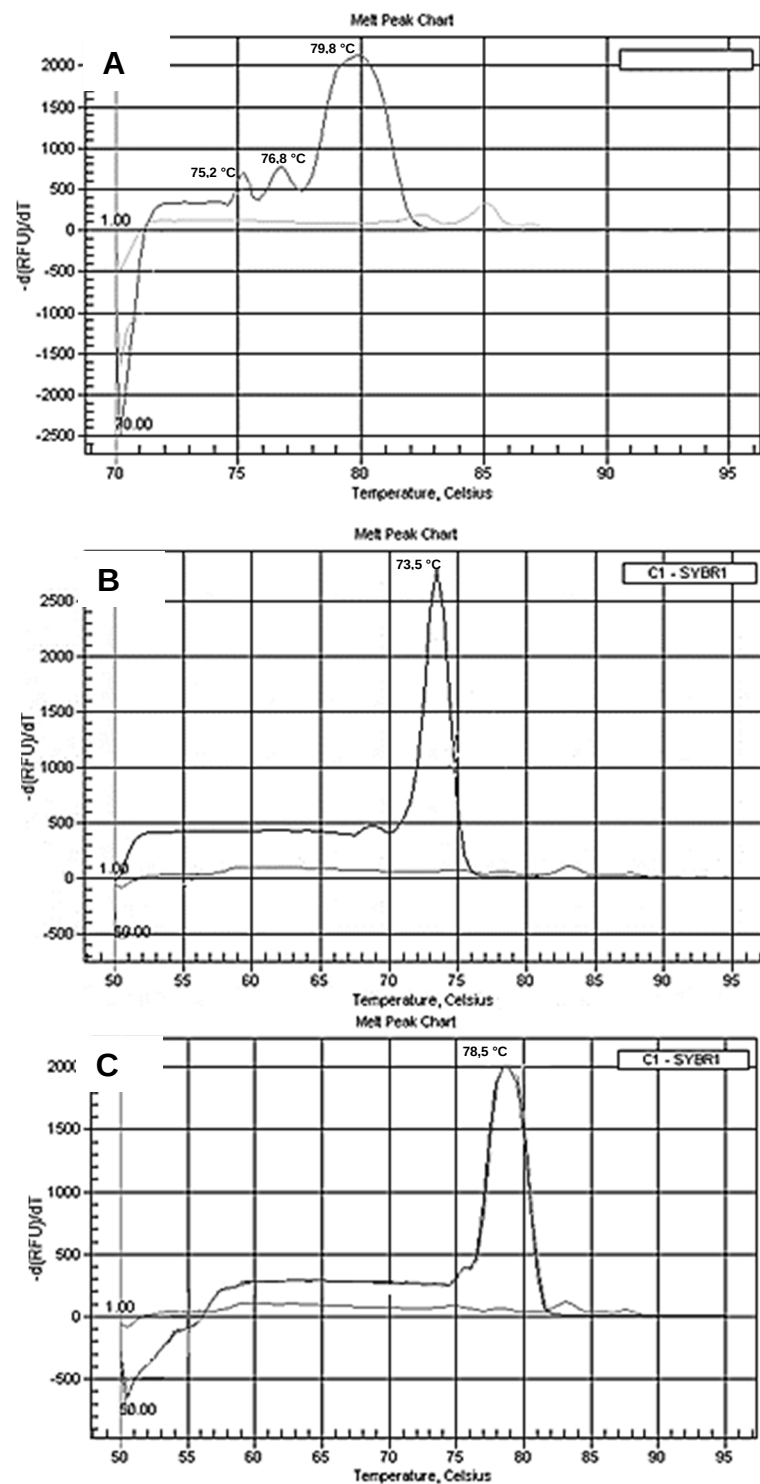


Figure 1. Characteristic melting peaks with genus-specific primers for identification of *C. albicans* (A), *C. parapsilosis* (B) and *C. tropicalis* (C).

In assessing the ability of BF, all samples in this study had the ability to form sessile cells (Figure 2).

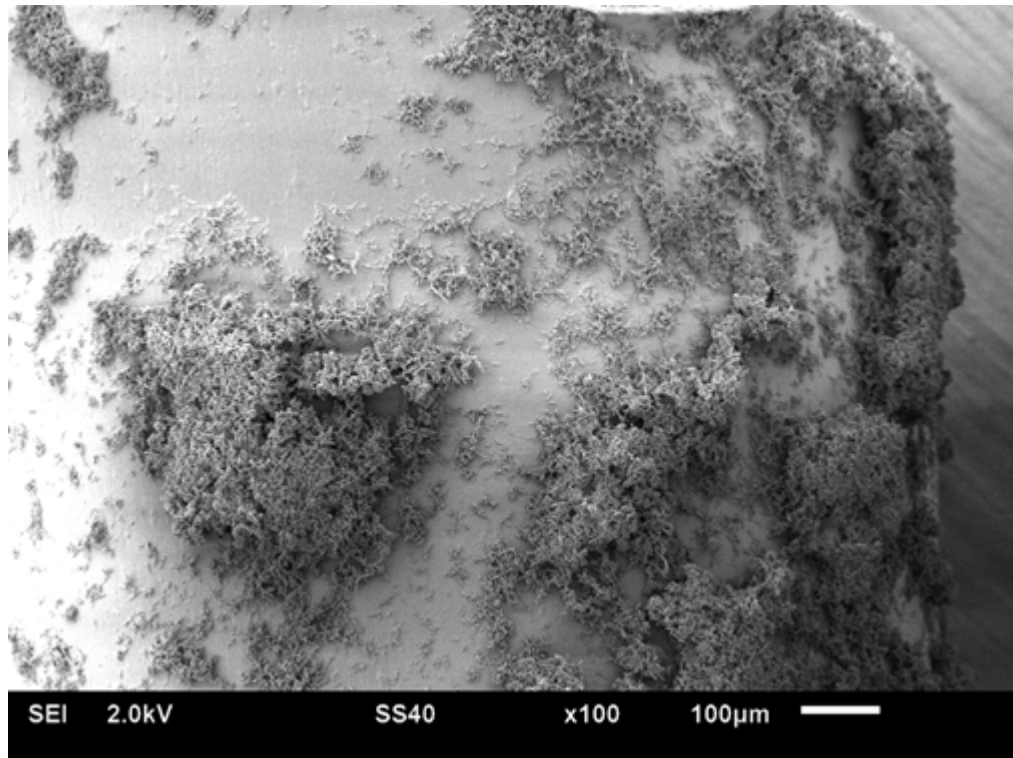


Figure 2. Ultrastructure of *Candida* species biofilms formed in strips of peripheral venous polyurethane catheter. Scanning electron microscopy (SEM), 100 X, bar represents 100 μm.

The ultrastructure of *Candida* species biofilms presented characteristic of each species. The organization of the species *C. albicans* biofilm (Figure 3 A) showed a large number of hyphae and blastoconidia, morphology resembling that of *C. tropicalis* (Fig. 3 C). However, this latter specie showed a lower amount of hyphae. The yeast *C. parapsilosis* (Figure 3 B) showed the presence of blastoconidia and pseudohyphae.

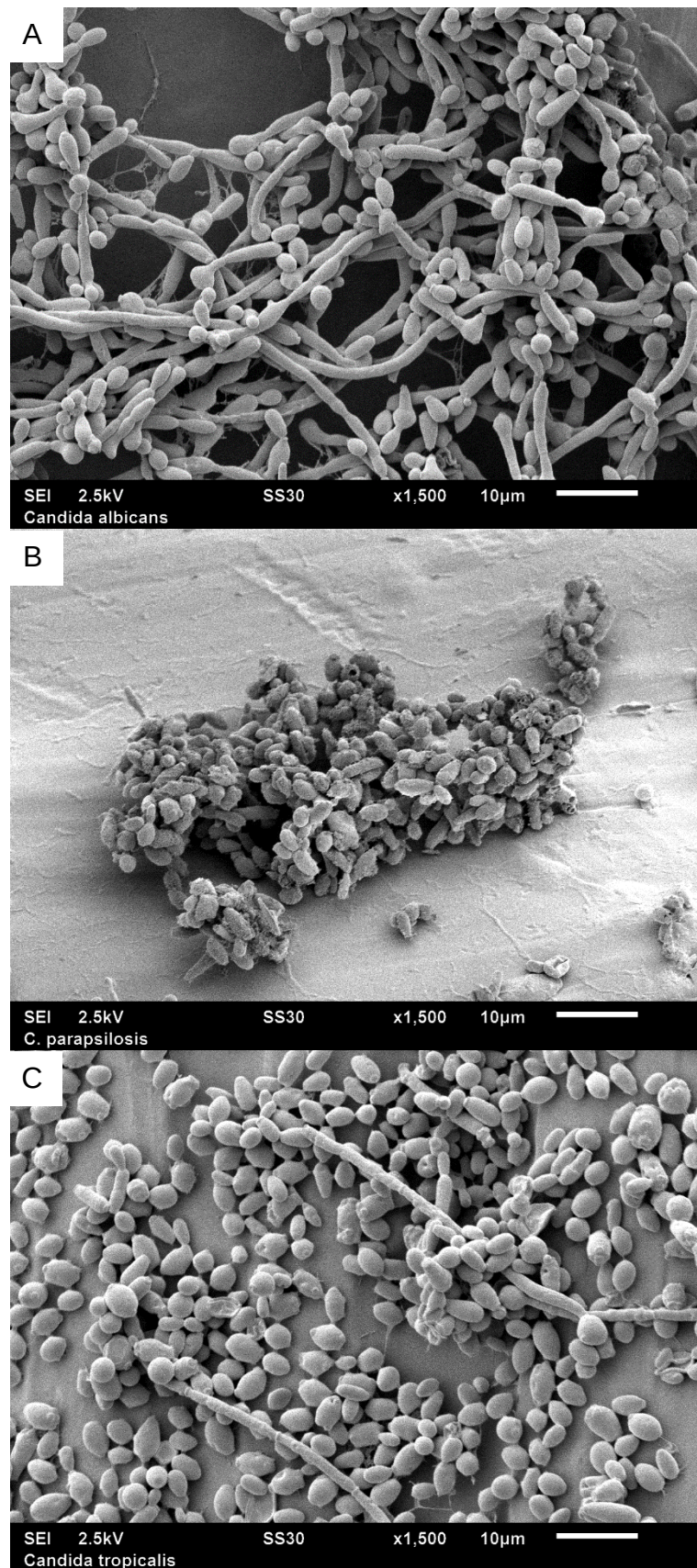


Figure 3. Ultrastructure of *Candida* species biofilms. A) *C. albicans* B) *C. parapsilosis* C) *C. tropicalis*. Scanning electron microscopy (SEM), 1500 X, the bar represents 10 µm.

The *in vitro* susceptibility testing of planktonic cells of all species demonstrated that amphotericin B and caspofungin showed better activity compared to fluconazole and voriconazole who obtained 19% of resistant strains. Among the isolates that were resistant to fluconazole and voriconazole, the specie *C. albicans* was shown lower susceptibility to azole drugs (Table 1).

Table 1. Results of *in vitro* susceptibility testing of planktonic cells of *Candida* species against antifungal amphotericin B, caspofungin, fluconazole and voriconazole.

	ANTIFUNGAL			
	Amphotericin B	Caspofungin	Fluconazole	Voriconazole
<i>Candida albicans</i>				
Sensitive [n (%)]	10 (100)	10 (100)	6 (60)	6 (60)
Resistant [n (%)]	-	-	4 (40)*	4 (40)*
MICp variation (µg/mL)	0,125 - >64	<0,03 - 0,25	0,125 - >64	<0,03 - >16
<i>Candida parapsilosis</i>				
Sensitive [n (%)]	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)
Resistant [n (%)]	-	-	-	-
MICp variation (µg/mL)	0,125 – 0,5	0,125 - 1	0,125 - 2	<0,03 – 0,25
<i>Candida tropicalis</i>				
Sensitive [n (%)]	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Resistant [n (%)]	-	-	-	-
MICp variation (µg/mL)	0,5	0,25	0,5	<0,03
Total				
Sensitive [n (%)]	21 (100)	21 (100)	17 (81)**	17 (81)**
Resistant [n (%)]	-	-	4 (19)	4 (19)
MICp variation (µg/mL)	0,125 - >64	<0,03 - 1	0,125 - >64	<0.03 - >16

* $p = 0,0351$ (Fisher's exact test; comparison between the sensitive and resistant samples of *C. albicans* and CNA species); ** $p = 0,0017$ (Fisher's exact test; comparison between the amphotericin B/caspofungin and fluconazole/voriconazole).

In the evaluation of antifungal activity exerted in the biofilm (Table 2), the azoles (fluconazole and voriconazole) had low influence on sessile cells while amphotericin B and caspofungin showed better activity against the isolates (Table 2).

Table 2. Variation of the minimum inhibitory concentration of *Candida* species sessile cells tested against antifungal amphotericin B, caspofungin, fluconazole and voriconazole.

	ANTIFUNGAL			
	Amphotericin B	Caspofungin	Fluconazole	Voriconazole
<i>Candida albicans</i>				
CIMs50% (µg/mL)	<0,5 - 4	16 - >128	512 - >1024	128 - 256
CIMs80% (µg/mL)	0,5 - 32	64 - >128	1024 - >1024	256 - > 256
<i>Candida parapsilosis</i>				
CIMs50% (µg/mL)	1 - 128	16 - >128	>1024	32 - >256
CIMs80% (µg/mL)	16 - 256	32 - > 128	>1024	128 - >256
<i>Candida tropicalis</i>				
CIMs50% (µg/mL)	1	64	>1024	64
CIMs80% (µg/mL)	64	>128	>1024	128
Total				
CIMs50% (µg/mL)	<0,5 - 128	16 - >128	512 - >1024	32 - >256
CIMs80% (µg/mL)	0,5 - 256	32 - >128	1024 - >1024	128 - >256

The data obtained in the *in vitro* susceptibility tests demonstrate increase in the CIMs50% and CIMs80% of all drugs evaluated in comparison to the values observed for planktonic cells. The approximate average of the sessile cells results showed an increase of at least 70, 203, 77 and 63 times the value obtained from the planktonic cells for drug amphotericin B, caspofungin, voriconazole and fluconazole, respectively (Figure 4).

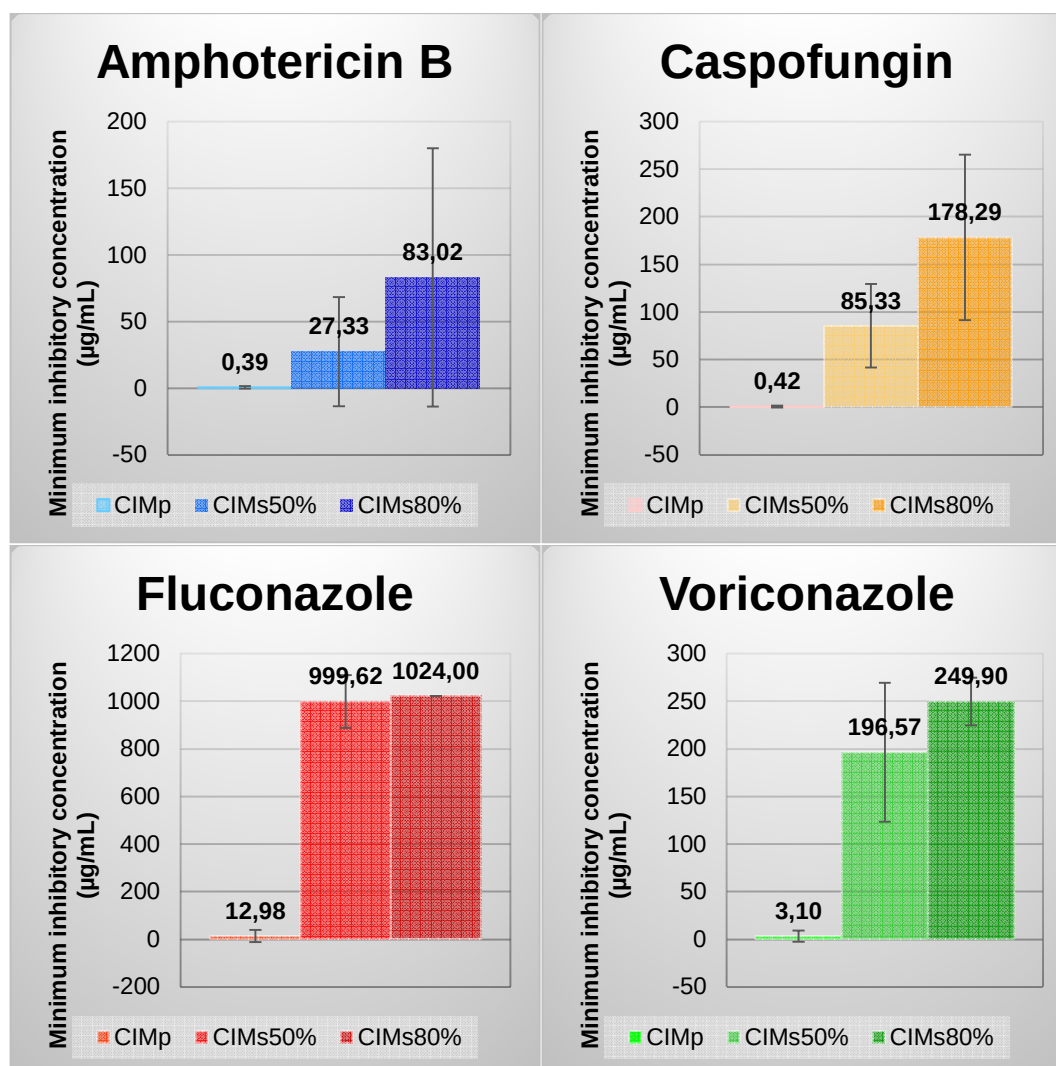


Figure 4. Results of *in vitro* susceptibility testing of planktonic and sessile cells against antifungal amphotericin B, caspofungin, fluconazole and voriconazole. The values expressed in the columns are averages and bars represent the standard deviation.

DISCUSSION

It is evident the importance of species identification of fungal pathogens that are responsible for nosocomial infections, since depending of the pathogen involved, there is a predisposition to the existence of resistance to antifungal drugs (Sanglard & Odds 2002).

Several studies use the technique multiplex qPCR for identification of *Candida* species (Carvalho et al. 2007, Romeo et al. 2009, Liguori et al. 2010, Mallus et al. 2013), however in many cases, the reaction medium contains large amounts of species-specific primers for identification of many species that most likely involves interaction between the primers and thus decrease the sensitivity of the test (Wei et al. 2008). Despite the various possibilities to prevent the interaction of oligonucleotides such as the correct choice of annealing temperature, the possibility of interaction proves to be more of an obstacle in the development of the technique, so the technique should be targeted to the most prevalent species in the affected the study region.

In the present work, the reaction medium was prepared to allow the identification of the species most prevalent in the study area (*C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis*), thus developing an assay with high sensitivity.

In the analytical conditions employed in this study, there was considerable variation of the 5 °C between the species *C. parapsilosis* (73,5 °C) and *C. tropicalis* (78,5 °C) in the amplification of the ITS1 rDNA. This difference allows the safe application of the proposed test in the differential clinical diagnosis of infections caused by these species. On the other hand, the amplification of this region in *C. albicans* showed a melting peak (79,8 °C) at a temperature close to that observed for the specie *C. tropicalis*, however, it is important that they are not overlapping. Using another pair of primers for the ITS2 rDNA specific for *C. albicans* was proposed here to increase reliability in the identification of *C. albicans*, because their inclusion in rational median enabled the accurate differentiation of species by presenting more two melting peaks (75,2 °C and 76,8 °C).

One way to improve diagnosis is the analysis of catheters suspected of involvement in biofilm by scanning electron microscopy in order to detect the presence of sessile cells, and perform preliminary identification of the species, since the organization of the fungal biofilm cells of *Candida* spp. often presents different between species *C. albicans* (Thein et al. 2007), *C. parapsilosis* (Lattif et al. 2010) and *C. tropicalis* (Bizerra et al. 2008) that are dominant genus in nosocomial isolation of hematological candidiasis in many countries (Quindos 2014). In the present study, the ultrastructural characteristics of biofilms formed by *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* are in agreement with the previously reported in the literature. *C. albicans* and *C. tropicalis* have blastospores with hyphae, but the *C. albicans* species presents filaments form in greater numbers (Thein et al. 2007, Bizerra et al. 2008) since *C. parapsilosis* basically shows the formation of pseudohyphae with blastospores (Lattif et al. 2010).

Despite the current high cost and difficulty of access to equipment for development of SEM, it is extremely important to the differentiation of an antifungal resistance of intrinsic origin or a result of biofilm formation which causes difficulties in patient care. This analysis for the presence of biomass can be performed directly from the tip of the catheter withdrawn from the patient by means of SEM analysis as performed in this study.

The *Candida* yeasts present as an important virulence factor, the ability to BF (Lim et al. 2012) and all of the samples in this study showed the ability to form sessile cells. The presence of biomass in the host or invasive devices becomes a source of reinfection with subsequent recurrent episodes and increased mortality of patients (Lim et al. 2012).

Amphotericin B and caspofungin are widely used in the antifungal treatment of candidiasis (Rautemaa et al. 2008), well as voriconazole and fluconazole (Diekema et al. 2009, Pappas et al. 2009). Among these drugs, there are reports of the species *C. albicans* with reduced susceptibility to fluconazole (Prasad & Kapoor 2005, Coste et al. 2007, Mishra et al. 2007) as observed in this study.

Despite the observation of antifungal activity against biofilm cells, the vast majority of defined concentrations is considered high and therapy with high concentrations of these drugs presents a risk to the patient due to potential toxicity (Fanos & Cataldi 2000, Wilke 2011, Egunsola et al. 2013, Hamada et al. 2013).

The data obtained in this study show a high frequency of biofilm formation, emphasizing the importance of diagnosis and combat this biomass formed by *Candida* species, since was shown a considerable increase in the minimum inhibitory concentration of antifungal drugs to combat the sessile cells.

LITERATURE CITED

Alfaresi M, Elkosh A. 2006. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species using real-time PCR with SYBR Green and melting-curve analysis. J Med Microbiol 55(Pt 12): 1711-5.

Avni T, Leibovici L, Paul M. 2011. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol 49(2): 665-70.

Ammann RA, Zucol F, Aebi C, Niggli FK, Kuhne T, Nadal D. 2007. Real-time broad-range PCR versus blood culture. A prospective pilot study in pediatric cancer patients with fever and neutropenia. Support Care Cancer 15(6): 637-41.

Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. 2008. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. FEMS Yeast Res 8(3): 442-50.

Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG. 2013. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with *Cryptococcosis* according to immune status. PLoS One 8(3): e60431.

Carvalho A, Costa-De-Oliveira S, Martins ML, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Ludovico P, Rodrigues F. 2007. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. Med Mycol 45(7): 619-27.

Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK, Ribeiro AM, Amaral AA, Alves SH, Schrank A, Meyer W, Vainstein MH. 2003. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. FEMS Yeast Res 3(4): 405-15.

Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT. 2000. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. J Clin Microbiol 38(6): 2302-10.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 3rd ed. Document M27-A3.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, Fourth Informational Supplement. Document M27-S4.

Cordoba S, Vivot W, Bosco-Borgeat ME, Taverna C, Szusz W, Murisengo O, Isla G, Davel G. 2011. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 43(3): 176-85.

Cortes JA, Reyes P, Gomez C, Buitrago G, Leal AL. 2011. Fungal bloodstream infections in tertiary care hospitals in Colombia. *Rev Iberoam Micol* 28(2): 74-8.

Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux ME, d'Enfert C, Berman J, Sanglard D. 2007. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* 6(10): 1889-1904.

Danziger-Isakov LA, Worley S, Arrigain S, Aurora P, Ballmann M, Boyer D, Conrad C, Eichler I, Elidemir O, Goldfarb S, Mallory GB, Jr., Michaels MG, Michelson P, Mogayzel PJ, Jr., Parakininkas D, Solomon M, Visner G, Sweet S, Faro A. 2008. Increased mortality after pulmonary fungal infection within the first year after pediatric lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 27(6): 655-61.

Decat E, Van Mechelen E, Saerens B, Vermeulen SJ, Boekhout T, De Blaiser S, Vaneechoutte M, Deschaght P. 2013. Rapid and accurate identification of isolates of *Candida* species by melting peak and melting curve analysis of the internally transcribed spacer region 2 fragment (ITS2-MCA). *Res Microbiol* 164(2): 110-7.

Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Kroeger J, Jones RN, Pfaller MA. 2009. A global evaluation of voriconazole activity tested against recent clinical isolates of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63(2): 233-236.

Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. 2012. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73(1): 45-8.

Ece G, Samlioglu P, Akkoclu G, Atalay S, Kose S. 2012. The evaluation of the distribution of yeast like fungi *Candida* species at a tertiary care center in western Turkey. *Int J Med Sci* 9(7): 617-20.

Egunsola O, Adefurin A, Fakis A, Jacqz-Aigrain E, Choonara I, Sammons H. 2013. Safety of fluconazole in paediatrics: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol* 69(6): 1211-1221.

Ellepola AN, Morrison CJ. 2005. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* 43 Spec No: 65-84.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, 3rd, Smith TF. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 19(1): 165-256.

Fanos V, Cataldi L. 2000. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. *J Chemother* 12(6): 463-470.

Grim SA, Berger K, Teng C, Gupta S, Layden JE, Janda WM, Clark NM. 2012. Timing of susceptibility-based antifungal drug administration in patients with *Candida* bloodstream infection: correlation with outcomes. *J Antimicrob Chemother* 67(3): 707-14.

Hamada Y, Tokimatsu I, Mikamo H, Kimura M, Seki M, Takakura S, Ohmagari N, Takahashi Y, Kasahara K, Matsumoto K, Okada K, Igarashi M, Kobayashi M, Mochizuki T, Nishi Y, Tanigawara Y, Kimura T, Takesue Y. 2013. Practice guidelines for therapeutic drug monitoring of voriconazole: a consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring. *J Infect Chemother* 19(3): 381-392.

Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. 2009. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect* 11(8-9): 753-61.

Hays C, Duhamel C, Cattoir V, Bonhomme J. 2011. Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis. *J Med Microbiol* 60(Pt 4): 477-80.

Khademvatan S, Neisi N, Maraghi S, Saki J. 2011. Diagnosis and identification of *Leishmania* spp. from Giemsa-stained slides, by real-time PCR and melting curve analysis in south-west of Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 105(8): 559-65.

Kojic EM, Darouiche RO. Candida infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 17(2): 255-267, 2004.

Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart SR, Diekema DJ, Pfaller MA, Ghannoum MA. 2010. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol* 300(4): 265-70.

Liguori G, Galle F, Lucariello A, Di Onofrio V, Albano L, Mazzarella G, D'Amora M, Rossano F. 2010. Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida* spp. identification. *New Microbiol* 33(1): 63-7.

Lim CS, Rosli R, Seow HF, Chong PP. 2012. Candida and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(1): 21-31.

Mallus F, Martis S, Serra C, Loi G, Camboni T, Manzin A. 2013. Usefulness of capillary electrophoresis-based multiplex PCR assay for species-specific identification of *Candida* spp. *J Microbiol Methods* 92(2): 150-2.

Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, Ribeiro J, Girao E, Correa L, Guerra C, Brites C, Pereira CA, Carneiro I, Reis M, de Souza MA, Tranches R, Barata CU, Edmond MB. 2011. Nosocomial

bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol* 49(5): 1866-71.

Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, Singh R. 2007. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 54(3): 201-235.

Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE, Infectious Diseases Society of A. 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 38(2): 161-189.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Jr., Calandra TF, Edwards JE, Jr., Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Infectious Diseases Society of A. 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48(5): 503-535.

Park BJ, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA, Iqbal N, Ciblak MA, Lee-Yang W, Hairston MD, Phelan M, Plikaytis BD, Sofair AN, Harrison LH, Fridkin SK, Warnock DW. 2006. Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 50(4): 1287-1292.

Peman J, Canton E, Minana JJ, Florez JA, Echeverria J, Ortega DN, Alarcon JM, Fontanals D, Sard BG, Moreno BB, Torroba L, Ayats J, Perez MA, Fernandez MA, Reus FS, Natal IF, Garcia GR, Ezpeleta G, Martin-Mazuelos E, Iglesias I, Rezusta A, de Ocariz IR, Nieto AG. 2011. Changes in the epidemiology of fungaemia and fluconazole susceptibility of blood isolates during the last 10 years in Spain: results from the FUNGEMYCA study. *Rev Iberoam Micol* 28(2): 91-9.

Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Jr., Mowat E, Ramage G, Lopez-Ribot JL. 2008. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc* 3(9): 1494-1500.

Prasad R, Kapoor K. 2005. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int Rev Cytol* 242: 215-248.

Quindos G. 2014. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol* 31(1): 42-8.

Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. 2006. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 6(7): 979-86.

Rautemaa R, Richardson M, Pfaller MA, Perheentupa J, Saxen H. 2008. Activity of amphotericin B, anidulafungin, caspofungin, micafungin, posaconazole, and voriconazole against *Candida albicans* with decreased susceptibility to fluconazole from APECED patients on long-term azole treatment of chronic mucocutaneous candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 62(2): 182-185.

Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev 14(4): 643-658.

Romeo O, Scordino F, Pernice I, Lo Passo C, Criseo G. 2009. A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. J Microbiol Methods 79(1): 117-20.

Sanglard D, Odds FC. 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis 2(2): 73-85.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. 2007. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. Arch Oral Biol 52(8): 761-7.

Varga A, James D. 2006. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of Plum pox virus strains C, EA, and W: effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. J Virol Methods 132(1-2): 146-53.

Xie GH, Fang XM, Fang Q, Wu XM, Jin YH, Wang JL, Guo QL, Gu MN, Xu QP, Wang DX, Yao SL, Yuan SY, Du ZH, Sun YB, Wang HH, Wu SJ, Cheng BL. 2008. Impact of invasive fungal infection on outcomes of severe sepsis: a multicenter matched cohort study in critically ill surgical patients. Crit Care 12(1): R5.

Wei T, Lu G, Clover G. 2008. Novel approaches to mitigate primer interaction and eliminate inhibitors in multiplex PCR, demonstrated using an assay for detection of three strawberry viruses. J Virol Methods 151(1): 132-9.

Wilke M. 2011. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin and its impact on use and costs: review of the literature. Eur J Med Res 16(4): 180-186.