

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA**

**Maria da Conceição Alexandre Castro**

**OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES DO COMPLEXO *Candida parapsilosis* EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES E PROFISSIONAIS DE SAÚDE DE HOSPITAIS DO NATAL/RN.**

Natal  
2017

**MARIA DA CONCEIÇÃO ALEXANDRE CASTRO**

**OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES DO COMPLEXO *Candida parapsilosis* EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES E PROFISSIONAIS DE SAÚDE DE HOSPITAIS DO NATAL/RN.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Raquel Cordeiro Theodoro**

**Co-orientador: Dr. Thales Domingos Arantes**

Natal

2017

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro de Biociências - CB

Castro, Maria da Conceição Alexandre.

Ocorrência de espécies do Complexo Candida parapsilosis em amostras biológicas de pacientes e profissionais de hospitais do Natal/RN / Maria da Conceição Alexandre Castro. - Natal, 2017.

77 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Cordeiro Theodoro.

Coorientador: Prof. Dr. Thales Domingos Arantes.

1. Complexo Candida parapsilosis - Dissertação. 2. Amostras clínicas e de profissionais de saúde - Dissertação. 3. Rio Grande do Norte - Dissertação. I. Theodoro, Raquel Cordeiro. II. Arantes, Thales Domingos. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU

MARIA DA CONCEIÇÃO ALEXANDRE CASTRO

OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES DO COMPLEXO *Candida parapsilosis* EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES E PROFISSIONAIS DE HOSPITAIS DO NATAL/RN.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

Área de concentração: Microbiologia

Examinadores:

Prof<sup>a</sup>. Dra. Raquel Cordeiro Theodoro (Presidente) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Eveline Pipolo Milan (Membro interno) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN.

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto (Membro externo) – Universidade Federal do Pernambuco – UFPE.

Dedico este estudio a todos os pacientes!

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Francisco e Graça, pilares e inspiração da minha vida;

A meus irmãos Edsongil, Raimundo e Francinaldo, exemplos de perseverança;

A meus sobrinhos Rayronne, Edsongil Filho, Israely, Maria Eduarda e Raynarla, minhas joias preciosas;

A minha prima/irmã Norma Cristina, que esteve comigo em todas as fases desse processo, nunca me deixando desanimar;

As minhas cunhadas Aline, Mércia e Milanne que sempre me incentivaram;

Ao apoio e orações dos meus amigos, Eriberto, Kelita, Delma, Pastor Sílvio, Rejane e Anadir;

A meus colegas do laboratório Alex, Matheus, Felipe, Kássia, Ingrid e Maria Fernanda, que estiveram comigo nesta jornada me ensinando e incentivando;

A meu co-orientador Thales Arantes, por todos os ensinamentos;

Aos colaboradores Jane, Narriman e Edneuzza do LACEN e Miguel e Maria Helena do Centro de Patologia Clínica que nos forneceram as amostras para este estudo;

Aos Professores Josélio Galvão e Selma Jeronimo por disponibilizarem espaço físico e equipamentos no Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte;

Ao CNPq e CAPES pelo auxílio à pesquisa e bolsa de mestrado;

Aos profissionais de saúde que se disponibilizaram a participar da pesquisa;

E principalmente a minha Orientadora Raquel Theodoro, por aceitar o desafio que foi esse mestrado para ambas e mostrar que sou capaz de ir além do que imagino.

“Tudo posso naquele que me fortalece, pois o senhor é meu pastor e nada me faltará...”

## RESUMO

Dentre as espécies de *Candida* não-*Candida albicans*, o complexo de espécies *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) se destaca por causar infecções sistêmicas frequentes, sendo as principais fontes de infecção as mãos dos profissionais de saúde, infusões e biomateriais. Como estas espécies podem diferir quanto à virulência e sensibilidade antifúngica, o diagnóstico espécie-específico contribui para a escolha terapêutica mais adequada. O objetivo da pesquisa foi comparar a ocorrência de espécies de *Candida parapsilosis* e outras espécies de *Candida* em amostras clínicas e de profissionais da saúde, pela primeira vez no estado do Rio Grande do Norte / RN. Foram avaliadas leveduras isoladas de amostras clínicas pelo LACEN-RN e Centro de Patologia Clínica de Natal / RN, e leveduras de isolados de boca e mãos de profissionais de saúde das UTIs dos hospitais Giselda Trigueiro e Monsenhor Walfredo Gurgel, obtidos entre agosto de 2015 a setembro de 2016. A identificação das espécies foi realizada previamente pelo equipamento Vitek-2 e, alternativamente, pelo Chromagar, sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 ou PCR do *intein* VMA (para diferenciar espécies do complexo *C. parapsilosis*). Dos 163 isolados clínicos obtidos, destacaram-se 88 (54%) *C. albicans*, 28 (17%) *C. tropicalis*, 23 (14%) complexo *C. parapsilosis* e 12 (7%) *C. glabrata* como as mais prevalentes. Quanto a coleta de profissionais, observou-se crescimento do gênero *Candida* em 24 das 196 amostras de mãos e boca semeadas, dessas 10 (5%) eram *C. albicans*, 9 (4%) do complexo *C. parapsilosis*, 3 (2%) *C. tropicalis* e 2 (1%) *C. glabrata*. Dentre as 32 cepas do complexo *C. parapsilosis*, *C. parapsilosis stricto sensu* foi a mais frequente tanto em amostras de profissionais de saúde quanto em amostras clínicas. Nossa pesquisa mostrou que *C. albicans* ainda é a espécie mais prevalente entre as amostras clínicas, mas o aumento de infecções por *C. parapsilosis* é preocupante e pode estar relacionado à sua frequência (quase tão alta como a de *C. albicans*) em profissionais de saúde, como fonte de infecção nosocomial. A avaliação do perfil de susceptibilidade antifúngica para as diferentes espécies do complexo *C. parapsilosis* aqui estudado, não mostrou diferenças significativas para anfotericina B e 5-fluorocitosina, enquanto *C. orthopsilosis* se mostrou mais sensível ao itraconazol que *C. parapsilosis* e *C. metapsilosis*.

**Palavras chaves:** *Candida* spp, complexo *Candida parapsilosis*, Rio Grande do Norte, Brasil, amostras clínicas, amostras de profissionais de UTI.

## ABSTRACT

*Candida non-Candida albicans* species, as *Candida parapsilosis* complex (*C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*) is the most frequent in systemic infections, being found in hands of health professionals, biomaterials and infusions as the main sources of nosocomial infection. These species may present difference in the virulence and antifungal susceptibility profiles, the species-specific diagnosis contribute for the most suitable therapeutic choice. The aim of this research was to compare the occurrence of *Candida parapsilosis* species and other *Candida* species in biological samples, for the first time in the state of Rio Grande do Norte/RN, Brazil. Yeast isolated from clinical samples were provided by LACEN-RN and Centro de Patologia Clínica de Natal/RN, and yeast isolates from health professionals, from the ICU of Giselda Trigueiro and Monsenhor Walfredo Gurgel hospitals, were obtained by cultured samples from hands and buccal mucosa, among august 2015 to september 2015. The species identification was previously performed by Vitek equipment and alternatively by Chromagar, ITS1-5.8S-ITS2 sequencing or PCR of the VMA *intein* (for distinguishing among the species from *C. parapsilosis* complex). Among the 163 clinical isolates, *C. albicans* 88 (54%), *C. tropicalis* 28 (17%), *C. parapsilosis* complex 23 (14%) and *C. glabrata* 12 (7%) were the most prevalent species. Regarding the health professionals, there was growth of *Candida* genus in 24 of the 196 samples of hands and mouth, of which 10 (5%) were *C. albicans*, 9 (4%) *C. parapsilosis*, 3 (2%) *C. tropicalis* and 2 (1%) *C. glabrata*. Among *C. parapsilosis* complex species, *C. parapsilosis stricto sensu* was the most frequent species in samples from health professionals, as well as in clinical samples. Our research shows that *C. albicans* is still the most prevalent species among clinical samples, but the increase of *C. parapsilosis* infections is increasing and may be related to its frequency (almost as high as *C. albicans*) in health professionals as a source of nosocomial infection. The evaluation of the antifungal susceptibility profile of the different species of the *C. parapsilosis* complex studied did not show marked differences for amphotericin B and 5-flucytosine, while *C. orthopsilosis* was more sensitive to itraconazole than *C. parapsilosis* and *C. metapsilosis*.

**Key-words:** *Candida* spp, *parapsilosis* complex, Rio Grande do Norte, Brazil, clinical samples, ICU professionals samples.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspecto das colônias das espécies de <i>Candida</i> no Chromagar.....	27
Figura 2 – Ciclo dos <i>intains</i> .....	30
Figura 3 – Delineamento experimental.....	35
Figura 4 – Distribuição do antifúngico e inóculo para o teste de microdiluição em caldo, destinado à determinação da suscetibilidade de leveduras, segundo o documento M27 A3 e M27-A4, CLSI (2008; 2012).....	39
Figura 5 – Distribuição das espécies de <i>Candida</i> spp. identificadas nos pacientes pelo LACEN e CPC.....	46
Figura 6 – Produtos da amplificação do intein VMA para cada espécie do complexo no gel de agarose.....	47
Figura 7 – Patógenos identificados em culturas de swab de mãos e boca dos profissionais de saúde das UTI's do HGT e HMWG.....	49
Figura 8 – Distribuição dos patógenos identificados em culturas de swab de mãos e boca dos profissionais de saúde das UTI's do HGT e HMWG.....	50
Figura 9 – Distribuição dos profissionais de saúde que participaram da pesquisa nos hospitais HGT e HMWG.....	51
Figura 10 – Profissionais nos quais espécies de <i>Candida</i> foram encontradas nas amostras de mãos e boca nas UTIs dos Hospitais HGT e HMWG de Natal/RN.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Inteins</i> em <i>Candida</i> spp.....	31
Tabela 2 – A interpretação da concentração inibitória mínima (CIM) baseada na leitura visual.....	40
Tabela 3 – Variação das espécies de referência recomendada pelo CLSI M27 S3 (2008) e CLSI M27- S4 (2012), segundo concentração inibitória mínima (CIM).....	41
Tabela 4 – Identificação das espécies de <i>Candida</i> por PCR ITS5, PCR <i>intein</i> VMA, CHROMagar <i>Candida</i> e Vitek 2, das amostras dos profissionais de saúde e amostras clínicas.....	42
Tabela 5 – Similaridade das sequencias da região ITS1-5.8S-ITS2 com sequencias depositadas na base de dados do GenBank, após a realização do <i>Blastn</i> .....	45
Tabela 6 – Número de isolados de <i>Candida</i> spp. proveniente do LACEN-RN e CPC por sítio anatômico ou material de coleta.....	47
Tabela 7 – Espécies de <i>Candida</i> encontradas nas amostras de mãos e boca dos profissionais das UTIs dos Hospitais HGT e HMWG de Natal/RN.....	52
Tabela 8 – CIM dos antifúngicos testados para isolados do complexo <i>C. parapsilosis</i> .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD – Agar Sabouraud Dextrose  
CHS2 – Quitina sintase  
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*  
CNS – Conselho Nacional de Saúde  
CPC – Centro de Patologia Clínica  
CQ – Controle de qualidade  
EPI – Equipamento de proteção individual  
GLT1 – gene Glutamato sintase  
GOGAT – proteína Glutamato sintase  
HE – *Homing* endonuclease  
HGT – Hospital Giselda Trigueiro  
HMWG – Hospital Monsenhor Walfredo Gurgel  
IMT – Instituto de Medicina Tropical  
IRAS – Infecção Relacionada à Assistência à Saúde  
ITS – *Internal Transcribed Spacer*  
LACEN – Laboratório Central do Rio Grande do Norte  
MIC – Concentração inibitória mínima  
MLST – Sequência de multilocus  
MS – Ministério da Saúde  
PCR – Reação em cadeia de polimerase  
PRP8 – *pre-mRNA processing protein*  
RAPD – Amplificação randômica de DNA polimórfico  
RFLP – Fragmento de restrição  
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*  
SADH – Álcool desidrogenase do gene que codifica  
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido  
THRRS – Treonil sintase  
UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
UTI – Unidade de Terapia Intensiva  
VMA – *Vacuolar ATPase*

## **APÊNDICE**

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para obtenção de amostras de mãos e mucosa bucal de profissionais da saúde.....	73
Apêndice B – Termo de Responsabilidade e Compromisso do Pesquisador Responsável.....	76
Apêndice C – Termo de Responsabilidade e Compromisso do Pesquisador Participante.....	77
Apêndice D – Co-autoria em artigo publicado durante o mestrado.....	78

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 Taxonomia e características gerais do gênero <i>Candida</i> .....	16
1.1.1 Espécies do gênero <i>Candida</i> de interesse médico .....	17
1.2 Micoses causadas por <i>Candida</i> .....	20
1.2.1 Epidemiologia.....	21
1.2.2 Fatores de virulência.....	22
1.2.3 Tratamento e Suscetibilidade antifúngica .....	24
1.3 Diagnóstico .....	26
1.3.1 Clássico e molecular .....	26
1.3.2 <i>Inteins</i> como marcadores moleculares de espécies em <i>Candida</i> .....	28
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>3. OBJETIVO</b> .....	34
3.1 GERAL .....	34
3.2 ESPECÍFICOS.....	34
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 Posicionamento ético do pesquisador .....	36
4.2 Local de estudo e obtenção das amostras .....	36
4.3 Identificação morfológica das leveduras .....	37
4.4 Identificação molecular das leveduras: extração de DNA e PCR da região ITS1-5.8S-ITS2 e do <i>intein</i> VMA.....	37
4.5 Teste de suscetibilidade aos antifúngicos para o complexo <i>Candida parapsilosis</i> .....	38
<b>5. RESULTADOS</b> .....	42
5.1 Amostras de <i>Candida</i> spp. isoladas de amostras clínicas.....	46
5.2 <i>Candida</i> spp. isoladas de amostras de profissionais da saúde .....	48
5.3 Comparação da susceptibilidade a antifúngicos das espécies do complexo <i>C. parapsilosis</i> isoladas neste estudo .....	52
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	60
<b>8. REFERÊNCIA</b> .....	61
<b>APÊNDICES</b> .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) por fungos tem aumentado substancialmente nas últimas décadas acarretando altos índices de mortalidade (ELAINE; ANALY, 2015), principalmente por candidemia, uma infecção na corrente sanguínea por leveduras do gênero *Candida*, o terceiro microrganismo mais isolado em hemoculturas e o principal patógeno desencadeador de sepse em neonatos. No ambiente hospitalar, infecções por *Candida* correspondem a 80% de todas as infecções fúngicas, incluindo principalmente infecções da corrente sanguínea (ICS), do trato urinário e do sítio cirúrgico (GUIMARÃES *et al.*, 2012; TAMURA *et al.*, 2007).

Em doentes hospitalizados, a candidemia representa a principal causa de morbidade e mortalidade, reproduzindo cerca de 8% a 10% das infecções sanguíneas oportunistas, e por isso, retrata a quarta maior causa de doença nosocomial (KOEHLER; TACKE; CORNELLY, 2014; SARDI *et al.*, 2013). Cerca de 65% dessas infecções advém de microrganismos da microbiota da pele, com a formação de biofilmes no sítio de inserção de cateteres (DORIA *et al.*, 2015). Os períodos de hospitalização dos pacientes gravemente enfermos com candidemia são prolongados, por envolver quadros de septicemia, terapia antibiótica e imunossupressora, além de diversos procedimentos médicos invasivos e, muitas vezes, tratamento específico tardio, chegando a taxas de mortalidade em torno de 50% (DOI *et al.*, 2016), gerando maior sofrimento aos pacientes e familiares, como também custos elevados aos sistema público de saúde.

A incidência de candidemia varia de acordo com a região geográfica e perfil populacional, apresentando maior risco a desenvolver infecção por *Candida* os pacientes internados em Unidades de Terapias Intensivas (UTIs), pacientes em uso de dispositivos médicos, imunocomprometidos, crianças abaixo de 1 ano de idade e idosos acima de 70 anos (YAPAR, 2014).

Os principais patógenos envolvidos na manifestação das infecções por *Candida* são *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (YAPAR, 2014). Embora *C. albicans* seja a espécie mais frequente, nos últimos anos tem se observado um aumento nas infecções nosocomiais por outras espécies de *Candida*, sendo *C. parapsilosis* a segunda espécie mais frequente em diversos países, principalmente

relacionada a infecções da corrente sanguínea (SINGARAVELU; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2014).

*C. parapsilosis* é uma levedura oportunista causadora de infecções sistêmicas, principalmente em doentes oncológicos, doentes internados em unidades de cuidados intensivos e em recém-nascidos. Ao contrário de outras espécies de *Candida*, é frequentemente isolada das mãos dos profissionais de saúde, que instalam e mantêm os dispositivos médicos, sugerindo assim uma via potencial de transmissão, o que leva a possível ocorrência de surtos hospitalares (SABINO; SAMPAIO; VERÍSSIMO, 2014). Nesse sentido, Menezes *et al.* (2012) relatam que surtos hospitalares causados por *C. parapsilosis* têm sido descritos com frequência e as principais fontes de infecção encontradas foram as mãos dos profissionais de saúde, as infusões, os biomateriais e a mucosa bucal.

Como as espécies de *Candida* apresentam fatores de virulência e perfil de susceptibilidade antifúngica diferenciados, sendo associadas aos vários tipos de patogenicidade e altas taxas de morbimortalidade (ALTHAUS *et al.*, 2015), a identificação exata da espécie é necessária para se conhecer a prevalência dos agentes envolvidos como também, monitorar, detectar resistência e contribuir para a escolha terapêutica mais adequada, favorecendo o restabelecimento do estado clínico geral do paciente (SABINO; SAMPAIO; VERÍSSIMO, 2014).

### **1.1 Taxonomia e características gerais do gênero *Candida***

O gênero *Candida* faz parte do domínio Eukarya, reino Fungi, sub-reino Dikarya, filo Ascomycota, classe Hemiascomycetes, ordem Saccharomycetales (DIEZMANN *et al.*, 2004). Apresentam mecanismo de reprodução assexuada, por brotamento ou fissão (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010), e também podem se reproduzir de forma sexuada podendo ser diploides ou haploides (GOW, 2013).

Esses microrganismos se desenvolvem tanto na presença de oxigênio quanto em anaerobiose, essas vias possibilitam a degradação de proteínas e carboidratos para obtenção de carbono e nitrogênio, substâncias essenciais para o seu desenvolvimento (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Estas leveduras são encontradas em diversos nichos ecológicos, formando um grupo de microrganismos heterogêneos (BRANDT *et al.*, 2011).

As colônias dessas espécies apresentam texturas variadas, podendo ser lisa ou rugosa, úmida, brilhante e de coloração branca a creme-amarelada. Quando cultivadas em meio

Sabouraud a uma temperatura de 37°C, as leveduras apresentam crescimento na forma de blastoconídios, hifas ou pseudohifas (SILVA *et al.*, 2012).

Possuem em média de 3 a 5 µm de comprimento, podendo se apresentar na forma oval, elíptica ou cilíndrica unicelular ou bicelulares, constituídas de paredes celulares com duas camadas e desenvolvem hifas verdadeiras ou ramificadas. Colonizam o corpo humano ao nascimento, permanecendo assim por toda vida, sendo algumas comensais residindo sobre a pele e membranas da mucosa tais como vagina, boca e tubo digestivo. A maioria cresce em substratos ricos em matéria orgânica como alimentos e detritos (LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010).

Na maioria das vezes, esses microrganismos não causam danos ao hospedeiro, podendo vir se tornar patogênicos quando ocorrem quebras nas barreiras físicas ou o sistema imune do hospedeiro se tornam debilitados, desencadeando infecções superficiais ou profundas (PÉREZ; KUMAMOTO; JOHNSON, 2013). O processo de transformação da levedura de comensal a agente infeccioso ocorre principalmente em ambiente hospitalar, estando relacionado ao aumento do número de procedimentos invasivos e o uso intensivo de antimicrobianos de amplo espectro, os quais quebram as barreiras de proteção natural do hospedeiro, principalmente nos pacientes internados nas UTIs (ALTHAUS *et al.*, 2015).

### **1.1.1 Espécies do gênero *Candida* de interesse médico**

Existem mais de 200 espécies de *Candida*, no entanto menos de 20 são reconhecidamente causadoras de infecções, englobando *C. albicans*, principal patógeno oportunista isolado em humanos, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *Candida dubliniensis*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida pelliculosa*, *Candida rugosa*, *Candida lusitaniae*, *Candida kefyr*, *Candida norvegensis*, *Candida lipolytica* e *Candida inconspícua* (SARDI *et al.*, 2013; YAPAR, 2014).

*C. albicans* foi o primeiro fungo zoopatogênico a ter seu genoma sequenciado, possibilitando uma variedade de conhecimentos sobre a patogenicidade e fatores de virulência dessa espécie (MAGEE; MAGEE, 2005). Considera-se que a origem das infecções por *C. albicans* seja na microbiota do trato digestivo no humano, no entanto foram relatados casos horizontais, mediante a colonização de sítios anatômicos diversos como pele, orofaringe, trato respiratório inferior e sistema geniturinário (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; YAPAR, 2014). Naturalmente, esta espécie apresenta sensibilidade a todas as classes de antifúngicos, com queixas mínimas de resistência a anfotericina B e resistência adquirida aos azólicos nos

pacientes com uso prolongado destes medicamentos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; SOUZA *et al.*, 2010).

Dentro do gênero *Candida*, após *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são as espécies mais isoladas em amostras clínicas, principalmente em hemoculturas de pacientes hospitalizados (QUINDÓS, 2014), sendo *C. parapsilosis* uma das espécies de *Candida* não-*Candida albicans* com maior incidência em infecções da corrente sanguínea (SILVA *et al.*, 2012; SINGARAVELU; GÁCSER; NOSANCHUK, 2014).

*C. glabrata* é um fungo saprobiótico e, diferente das outras espécies de *Candida*, não é dimórfico, já que não forma pseudo-hifas em temperaturas acima de 37° C, mostrando-se como blastoconídio (levedura) em todos os ambientes (BARBEDO; SGARBI, 2010), e apresentando um genoma haploide como principal característica genética (SILVA *et al.*, 2012). É a terceira espécie do gênero mais comum em infecções de pacientes pediátricos (LOCKHART, 2014), e o agente infeccioso mais prevalente em pacientes idosos e neoplásicos (YAPAR, 2014), descrita como a espécie de *Candida* não-*Candida albicans* mais frequente nos Estados Unidos (NUCCI *et al.*, 2010).

*C. tropicalis* diploide, assexuada, oportunista, não associada à microbiota e sim a infecção, variando entre o segundo ou terceiro lugar no *ranking* das desencadeadoras de candidemia em adultos (BARBEDO; SGARBI, 2010), principalmente em pacientes com leucemia e com neutropenia, e desencadeando altas taxas de mortalidade entre esses (YAPAR, 2014).

*C. krusei* apresenta resistência intrínseca ao fluconazol, combinada com a baixa sensibilidade para anfotericina B e a 5-fluorocitosina (BARBEDO; SGARBI, 2010). Esta espécie é isolada frequentemente de pacientes neutropênicos, com neoplasias hematológicas e transplantados de células-tronco (COLOMBO *et al.*, 2012).

*C. parapsilosis* é um patógeno exógeno, ubíquo no meio ambiente, podendo ser encontrado e isolado em plantas, água, solo, pele e mucosas humana e animal (BEDOUT; GÓMEZ, 2010; LUPETTI *et al.*, 2002). Suas células podem ser redondas, ovais ou cilíndricas (KIM; EL BISSATI; MAMOUN, 2006), e quando cultivadas em ágar Sabouraud dextrose, as suas colônias são brancas, cremosas, brilhantes e lisas ou enrugadas. Tais leveduras não formam hifas verdadeiras existindo apenas na forma de pseudo-hifas (SINGH; PARIJA, 2012).

Em 2005 ficou estabelecido que *C. parapsilosis* é na verdade, um complexo de três espécies distintas que são diferenciadas por testes moleculares em *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (TAVANTI *et al.*, 2005), sendo *C. parapsilosis*

*stricto sensu* a mais prevalente, seguida de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (LOVERO *et al.*, 2016).

Além das diferenças moleculares, estas espécies apresentam entre si particularidades quanto à formação de biofilmes, produção de enzimas e padrões do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos (PACHECO *et al.*, 2015). Por exemplo, os estudos mostram que *C. metapsilosis* não é capaz de produzir a enzima lipase, importante fator de virulência para infecções por *Candida*, enquanto *C. parapsilosis* produz tanto lipase quanto protease e apenas um pequeno número de cepas de *C. orthopsilosis* produz lipase (PRYSZCZ *et al.*, 2014), mostrando que *C. metapsilosis* é a espécie menos virulenta do complexo (BARBEDO *et al.*, 2016), porém com capacidade de causar doenças fúngicas graves (LOCKHART *et al.*, 2008).

Butler *et al.*, (2009) disponibilizou o conhecimento da sequência do genoma da espécie *C. parapsilosis stricto sensu*, possibilitando maiores estudos da biologia e virulência desta espécie, reconhecida como a mais prevalente e patogênica do complexo *C. parapsilosis* (RUIZ *et al.*, 2013). Análises filogenéticas da sequência do genoma mitocondrial de *C. metapsilosis* mostraram que *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* são mais próximas entre si do que qualquer uma delas com *C. metapsilosis*, contrariando análises anteriores (PRYSZCZ *et al.*, 2015).

Dentre as principais diferenças entre as espécies do complexo *C. parapsilosis*, podemos citar a capacidade de produzir pseudo-hifas, presente em *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, mas ausente em *C. metapsilosis*. Tal característica está relacionada à família de proteínas da parede celular Hyr/lff e à família das proteínas ALS (Agglutinin-Like Sequence). *C. metapsilosis* possui um menor número de genes na família Hyr/lff que *C. parapsilosis*, porém mais que *C. orthopsilosis*. Apesar disso, a incapacidade de *C. metapsilosis* em produzir pseudo-hifas parece estar mais relacionada à falta de alguns genes ALS do que ao menor número de membros da família Hyr/lff, o que explicaria a menor virulência desta espécie. (PRYSZCZ *et al.*, 2015).

*C. metapsilosis* é uma espécie híbrida diploide altamente heterozigota, o que indica que suas espécies parentais não eram patogênicas, e por reprodução sexuada foi gerado um novo agente patogênico oportunista que se disseminou mundialmente (PRYSZCZ *et al.*, 2015). Dados moleculares também indicam um alto grau de heterozigosidade em *C. orthopsilosis*, provável consequência de hibridização entre as suas duas subespécies, sugerindo a ocorrência de uma propagação global de clones híbridos (PRYSZCZ *et al.*, 2014). Já na espécie *C. parapsilosis stricto sensu* não foi observada hibridização, sendo esta espécie geralmente assexuada ou clonal (PRYSZCZ *et al.*, 2015).

A hibridização é um mecanismo no qual dois genomas divergentes se rearranjam por combinação ou exclusão, gerando outras linhagens que se adaptam a novos nichos ecológicos, sendo proposta como um mecanismo de evolução dos fungos, originando novos patógenos humanos (PRYSZCZ *et al.*, 2015).

## 1.2 Micoses causadas por *Candida*

As manifestações clínicas causadas por *Candida* são variadas, podendo gerar uma infecção localizada de mucosas até uma doença disseminada, ocorrendo principalmente em pacientes terminais com doenças debilitantes, neoplásicas, imunossupressoras, neonatos de baixo peso e após transplantes de órgãos, podendo acometer diferentes órgãos e tecidos, como pulmões, meninges, rins, bexiga, articulações, fígado, coração e olhos (PEIXOTO *et al.*, 2014). A candidíase disseminada pode ser transmitida por via exógena, como por exemplo, as mãos dos profissionais de saúde que manipulam dispositivos médicos nos cuidados aos pacientes, e por via endógena, principal via de contaminação (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; PARAMYTHIOTOU *et al.*, 2014).

A candidemia é desencadeada pela migração do agente de seu habitat normal para a corrente sanguínea ou outros tecidos, devido à quebra ou desequilíbrio das barreiras de proteção do hospedeiro. Na maioria dos casos o prognóstico é favorável, sendo de grande importância a confirmação diagnóstica para a implantação do tratamento antifúngico adequado (PEIXOTO *et al.*, 2014).

A espécie *C. albicans* é mais comuns nas candidíases oral, genital e cutânea, assim como *C. glabrata*, enquanto as infecções ocasionadas por *C. tropicalis* e *C. krusei* estão mais relacionadas à pacientes com neutropenia (BEDOUT; GÓMEZ, 2010).

Candidemia causada pelo complexo *C. parapsilosis* geralmente está relacionada com a presença de um cateter venoso central, assim como o uso de nutrição parenteral e ventilação mecânica, predominando nas infecções da corrente sanguínea em recém-nascidos prematuros em cuidados na Unidade de Terapia Intensiva neonatal (HIRAI *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2014; PAMMI *et al.*, 2014). A disseminação é favorecida por fatores de virulência como a secreção de enzimas hidrolíticas, adesão às proteases e formação de biofilme (SINGH; PARIJA, 2012).

### 1.2.1 Epidemiologia

Em indivíduos imunocomprometidos, a maioria das infecções por *Candida*, em média 95% dos casos, são causadas por apenas 5 espécies, sendo elas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Apenas uma pequena percentagem está associada a outras espécies de *Candida* tais como, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa*, *C. peliculosa*, *C. dubliniensis* e *C. famata* (BEDOUT; GÓMEZ, 2010; LOCKHART, 2014; SARDI *et al.*, 2013; YAPAR, 2014).

A incidência de infecções por *C. albicans* diminuiu nos últimos anos em vários países, enquanto que a incidência das espécies de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* aumentou. Estas mudanças estão relacionadas às características dos pacientes, ao aumento de pacientes imunocomprometidos, à terapia antifúngica e ao uso cada vez mais frequente de cateteres venosos (GUINEA, 2014; YAPAR, 2014). Na América do Norte e em diversos países europeus, se tem observado um declínio das infecções ocasionadas por *C. albicans* e um aumento das causadas por *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (CLEVELAND *et al.*, 2012; LOCKHART *et al.*, 2012), o mesmo se observa na América Latina, onde *C. parapsilosis* é a segunda espécie que mais causa infecção em recém-nascidos e pacientes em uso de cateter venoso ou tratamento nas UTIs (NUCCI *et al.*, 2010).

As taxas de mortalidade entre pacientes criticamente enfermos portadores de candidemia . Com uma mortalidade em torno de 15-35% em adultos e 10-15% em recém-nascidos, estando *C. albicans* mais frequente em pacientes com idade acima de 18 anos, enquanto *C. parapsilosis* se mostra presente em todas as faixas etárias e *C. glabrata* é mais comum em idosos. A redução das taxas de mortalidade parece ser dependente da administração adequada do medicamento, incluindo a dose correta em estágios iniciais da infecção e por período de tempo determinado (SILVA, *et al.*, 2015; GUINEA, 2014; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Nas últimas décadas *C. parapsilosis* surgiu como um importante patógeno nosocomial em infecções fúngicas invasivas com disseminação hematogênica em todo o mundo (ESTRADA-MATA *et al.*, 2014), tornando-se responsável por até 25% dos casos de candidemia e relacionada a elevado número de casos no Brasil (GUINEA, 2014).

Estudos epidemiológicos mostram que no Brasil, como também em outros países da América Latina, o complexo *C. parapsilosis* representa 20-30% das candidemias, não apresentando taxas diferentes entre as populações adultas e pediátricas (GONÇALVES *et al.*,

2010). Ao realizar uma investigação da frequência do isolamento desses microrganismos em 141 amostras de hemoculturas humanas de 11 hospitais em nove cidades do Brasil, Gonçalves e colaboradores (2010), relataram a presença de *C. parapsilosis stricto sensu* em 88%, *C. orthopsilosis* em 9% e *C. metapsilosis* em 3% das amostras consideradas do complexo *C. parapsilosis*. E em um estudo realizado no estado de São Paulo, região sudeste do Brasil, com isolados de *C. parapsilosis* em crianças hospitalizadas, 83,7% pertenciam à espécie *C. parapsilosis stricto sensu*, 10,2% à *C. orthopsilosis* e 6,1% à *C. metapsilosis* (RUIZ, *et al.*, 2013).

Um estudo observacional, realizado por Medrano *et al.* (2006) em um hospital da cidade de Fortaleza, Ceará, mostrou que 72% das infecções fúngicas foram causadas por espécies de *Candida* não-*Candida albicans*, com predominância de *C. parapsilosis* (36%), seguido de *C. albicans* (28%) e *C. tropicalis* (16%). O mesmo foi observado por Hinrichsen *et al.* (2008) na cidade do Recife, Pernambuco, onde as taxas de candidemia por *Candida* não-*Candida albicans* ultrapassaram os 50%, sendo *C. parapsilosis* (33%) o agente mais isolado. Estes dados epidemiológicos evidenciam a grande incidência das candidemias pelo complexo *C. parapsilosis* no Nordeste brasileiro.

### 1.2.2 Fatores de virulência

A virulência das espécies de *Candida* está relacionada à sua capacidade de adesão às células e secreção de diversas enzimas, as quais hidrolisam as proteínas do hospedeiro contribuindo para o rompimento de barreiras de tecidos conjuntivos, resultando em lesões celulares. Já a patogenicidade está relacionada à transformação de um morfotipo a outro, ou seja, levedura a hifas, permitindo assim, uma rápida adaptação a alterações em seu microambiente facilitando a sobrevivência, a invasão de tecidos e o escape do sistema imunológico (FORNARI *et al.*, 2013).

Um dos principais fatores de virulência desses organismos patogênicos são as adesinas, porém não foi confirmada a presença de adesinas em todas as espécies de *Candida*, já sendo confirmada a presença da família gênica ALS (Agglutinin-Like Sequence), associada à formação de biofilmes, em *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii*. Outras duas principais famílias gênicas com funções de adesinas estão presentes na espécie *C. glabrata*, sendo a EPA, mediadora da aderência nas

células epiteliais e endoteliais do hospedeiro humano, e a *PWP* a qual desempenha papel importante na adesão às células epiteliais e agregação durante a formação de biofilme (GROOT *et al.*, 2013).

Além da produção de adesinas a formação de biofilme, também é um fator de virulência importante para o estabelecimento de infecções fúngicas, conferindo resistência significativa à terapia antifúngica, controlando a penetração das substâncias através da matriz das células de defesa do hospedeiro, permitindo adesão aos dispositivos no paciente (TROFA; GACSER; NOSANCHUK, 2008; HORN *et al.*, 2012). O biofilme se desenvolve dependendo do tipo e do número de células que aderem ao dispositivo e do tipo de superfície. Esta formação inicia-se com a adesão microbiana seguida da fase de maturação (TAMURA *et al.*, 2007).

A produção do biofilme difere entre as espécies do complexo *C. parapsilosis*. *C. parapsilosis stricto sensu* apresenta maior capacidade de produção do que *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* respectivamente, sendo difícil a morte do biofilme de *C. parapsilosis* com a terapia antifúngica (TORO *et al.*, 2010).

A taxa de mortalidade associada a isolados de *C. parapsilosis*, capazes de formar biofilme, é significativamente alta (cerca de 71,4%) quando comparada à isolados não formadores de biofilme (taxa de mortalidade de 28%). Tal dado reforça a necessidade de desinfecção dos dispositivos contaminados por *C. parapsilosis*. Entretanto há relatos de tratamentos bem sucedidos com terapia antifúngica na formação de biofilme em infecções isoladas (SINGH; PARIJA, 2012).

Além da produção de biofilme, também há diversidade no perfil de susceptibilidade a antifúngicos, produção de proteases extracelulares, secreção de lipase, formação de pseudo-hifas e capacidade de danificar o tecido entre as espécies do complexo *C. parapsilosis* (RUIZ *et al.*, 2013; TORO *et al.*, 2010; GAGO *et al.*, 2014; BRILHANTE *et al.*, 2014).

Exemplo destas diversidades pode ser observado quanto ao antifúngico caspofungina, para o qual as cepas de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* apresentam concentração inibitória mínima (MIC) mais baixa do que *C. parapsilosis stricto sensu*. Também pode ser observada diferença na capacidade de danificar o tecido das larvas *Galleria mellonella*, muito estudada para avaliar os padrões de virulência em fungos patogênicos como *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp. e *Candida* spp., sendo observado que as larvas infectadas com *C. metapsilosis* apresentaram apenas infecções localizadas, enquanto que as infectadas com *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis* apresentaram infecção disseminada (GAGO *et al.*, 2014).

A espécie *C. parapsilosis stricto sensu* é descrita como a mais virulenta do complexo *C. parapsilosis* (RUIZ *et al.*, 2013), apresentando habilidades similares à *C. orthopsilosis* quanto a adesão às células epiteliais humanas, ao passo que *C. metapsilosis* é vista como a menos patogênica (BERTINI *et al.*, 2013), uma vez que não é capaz de produzir importantes fatores de virulência para o gênero *Candida*, como formação de pseudo-hifas e secreção de lipase extracelular (PRYSZCZ *et al.*, 2014; PRYSZCZ *et al.*, 2015).

### 1.2.3 Tratamento e Susceptibilidade antifúngica

O tratamento das infecções desencadeadas por espécies de *Candida* é baseado no uso de agentes antifúngicos, classificados em polienos (anfotericina B e nistatina), azóis (fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol), equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina), e análogos de nucleosídeo (5-fluorocitosina) (MAUBON *et al.*, 2014; ALBURQUENQUE *et al.*, 2013). O fluconazol e a anfotericina B são os medicamentos mais utilizados (PARAMYTHIOTOU *et al.*, 2014) e seu uso excessivo e / ou inadequado no tratamento ou profilaxia é visto como causa do aumento a resistência das *Candida* spp. (SARDI *et al.*, 2013).

O tratamento das infecções desencadeadas por espécies de *Candida* está voltado para inibição da proliferação da levedura e diminuição dos fatores de riscos favoráveis ao seu crescimento. Quanto mais rápido for iniciado o tratamento, menores serão os índices de mortalidade, permanência hospitalar e gastos terapêuticos (LÓPEZ-MARTÉNEZ, 2010; ZARRIN; MAHMOUDABADI, 2009).

A escolha do antifúngico para um correto tratamento das infecções fúngicas deve considerar os riscos de co-morbidade, a espécie do fungo vigente, a interação farmacológica e a história clínica do paciente (ALCAZAR-FUOLI; MELLADO, 2014).

Os antifúngicos apresentam mecanismos de atuação diferenciados nas células fúngicas, a depender da classe a qual o farmaco pertence. O poliênico anfotericina B age na membrana citoplasmática, especificamente no ergosterol, principal esteroide da membrana citoplasmática fúngica, produzindo poros aquosos que permitem um aumento da permeabilidade celular, alterando o equilíbrio eletrolítico, resultando na morte da célula fúngica. A maioria das espécies de *Candida* apresenta susceptibilidade a essa droga, não se aconselhando realizar seu uso com outras drogas por este medicamento ser nefrotóxico

(MAUBON *et al.*, 2014; PARAMYTHIOTOU *et al.*, 2014; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Os medicamentos mais utilizados no tratamento das candidemias são os azóis fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol. Tais drogas atuam na inibição da enzima lanosterol 14- $\alpha$ - demetilase, impedindo a biossíntese de ergosterol, promovendo a destruição da membrana citoplasmática do fungo (GROSSMAN; CHILLER; LOCKHART, 2014; MAUBON *et al.*, 2014; PARAMYTHIOTOU *et al.*, 2014; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

A classe equinocandinas representada por, caspofungina, micafungina e aniludafungina, é composta por lipopeptídeos sintéticos derivados de fungos. Estes antifúngicos apresentam uma inibição não competitiva da enzima  $\beta$ -(1, 3)-glucano sintase, responsável pela síntese do polissacarídeo  $\beta$ -(1, 3)-D-glucano responsável pela integridade da parede celular, aumentando a vulnerabilidade à lise osmótica, por fim, resultando na morte da célula fúngica, sendo, portanto, fungicida. As espécies de *Candida* não apresentam resistência intrínseca às equinocandinas, apresentando um percentual menor que 1% (GROSSMAN; CHILLER; LOCKHART, 2014).

Os análogos de nucleosídeos são representados pela flucitosina, a qual age como fungistáticos ao penetrar na célula fúngica por meio da citosina permease, convertendo-se em 5-fluoracil, desencadeando a inibição da enzima timidilato-sintetase, interferindo na síntese de DNA e RNA. Esta droga é muito tóxica e como a seleção de cepas resistentes é rápida, recomenda-se seu uso em associação com a anfotericina B (CUENCA-ESTRELLA, 2010; ASHLEY *et al.*, 2006; MAUBON *et al.*, 2014; PARAMYTHIOTOU *et al.*, 2014).

A espécie *C. albicans* é sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, havendo resistência adquirida a azólicos em alguns pacientes expostos a estes medicamentos, quando o tratamento é prolongado. Há poucos relatos de resistência a anfotericina B. Já *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*, apresentam menor sensibilidade ao fluconazol e anfotericina B. Em geral *C. tropicalis* apresenta resistência a 5-fluorocitosina, enquanto a *C. glabrata* e *C. krusei* vem apresentando maior resistência ao voriconazol e fluconazol nos últimos anos (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Em relação à sensibilidade antifúngica das três espécies do complexo *C. parapsilosis*, as pesquisas relatam que as concentrações inibitórias mínimas de caspofungina frente a *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* são menores que aquelas para *C. parapsilosis stricto sensu* (SPREGHINI *et al.*, 2012) As taxas de resistência ao fluconazol se apresentam aumentadas e diferenciadas entre as três espécies do complexo (LOCKHART *et al.*, 2012), sendo *C.*

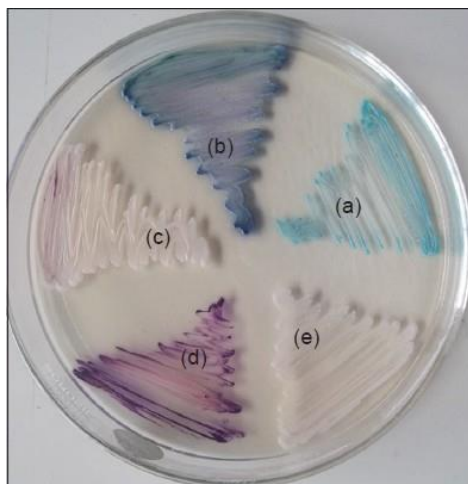
*metapsilosis* ligeiramente menos susceptível a essa droga do que as outras duas espécies (GONÇALVES *et al.*, 2010). Assim, o diagnóstico preciso destas espécies influencia as decisões terapêuticas (TORO *et al.*, 2010).

### 1.3 Diagnóstico

#### 1.3.1 Clássico e molecular

Algumas espécies de *Candida* de importância clínica são identificadas por métodos clássicos fenotípicos, testes bioquímicos e fisiológicos (MERSEGUEL *et al.*, 2015). O ágar Sabouraud Dextrose (Difco Laboratories, Ltda., MI, EUA) acrescido de cloranfenicol é o meio de cultura de escolha para o isolamento de leveduras do gênero *Candida* por inibir o crescimento da maioria das espécies bacterianas. O meio de cultura CHROMagar *Candida* (CHRO- Magar, Microbiology, Paris, França), por conter substâncias cromogênicas, é útil para verificação de diferentes espécies de *Candida* numa mesma amostra, permitindo a identificação presuntiva rápida de infecção fúngica mista (RIBEIRO *et al.*, 2009). Com a inclusão de substratos cromogênicos no meio, as colônias de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* produzem cores diferentes, permitindo assim a detecção direta destas espécies após 24 a 48 horas de crescimento (MURRAY *et al.*, 2007). As colônias de *C. albicans* aparecem com uma cor verde-claro a verde médio, as de *C. tropicalis* aparecem azul esverdeadas a azul metalizado, as de *C. krusei* aparecem com coloração rosa claro com um rebordo esbranquiçado e as *C. glabrata* aparecem lilás a roxo, sendo a cor branca ou rosa das colônias presuntiva para as outras espécies de *Candida* (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Em meio cromogênico as cepas do complexo *C. parapsilosis* apresentam coloração lilás, rosa clara ou branca (Figura 1), não sendo um método confiável para identificar estas espécies, já que estas cores são comuns a outras espécies de *Candida*, sendo útil apenas para auxiliar na identificação de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (MENEZES *et al.*, 2012).



**Figura 1** - Aspecto das colônias das espécies: (a) *C. albicans*, (b) *C. tropicalis*, (c) *C. krusei*, (d) *C. glabrata* e (e) *C. parapsilosis* em meio cromogênico. <http://www.jlponline.org/text.asp?2014/6/1/28/129087>.

As espécies do complexo *C. parapsilosis* são indistinguíveis fisiologicamente e morfolologicamente (ZICCARDI *et al.*, 2015). No entanto, existem hoje diversas técnicas moleculares capazes de identificar estas espécies, como por exemplo, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica molecular bastante utilizada na micologia, no qual permite à amplificação *in vitro* de segmentos de DNA (BAGABLI; MARQUES, 2010) e pode ser associado ao estudo de polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), o que possibilita a comparação do perfil de restrição de um único gene entre isolados de amostras clínicas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Tavanti *et al.* (2005) distinguiram as espécies deste complexo pela análise de sequências do rDNA (ITS1-5.8S-ITS2), RAPD, MSLT e PCR-RFLP do gene codificador da álcool-desidrogenase secundária (*SADH*) digerido com a enzima de restrição BanI. Os autores observaram diferenças significativas nas sequências ITS do complexo *C. parapsilosis*, havendo similaridade de 82,5% entre *C. parapsilosis* e *C. metapsilosis*, 88,1% entre *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, e 86,1% entre *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*.

No entanto estes métodos são trabalhosos, com interpretação de resultados, por vezes subjetiva (FAHAMI *et al.*, 2010). Assim, a busca por marcadores que de forma rápida e fácil distingam as espécies do complexo *C. parapsilosis* é de extrema importância. As técnicas desenvolvidas, como citado acima, envolvem além do PCR, sequenciamento e ou RFLP. Recentemente, porém, Prandini *et al.* (2013) desenvolveram um método baseado apenas em uma única PCR, usando como marcador uma região de tamanho variável, o *intein* VMA.

A importância da identificação correta das novas espécies recai, não somente pela

reconhecida diferença no perfil de susceptibilidade a novos antifúngicos pertencentes à nova classe das equinocandinas (DIMOPOULOS; VELEGRAKI; FALAGAS, 2009; SILVA *et al.*, 2009), mas ainda sobre questões epidemiológicas a serem esclarecidas. Por exemplo, *C. metapsilosis* não foi diagnosticada em pacientes adultos com candidemia, mas apenas em população pediátrica (TAY; NA; CHONG, 2009), com incidência maior verificada em amostras de mucosa, secreção de trato respiratório, líquido ascítico e articular, não sendo encontradas em hemoculturas (LOCKHART *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009). As características epidemiológicas de *C. orthopsilosis*, por sua vez, não estão bem definidas, mas sua importância em maiores de 60 anos e como agente causal de surtos hospitalares merece atenção, segundo os relatos da literatura (LOCKHART *et al.*, 2008; TAVANTI *et al.*, 2005). No geral, a incidência de *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* não ultrapassa a taxa de 10% das infecções pelo complexo nos estudos globais (GOMEZ-LOPEZ *et al.*, 2008).

### 1.3.2 *Inteins* como marcadores moleculares de espécies em *Candida*

*Inteins* são sequências de DNA codificadores, transcritos e traduzidos juntamente com a sequência hospedeira (*extein*) e que sofrem um auto-*splicing* proteico, unindo as porções N e C-terminais da proteína hospedeira, garantindo sua funcionalidade. Aparentemente, não contribuem para a aptidão do organismo hospedeiro, porém alguns *inteins* podem ter evoluído se tornando funcionais, como por exemplo, modulando a expressão gênica em um nível pós-traducional (TOPILINA *et al.*, 2015a).

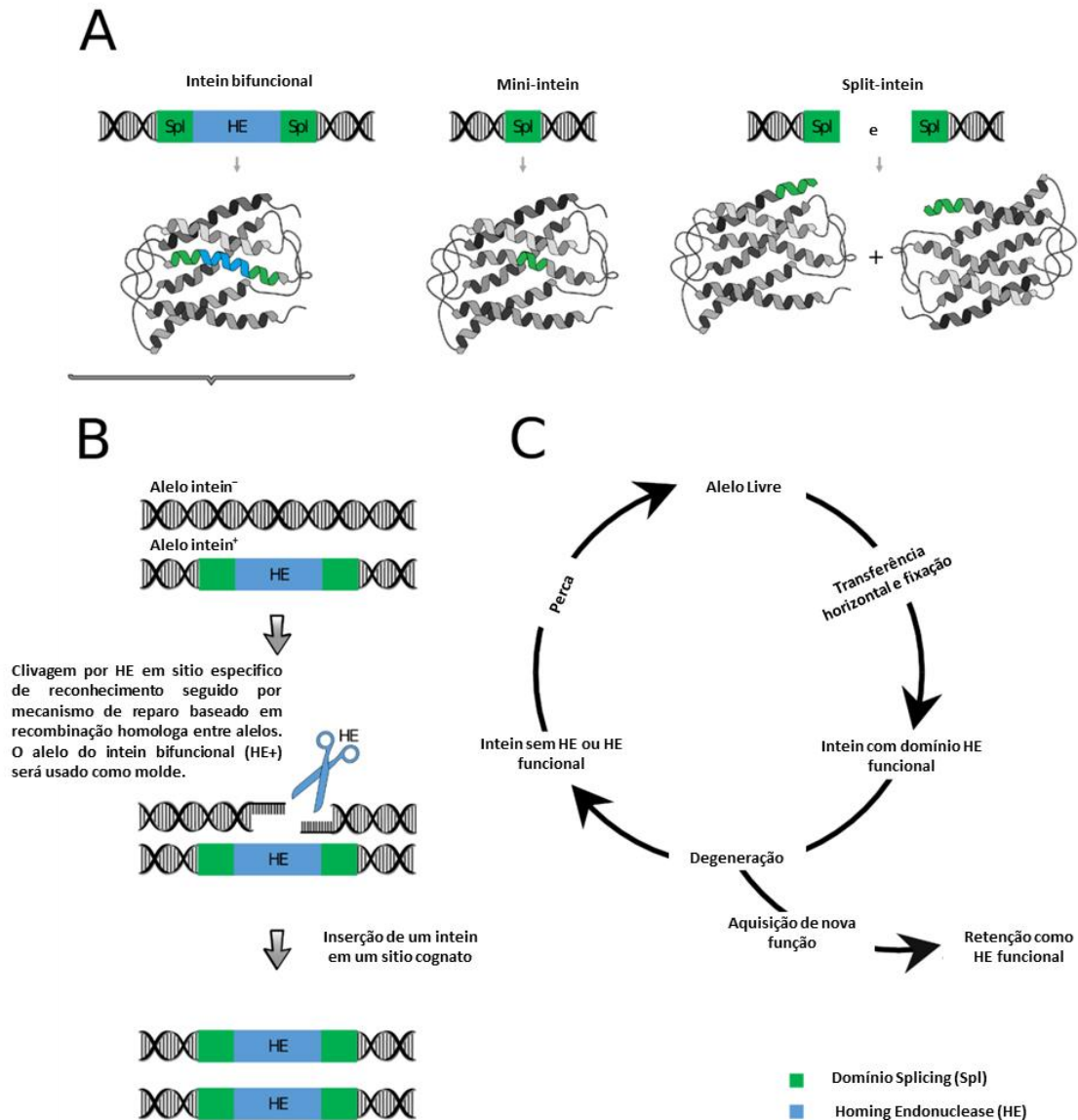
Existem três tipos de *inteins*, os mini-*inteins*, os *inteins* bifuncionais e os split-*inteins* (WOOD *et al.*, 1999). Os mini-*inteins* não apresentam o domínio *Homing* endonuclease (HE), possuindo um domínio *splicing* contínuo, com blocos de aminoácidos conservados (blocos A, B, F e G) responsável pela excisão do elemento da proteína hospedeira, já o *intein* split são mini-*inteins* nos quais os domínios N e C-spl são transcritos e traduzidos com *exteins* diferentes (Figura 2A) e são capazes de sofrer um trans-*splicing* proteico, unindo dois polipeptídeos distintos (VOLKMANN; IWAI, 2010).

Além disso, *inteins* bifuncionais apresentam um domínio HE separando o domínio *splicing* em N-Spl e C-Spl. Se funcional, a HE pode executar uma quebra da dupla fita de DNA em alelo cognato que não possui o *intein* e pelo mecanismo de sistema de reparo por recombinação homóloga o alelo íntegro, contendo o *intein*, serve de molde para o reparo,

sendo copiado então para o outro alelo por um evento de conversão gênica, ocasionando uma herança Super-mendeliana que promove a rápida disseminação e fixação do *intein* em toda população (Figura 2B) (LIU, 2000). Uma vez que a HE está presente na grande maioria dos alelos da população, não há mais pressão seletiva para sua funcionalidade e ela passa por um estágio de degeneração e não funcionalidade, o que pode ter sido responsável pela perda do *intein* em algumas espécies (Figura 2C) (BURT; KOUFOPANOU, 2004; KOUFOPANOU; BURT, 2005; GOGARTEN; HILARIO, 2006). O domínio HE pode ser de diferentes famílias de HE, porém as mais comuns são da família LAGLIDADG. HEs desta família possuem blocos ou *motifs* de aminoácidos conservados, conhecidos como C, D, E e H (LIU, 2000). Os blocos C e E possuem um resíduo de ácido aspártico, cada, considerados essenciais para o funcionamento do HE (POSEY *et al.*, 2004).

Geralmente os *inteins* são encontrados em locais conservados de proteínas conservadas com funções vitais na célula, a exemplo das DNA e RNA polimerases, aminoacil tRNA sintetases, recombinases, topoisomerases, helicases e componentes essenciais do spliceossoma (LIU, 2000; NOVIKOVA *et al.*, 2014).

De acordo com Perler (2002), a maioria dos *inteins* fúngicos estão presentes nos genes ATPase vacuolar, subunidade A (*intein* VMA) e PRP8 (*intein* PRP8). O *intein* VMA é amplamente disperso entre leveduras, como *Saccharomyces*, *Zygosacchromyces* e algumas espécies de *Candida* (todos Ascomycetos), enquanto o *intein* PRP8 está presente, de forma esporádica em todos os filos do reino Fungi. Outros *inteins* podem ser observados em algumas subunidades da RNA polimerase, GLT1 (glutamato sintase), CHS2 (quitina-sintase) e ThrRS (treonil-tRNA-sintetase (POULTER, 2007). Estes *inteins* não estão presentes no genoma humano, podendo contribuir como potenciais alvos terapêuticos e de diagnóstico (PRANDINI *et al.*, 2013), principalmente os *inteins* ThrRS, GLT1 e VMA das leveduras *Saccharomycetales*, por se encontrarem em genes muito conservados nos eucariotos, pois o ThrRS e o GLT1 são essenciais para sobrevivência da célula hospedeira, e o VMA é de grande importância (YAMASHIRO *et al.*, 1990). Assim, em virtude dos sítios de inserção destes *inteins* serem conservados, se for descoberto um fármaco que iniba o *splicing* proteico, este teria uma ação de grande espectro (LIU; YANG, 2004).



**Figura 2** – (A) *intein* bifuncional, mini-*intein* e Split-*intein* (B) clivagem sítio específico do DNA por HE seguido por mecanismo de reparo, resultando na inserção do *intein* no alelo antes vazio. (C) ciclo HE: ganho de HE, degeneração e perda dentro de populações hospedeiras. Modificado de Burt e Koufopanou, 2004.

Segundo um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, conduzido por Fernandes *et al.* (2016) (APÊNDICE D) o *intein* VMA está presente em 16 espécies de *Candida*, o ThrRS em 6 e o GLT1 em 3. Havendo algumas espécies que apresentam mais de um *intein* em seu genoma, por exemplo, os *inteins* VMA e ThrRS estão presentes na espécie *C. maltosa*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* e os *inteins* VMA e GLT1 na *C. famata*, enquanto outras espécies como *C. albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. ciferri* não possuem *intein*. Estas

características possibilitam o uso destes *inteins* como marcadores moleculares na diferenciação das espécies de *Candida* por meio da análise de presença e/ou tamanho polimórfico destes elementos (tabela 1)

Muitos desses *inteins*, como pode se evidenciar na tabela 1, não possuem um ou os dois aspartatos essenciais do domínio HE, fazendo com que o HE não seja funcional.

**Tabela 1** – *Inteins* em *Candida* spp (FERNANDES *et al.*, 2016).

Proteína Hospedeira	Espécie de <i>Candida</i>	Nomenclatura	Tamanho (quant. Aa)	Resíduos essenciais de aspartato	
				Bloco C	Bloco E
<b>VMA1, vacuolar ATPase</b>	<i>C. castellii</i> **	CcaVMA	367	D	I
	<i>C. apicola</i> **	CapVMA	389	T	K
	<i>C. glabrata</i>	CglVMA	415	S	Q
	<i>C. nivariensis</i> **	CniVMA	424	S	K
	<i>C. braccarensis</i> **	CbrVMA	420	S	K
	<i>C. homilentoma</i> **	ChoVMA	491	D	D
	<i>C. sorboxylosa</i> **	CsorVMA	374	T	V
	<i>C. tropicalis</i>	CtrVMA	471	I	A
	<i>C. sojae</i> **	CsoVMA	501	D	N
	<i>C. metapsilosis</i>	CmeVMA	454	N	D
	<i>C. orthopsilosis</i>	CorVMA	530	D	D
	<i>C. intermedia</i> **	CinVMA	455	T	D
	<i>C. maltosa</i> **	CmaVMA	451	N	D
	<i>C. famata</i>	CfaVMA (DhaVMA)	395	N	D
<b>ThrRS, threonyl-tRNA synthetase</b>	<i>C. tropicalis</i>	CtrThrRS	345	N	S
	<i>C. sojae</i> **	CsoThrRS	338	T	S
	<i>C. maltosa</i> **	CmaThrRS	444	D	D
	<i>C. orthopsilosis</i>	CorThrRS-A	180	-	-
	<i>C. orthopsilosis</i>	CorThrRS-B	439	D	D
	<i>C. parapsilosis</i>	CpaThrRS	183	-	-
	<i>C. metapsilosis</i>	CmeThrRS	172	-	-
<b>GLT1, glutamate synthase</b>	<i>C. famata</i>	CfaGLT1	607	D	D
	<i>C. carpophila</i> **	Ccar GLT1	557	D	D
	<i>C. guilliermondii</i>	Cgu GLT1	553	E	D

\* Resíduos de aspartato no bloco C e E considerado essenciais para a função da HE

\*\* Inteins descritos neste trabalho.

O *intein* ThrRS situa-se no domínio catalítico da aminoacil RNA transportador sintetase de classe II. A ThrRS é a enzima responsável pelo acoplamento do aminoácido treonina ao seu RNA transportador, tendo uma função vital na célula por estar envolvida com a síntese proteica (DONOGHUE; LUTHEY-SCHULTEN, 2003). Este *intein* está presente em *C. tropicalis*, como um *intein* bi-funcional, e em *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, como mini-*intein* (CorThrRS-A). Porém, alguns isolados de *C. orthopsilosis* apresentam o *intein* bi-funcional (CorThrRS-B) no mesmo sítio de inserção (PRANDINI *et al.*, 2013). Esta variação de *intein* nas cepas de *C. orthopsilosis* corrobora a suposição de hibridização entre as suas subespécies (PRYSZCZ *et al.*, 2014).

A aminoacil-tRNA sintetase (aaRs) desempenha um importante papel na síntese proteica, sendo considerada um importante alvo terapêutico para os patógenos fúngicos e bacterianos (VONDENHOFF; VAN AERSCHOT, 2011; KALIDAS *et al.*, 2014).

O gene *GLT1* codifica a enzima glutamato sintase – GOGAT, que é multimérica e age na hidrólise de L-glutamina, pela conversão de 2-oxoglutarato em L-glutamato e captação de elétrons por doação destes nas células das leveduras (FILETICI *et al.*, 1996). GOGAT não influencia de forma significativa à fisiologia celular de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo sua principal característica auxiliar na síntese do glutamato (BRAMBILLA *et al.*, 2015). No entanto, esta enzima, codificada pelo gene *GLT1*, é uma via de síntese do glutamato amplamente utilizada em *Candida* spp., o que ressalta a importância do *intein* *GLT1* como alvo terapêutico (FERNANDES *et al.*, 2016).

A presença do *intein* VMA em *Candida* é esporádica, pois espécies muito próximas podem ser diferentes quanto à presença deste *intein*. Além da presença/ausência, também se pode observar um polimorfismo quanto ao tamanho destes elementos, como no complexo *C. parapsilosis*, no qual *C. parapsilosis stricto sensu* não tem tal *intein*, enquanto *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* o possuem, mas em tamanhos diferentes, distinguíveis em um gel de agarose comum, assim, o simples PCR deste *intein* constitui em uma técnica rápida e prática para correta identificação das espécies do complexo, não necessitando realizar a digestão ou sequenciamento (PRANDINI *et al.*, 2013; PRYSZCZ *et al.*, 2015).

Estes *inteins* presentes na proteína ATPase vacuolar, podem ser vistos como potenciais alvos terapêuticos na inibição da função normal desta proteína, interrompendo a homeostase do pH em fungos patogênicos. Como por exemplo, o uso das drogas azoles, que associado a outros agentes podem alterar a conformação da ATPase (ZHANG; RAO, 2010).

## 2 JUSTIFICATIVA

Entre as espécies de *Candida* não-*Candida albicans*, o complexo *C. parapsilosis*, destaca-se por apresentar grande relevância clínica, uma vez que tais espécies tem sido largamente encontradas em vários estudos epidemiológicos por todo o mundo. Sua alta frequência em profissionais da área da saúde sugere que estes indivíduos sejam potenciais reservatórios e vias de transmissão (KOJIC, DAROUICHE, 2004; COSTA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2008; HAMMOUD *et al.*, 2013). As espécies do complexo *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) têm sido relatadas como importante causa de infecções hematogênicas, principalmente em neonatos e pacientes imunocomprometidos, sendo comumente associadas ao uso de dispositivos intravasculares (TROFA, GACSER, NOSANCHUK, 2008). Tais espécies ainda apresentam diferenças de virulência, produção de biofilme e resistência antifúngica, porém seu diagnóstico automatizado (com Vitek) não as distingue (HIGASHI *et al.*, 2015)

Apesar da relevância clínica de tal complexo de espécies, não há até o momento estudo sobre esta casuística no estado do Rio Grande do Norte. Assim, esta pesquisa foi pioneira na diferenciação molecular das espécies do complexo, bem como no estudo comparativo da ocorrência de espécies do complexo *C. parapsilosis* e outras do gênero *Candida*, em amostras clínicas de pacientes e de mãos e boca de profissionais da saúde.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 GERAL

Comparar a ocorrência de espécies crípticas do complexo *C. parapsilosis* em relação às demais espécies do gênero *Candida* em amostras biológicas de pacientes e de profissionais de hospitais do Natal, RN e avaliar a sua susceptibilidade a antifúngicos.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a ocorrência das diferentes espécies do gênero *Candida* em amostras biológicas, previamente identificadas pelo sistema Vitek-2 (Biomerieux) no LACEN-RN e no Centro de Patologia Clínica do Natal/RN e em amostras de mãos e boca de profissionais das UTIs dos hospitais Hospital Giselda Trigueiro e Hospital Monsenhor Walfredo Gurgel;
- Diferenciar as espécies crípticas *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis stricto sensu* nas amostras coletadas;
- Avaliar o perfil de susceptibilidade das diferentes espécies do complexo *C. parapsilosis* a diferentes antifúngicos;
- Avaliar a relação entre os resultados obtidos para amostras clínicas com o isolamento e identificação de *Candida* spp. a partir das mãos e boca dos profissionais de saúde dos hospitais avaliados.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental abaixo exemplifica o percurso metodológico seguido para a realização desta pesquisa.

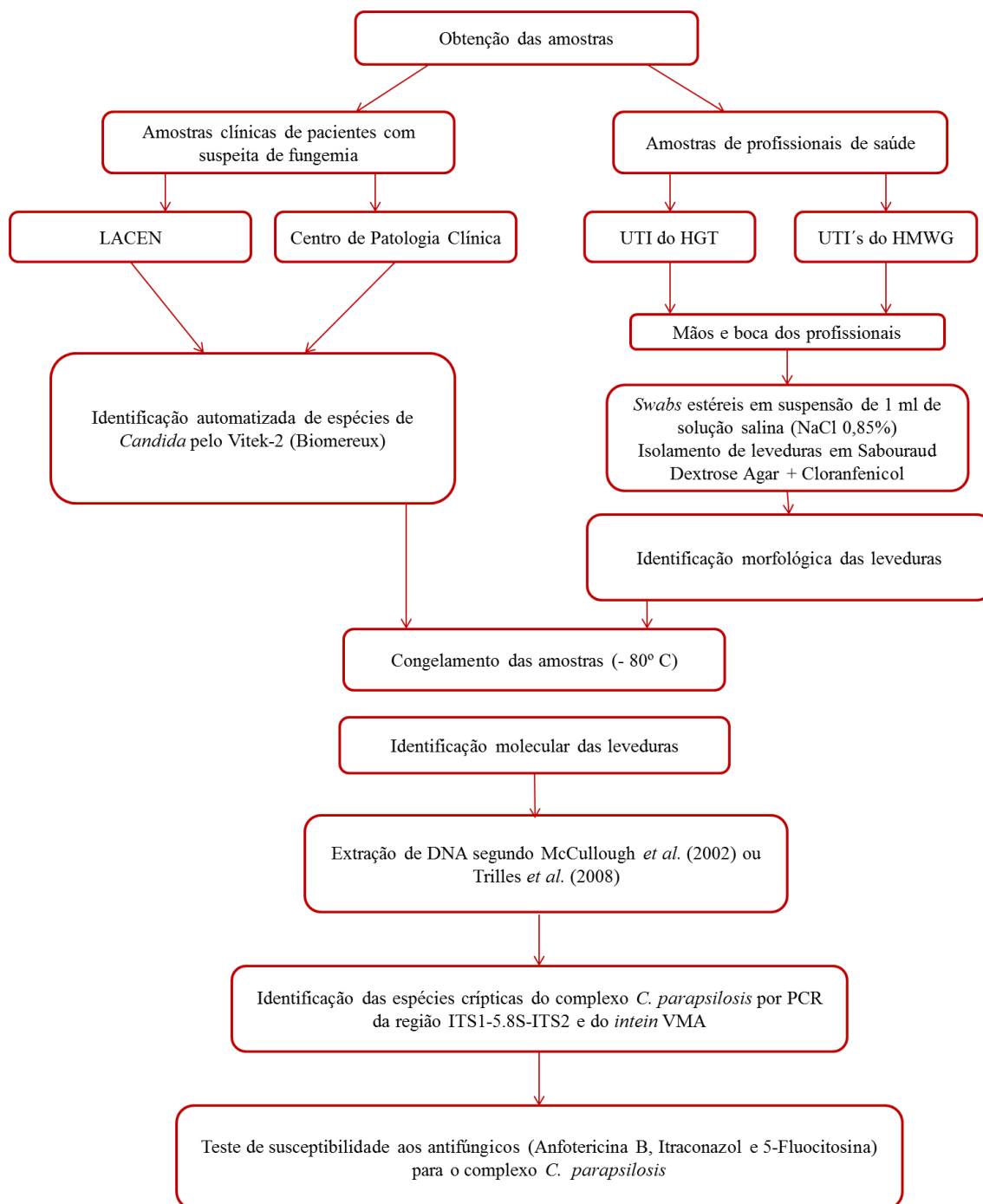


Figura 3 - Delineamento experimental.

#### **4.1 Posicionamento ético do pesquisador**

Para realização desse estudo foram observados os pressupostos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS)/Ministério da Saúde (MS) de 12 de Dezembro de 2012, que dispõe sobre a pesquisa com seres humanos (BRASIL, 2012). Os participantes receberam esclarecimento quanto à possibilidade de desistência na participação do estudo, em qualquer etapa do seu desenvolvimento, sem que este acarrete nenhum prejuízo ou constrangimento. A identidade dos participantes foi mantida no anonimato e estes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), o qual informa o teor científico e as características da pesquisa no momento da coleta dos dados (CAAE 45188515.1.0000.5537). Os termos de responsabilidade e compromisso dos pesquisadores coordenador e participante estão apresentados nos APÊNDICES B e C.

#### **4.2 Local de estudo e obtenção das amostras**

O estudo foi realizado no laboratório do Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte (IMT-UFRN) a partir da obtenção de amostras de leveduras isoladas em amostras clínicas de sítios diversos na rotina normal do LACEN-RN e do Centro de Patologia Clínica de Natal-RN, no período de 01 de agosto de 2015 a 01 de setembro de 2016 (13 meses), identificadas como sendo pertencentes ao gênero *Candida* pelo sistema automatizado Vitek-2 (Biomérieux). O estudo também foi realizado nas UTIs dos hospitais HGT (UTI Adulto Infeciosa) e HMWG (UTI Geral e UTI Pediátrica) com o isolamento de leveduras a partir de mãos e boca dos profissionais de saúde que se dispuseram a participar da pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A). Por envolver amostras clínicas provenientes de pacientes humanos e coletas em ambiente hospitalar, a pesquisa contou com a carta de anuência do LACEN-RN, do Centro de Patologia Clínica e dos Hospitais HGT e HMWG.

A coleta das amostras das duas mãos e boca dos profissionais foram realizadas quinzenalmente, no período de 01 de agosto de 2015 a 01 de agosto de 2016 (12 meses), sendo 06 meses de coleta para cada hospital, utilizando *swabs* estéreis, sendo um deles friccionado na mucosa bucal e o outro nas mãos. Em seguida, cada swab era introduzido em tubo contendo suspensão de 1 ml de solução salina (NaCl 0,85%) estéril. Um total de 196

amostras (de 98 profissionais, sendo de cada um coletado uma amostra de mão e outra de boca) foram obtidas. Imediatamente após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Instituto de Medicina Tropical (IMT) da UFRN e semeadas em placas contendo meio Sabouraud Dextrose Agar acrescido de cloranfenicol (50mg/mL) e incubadas a 37°C por um período de até 15 dias. Para as amostras identificadas como *C. parapsilosis* pelo Vitek-2 (Biomereux), as culturas foram também mantidas em Sabouraud Dextrose Agar e incubadas a 37°C por 48h, para posterior extração de DNA. Todas as amostras obtidas nessa pesquisa se encontram congeladas a - 80° C no IMT/UFRN.

Cepas padrão de *C. parapsilosis* (ATCC 22019 e ATCC 90018), *C. orthopsilosis* (ATCC 96141), *C. metapsilosis* (ATCC 96143) e *C. krusei* (ATCC 6258), cedidas pelo Prof. Eduardo Bagagli da UNESP-Botucatu foram utilizadas como controle nas identificações morfológicas e moleculares bem como em testes de susceptibilidade a antifúngicos.

#### **4.3 Identificação morfológica das leveduras**

As leveduras isoladas das mãos e boca de profissionais foram semeadas em meio CHROMagar (Difco) para a diferenciação entre *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, assim como as amostras que não foram analisadas pelo Vitek-2 no LACEN-RN.

#### **4.4 Identificação molecular das leveduras: extração de DNA e PCR da região ITS1-5.8S-ITS2 e do *intein* VMA**

Para aquelas amostras não identificadas pelo Vitek-2 ou para amostras identificadas como *C. parapsilosis*, o DNA foi extraído segundo protocolo descrito por TRILLES *et al.* (2008) ou alternativamente por MCCULLOUGH *et al.* (2002). A qualidade do DNA foi aferida por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo.

As reações de PCR do *intein* VMA foram realizadas em tubos de 0,2 mL com volumes totais de 12,5 µL, contendo 1 µL de DNA, e as reações de PCR para sequenciamento foram realizadas em tubos de 0,2 mL em volumes totais de 50 µL contendo 4 µL de DNA, ambos contendo PCR buffer 1X (100 mM Tris-HCl (pH 8.8 a 25°C), 500 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP, 7,8125 µL de água (nuclease-free), DMSO 2%, 0,5 µM de cada *primer* (TP1fwd ACTGCTGATTAYCCATTGTTG e TP2rev, AGATTGAWGCTTCTCTKGCAG) (PRANDINI *et al.*, 2013) e 1 unidade da enzima Platus Polymerase (recombinante).

Para a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 (para as leveduras isoladas de mãos e boca de profissionais e amostras biológicas, cuja identificação não foi possível pelo CHROMagar) foram empregados os *primers* universais para fungos, ITS5 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990).

O perfil de termociclagem aplicado foi padronizado conforme instruções do fabricante da DNA Polimerase (desnaturação inicial 95°C/1-3min; 35 ciclos de desnaturação a 95°C/30seg; anelamento dos primers a 55°C/30seg e extensão a 72°C/1min/kb; extensão final a 72°C/5-15min). Todos os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% acrescido de brometo de etídio. Utilizou-se marcador de tamanho molecular de 1Kb (Promega). Os *amplicons* da região ITS foram purificados em coluna GFX (Kit purificação GFX PCR DNA e Gel Band - GEHealthcare), quantificados por eletroforese em gel de agarose no NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific) e submetidos ao sequenciamento na Coreia (pela Macrogen).

#### **4.5 Teste de susceptibilidade aos antifúngicos para o complexo *Candida parapsilosis***

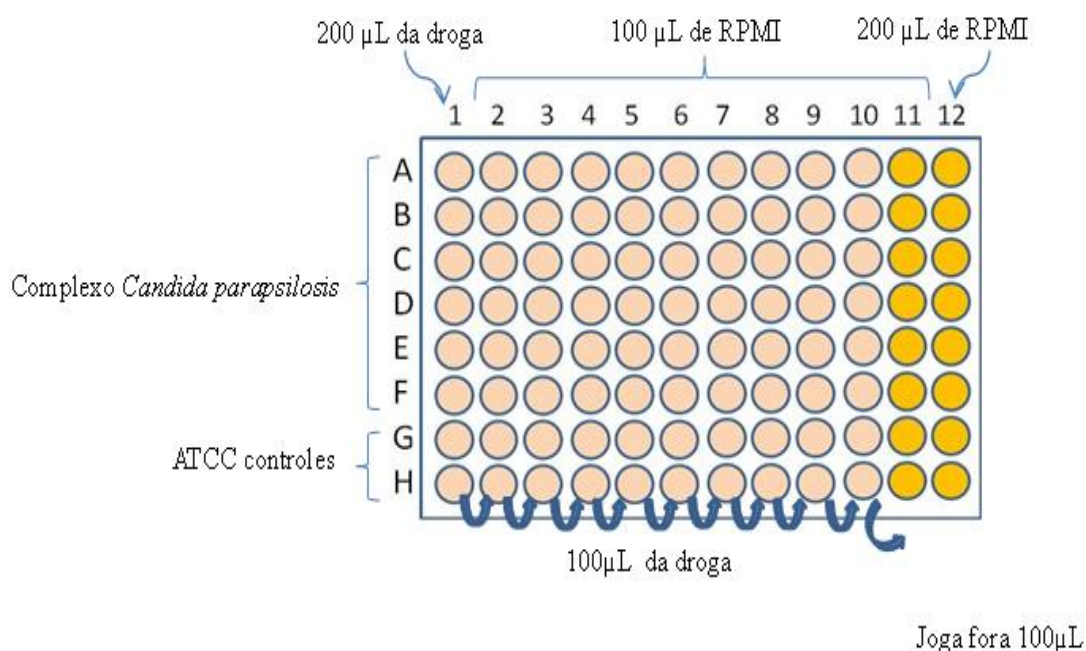
A atividade antimicrobiana foi avaliada frente às diluições seriadas para os antifúngicos anfotericina B (0,0313-16 µg/mL), 5-fluorocitosina (0.125-64 µg/mL) e Itraconazol (0.0313-16 µg/mL) (todos da Sigma-Aldrich) em meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA). A concentração inibitória mínima (*minimum inhibitory concentrations – MICs*) das leveduras frente aos antifúngicos foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo padronizada pelo documento M27-A3 e M27-S4 do *Clinical And Laboratory Standards Institute – CLSI* (CLSI, 2008, 2012).

A potência da concentração desejada da solução estoque do antifúngico foi expressa em µg/mL. O itraconazol foi diluído em DMSO (concentração final de 1600µg/mL), a 5-fluorocitosina em água milli-q estéril (concentração final de 640µg/mL), e a anfotericina B já estava em solução a 250µg/mL. A solução estoque dos antifúngicos foram aliquotadas em microtubo e armazenadas no freezer a -80°C, até a preparação das placas de microdiluição.

Os antifúngicos foram distribuídos em microplacas, pipetando-se 100µL das diluições, começando da maior concentração para a menor. A Figura 4 ilustra a distribuição dos antifúngicos nas microplacas. Após esse procedimento, as microplacas foram cobertas com parafilm® e armazenadas no freezer a -80°C por até seis meses.

O inóculo foi preparado suspendendo-se de uma a cinco colônias, após 24h de crescimento em Agar Sabouraud Dextrose a 35°C, em 5mL de salina (0,85% de NaCl) estéril. A suspensão foi homogeneizada no vórtex e ajustada a turbidez para a escala 0,5 de McFarland que corresponde a  $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$  células/mL. A partir da escala realizou-se uma nova diluição na proporção 1:10 em meio RPMI com posterior agitação no vórtex. A concentração final dessa suspensão para todas as amostras ficou dentro da faixa esperada de  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  células/mL.

A suspensão das leveduras do complexo *C. parapsilosis* foi distribuída nas linhas verticais (1 a 11) da microplaca, na linha doze foi adicionado o meio RPMI, considerado controle negativo. Em seguida as microplacas foram incubadas por 48 horas a 35°C. Como controle de qualidade e reprodutibilidade dos testes, foram incluídas as cepas *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, distribuídas nas linhas horizontais G e H. A Figura 4 ilustra a distribuição.



**Figura 4** - Distribuição do antifúngico e inóculo para o teste de microdiluição em caldo, destinado à determinação da suscetibilidade de leveduras, segundo o documento M27-S3 e M27-S4, CLSI (2008; 2012).

A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada após 24h e 48h de incubação para anfotericina B e itraconazol, conforme o CLSI - M27 S3 (2008) e 48h para 5-fluorocitosina, de acordo com CLSI - M27 S4 (2012). A presença ou ausência de crescimento das leveduras em cada poço da placa foi avaliada por meio de leitura visual, a partir do poço de maior número para o de menor número de turbidez. A interpretação dos resultados baseada na leitura visual estabeleceu o *score* (pontuação), sendo esse classificado de 0 a 4, como mostra a tabela 2.

**Tabela 2** - A interpretação da concentração inibitória mínima (CIM) baseada na leitura visual.

<b>Score</b>	<b>Interpretação</b>
0	opicamente claro
1	crescimento indefinido
2	redução proeminente de crescimento
3	ligeira redução do crescimento
4	nenhuma redução de crescimento

Para a anfotericina B, a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração do antifúngico capaz de inibir totalmente (100%) o crescimento da levedura. Para o itraconazol e a 5-fluorocitosina a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração do antifúngico capaz de inibir parcialmente (50%) o crescimento da levedura. A tabela 3 ilustra os pontos de corte (breakpoints) da CIM estabelecida pelo CLSI - M27-S3 (2008) e M27-S4 (2012) para as cepas de referência.

**Tabela 3** - Variação das espécies de referência recomendada pelo CLSI M27 S3 (2008) e CLSI M27- S4 (2012), segundo concentração inibitória mínima (CIM).

<b>CIM (<math>\mu\text{g/mL}</math>) 24 horas de Incubação</b>			
<b>Espécie</b>	<b>Anfotericina B</b>	<b>Itraconazol</b>	<b>5-fluorocitosina</b>
<i>Candida parapsilosis</i>	0,25-2,0	0,06-0,5	0,06-0,25
<i>Candida krusei</i>	0,5-2,0	0,12-1,0	4,0-16
<b>CIM (<math>\mu\text{g/mL}</math>) 48 horas de Incubação</b>			
<b>Espécie</b>	<b>Anfotericina B</b>	<b>Itraconazol</b>	<b>5-fluocitosina</b>
<i>Candida parapsilosis</i>	0,5-4,0	0,06-0,5	0,12-0,5
<i>Candida krusei</i>	1,0-4,0	0,25-1,0	8,0-32

## 5. RESULTADOS

Um total de 163 isolados de *Candida* de amostras clínicas e 24 () isolados de mãos e boca de profissionais da saúde, de um total de 196 amostras coletadas, foram obtidos neste trabalho. A maioria das amostras clínicas foram previamente identificadas pelo Vitek ou Chromagar e a maioria das amostras dos profissionais foram identificadas pelo sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 ou Chromagar. O PCR do *intein* VMA foi usado para diferenciar as espécies do complexo *C. parapsilosis*. A Tabela 4 engloba a identificação de todas as amostras obtidas durante a execução deste trabalho e a tabela 5 mostra a similaridade das sequencias da região ITS1-5.8S-ITS2 obtidas neste trabalho com sequencias da base de dados GenBank, após a realização do *Blastn*.

**Tabela 4** – Identificação das espécies de *Candida* por PCR ITS5, PCR *intein* VMA, CHROMagar *Candida* e Vitek 2, das amostras dos profissionais de saúde e amostras clínicas.

Fonte de isolamento	Designação	Vitek 2 (Biomereux)	CHROMagar	Sequenciamento ITS	PCR <i>Intein</i> VMA
	SPL533	<i>C. glabrata</i>	NR	NR	NR
	SPL548	<i>C. glabrata</i>	NR	NR	NR
	SPL067	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
	SPL613	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
	SPL181	<i>C. glabrata</i>	NR	NR	NR
	SPL190	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	SPL068	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	SPL899	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	SPL107	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
	SPL526	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
	SOL116	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	PCL156	NR	Inconclusivo	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
	PCP305	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	PCP472	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	PCP478	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	PCP593	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	PCP527	<i>C. famata</i>	NR	NR	NR
Amostra Clínica	SGCP895	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	SGCP865	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
	LBCP396	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	LBCP334	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	LBCP758	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	LBCP213	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	LBCP282	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	RUCP863	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
	RUCP786	<i>C. guilliermondii</i>	NR	NR	NR
	RUCP697	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	RUCP180	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. metapsilosis</i>
	RUCP351	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	SVCP210	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	SVCP636	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	SVCP097	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	SVCP178	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
	SVCP154	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
	SVCP278	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR

SACP687	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
ECP972	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
ECP176	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
ECP089	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
ECP470	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
PGCP385	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
FCP524	<i>C. krusei</i>	NR	NR	NR
FCP082	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
MCP933	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
MCP326	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
SFCP817	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
PECP395	<i>C. krusei</i>	NR	NR	NR
PDCP385	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
ATCP343	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
ATCP804	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
ATCP609	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
ATCP874	<i>C. pelliculosa</i>	NR	NR	NR
ATL400	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. metapsilosis</i>
ATL899	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
ATCP587	<i>C. glabrata</i>	NR	NR	NR
ATCP8609	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
ATCP159	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
ATCP9811	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
FUCP450	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
FUCP983	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
FUCP894	<i>C. guilliermondii</i>	NR	NR	NR
HL328	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
HL401	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. metapsilosis</i>
HL442	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
HL272	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
HL500	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. orthopsilosis</i>
HL183	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
HL191	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
HL940	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. orthopsilosis</i>
HL303	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
HL939	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. orthopsilosis</i>
HL891	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. metapsilosis</i>
HL001	NR	Inconclusivo	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
HL260	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
HL196	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. metapsilosis</i>
HL495	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HL289	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HL921	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HL304	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HL942	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HL185	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HL181	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HL271	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
HL069	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HL372	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HL512	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
HL101	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
HL227	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HL637	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HL763	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
HL883	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
HL860	<i>C. glabrata</i>	NR	NR	NR
HL103	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HL324	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
HL956	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HL971	<i>C. famata</i>	NR	NR	NR
HL086	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
HCP326	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HCP463	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
HCP709	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
HCP461	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
HCP326	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
LCL852	<i>C. stephanoascus</i>	NR	NR	NR

LCL087	<i>C. guilliermondii</i>	NR	NR	NR
UL310	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL198	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
UL334	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL337	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL336	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
UL4079	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
UL047	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
UL081	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL079	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL009	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL008	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL027	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
UL179	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
UL090	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL188	NR	Inconclusivo	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
UL202	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL203	<i>C. krusei</i>	NR	NR	NR
UL105	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL146	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL184	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL294	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL782	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL295	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL774	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
UL843	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL227	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL057	<i>C. glabrata</i>	NR	NR	NR
UL388	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL160	<i>C. glabrata</i>	NR	NR	NR
UL491	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL286	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UL269	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
UCP536	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP252	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP770	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
UCP432	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
UCP084	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP354	<i>C. glabrata</i>	NR	NR	NR
UCP059	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP428	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP055	<i>C. glabrata</i>	NR	NR	NR
UCP311	<i>C. parapsilosis</i>	Inconclusivo	NR	<i>C. metapsilosis</i>
UCP935	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP526	<i>C. glabrata</i>	NR	NR	NR
UCP843	<i>C. glabrata</i>	NR	NR	NR
UCP866	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP363	<i>C. krusei</i>	NR	NR	NR
UCP330	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP671	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP123	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP5123	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP452	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP938	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP874	<i>C. pelliculosa</i>	NR	NR	NR
UCP762	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP997	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP106	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR	NR
UCP707	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
UCP152	<i>C. albicans</i>	NR	NR	NR
SGUG9	NR	<i>C. albicans</i>	NR	NR
SGUG15	NR	Inconclusivo	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
SGUG27	NR	Inconclusivo	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
SGUG43	NR	Inconclusivo	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
SGUG55	NR	Inconclusivo	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
SGUG61	NR	Inconclusivo	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
SGUG67	NR	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR
SWUG13	NR	Inconclusivo	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>

Mãos de profissionais

	SWUP9	NR	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR
	SWUP47	NR	<i>C. tropicalis</i>	NR	NR
	SGUG16	NR	<i>C. albicans</i>	NR	NR
	SGUG20	NR	<i>C. albicans</i>	NR	NR
	SGUG56	NR	Inconclusivo	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
	SGUG58	NR	Inconclusivo	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>
	SGUG62	NR	<i>C. albicans</i>	NR	NR
	SGUG68	NR	<i>C. albicans</i>	NR	NR
Boca de profissionais	SWUP26	NR	<i>C. glabrata</i>	NR	NR
	SWUP44	NR	<i>C. albicans</i>	NR	NR
	SWUP48	NR	<i>C. glabrata</i>	NR	NR
	SWUG14	NR	<i>C. albicans</i>	NR	NR
	SWUG20	NR	Inconclusivo	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
	SWUG40	NR	<i>C. albicans</i>	NR	NR
	SWUG50	NR	<i>C. albicans</i>	NR	NR
	SWUG56	NR	<i>C. albicans</i>	NR	NR

\**C. albicans* (verde), *C. tropicalis* (azul), Inconclusivo (lilás/rosa clara/branca), *C. krusei* (rosa cintilante), *C. glabrata* (roxo).

Sequenciamento Inconclusivo: sobreposição de picos no eletroferograma.

NR (não realizado); SPL (secreção purulenta LACEN), SOL (secreção ocular LACEN), PCL (ponta de cateter LACEN), PCP (ponta de cateter CPC), SGCP (secreção de gastrostomia CPC), LBCP (lavado broncoalveolar CPC), RUCP (raspado de unha CPC), SVCP (secreção vaginal CPC), SACP (secreção abdominal), ECP (escarro CPC), PGCP (perigastrostomia CPC), FCP (fezes CPC), MCP (mão CPC), SFCP (secreção de fístula CPC), PECP (pé esquerdo CPC), PDCP (pé direito CPC), ATCP (aspirado traqueal CPC) ATL (aspirado traqueal LACEN), FUCP (fragmento de úlcera CPC), HL (hemocultura LACEN), HCP (hemocultura CPC), LCL (líquido cefalorraquidiano LACEN), UL (urina LACEN), UCP (urina CPC). SGUG (swab Giselda UTI geral), SWUP (swab Walfredo UTI pediátrica), SWUG (swab Walfredo UTI geral).

**Tabela 5:** Similaridade das sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 com sequências depositadas na base de dados do GenBank, após a realização do *Blastn*.

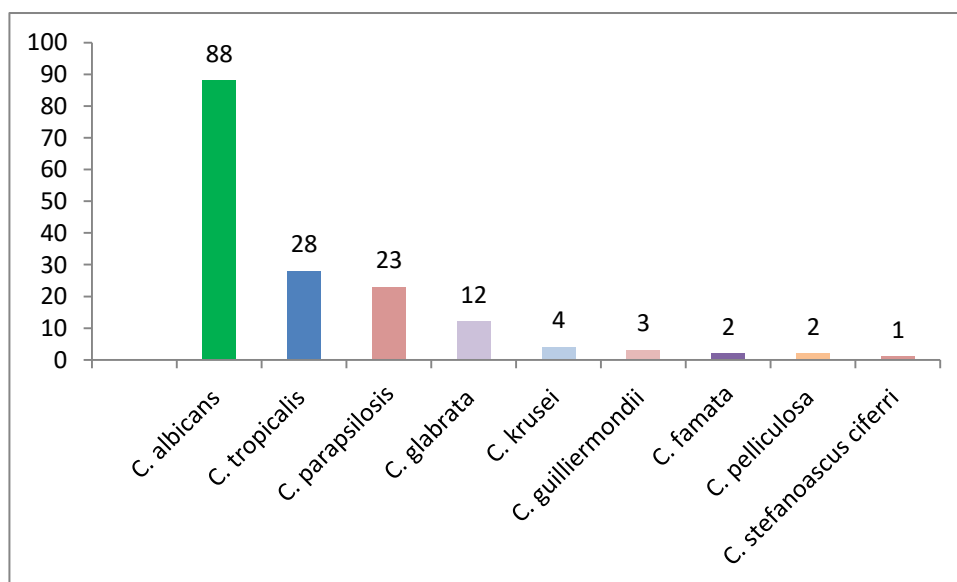
Amostra/número de depósito no Genbank	Espécie e Sequência do Genbank	% identidade	e-value	(nt)
PCL156/ KY560339	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i> (KJ734198.1)	99%	0.0	460
HL001/ KY560329	<i>C. orthopsilosis</i> (KY102274.1)	98%	0.0	406
SWUG13 KY560327	<i>C. orthopsilosis</i> (KY102272.1)	95%	4e-179	409
SGUG61/ KY560330	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i> (KJ734198.1)	98%	0.0	451
SGUG56/ KY560331	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i> (KX958046.1)	97%	0.0	425
SGUG55/ KY560332	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i> (KJ734198.1)	99%	0.0	425
SGUG27/ KY560333	<i>C. metapsilosis</i> (KX421284.1)	94%	5e-178	421
UL188/ KY560328	<i>C. orthopsilosis</i> (KU665255.1)	97%	0.0	456
UL053/ KY560334	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i> (KJ734198.1)	98%	0.0	421
SGUG58/ KY560335	<i>C. metapsilosis</i> (KP674707.1)	97%	0.0	455
SGUG43/ KY560336	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i> (KJ734198.1)	98%	0.0	421

SGUG15/ KY560337	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i> (KJ734198.1)	99%	0.0	455
SWUG20/ KY56 0338	<i>C. orthopsilosis</i> (KY102274.1)	94%	1e-149	490

nt = Tamanho da sequência avaliado (número de nucleotídeos)

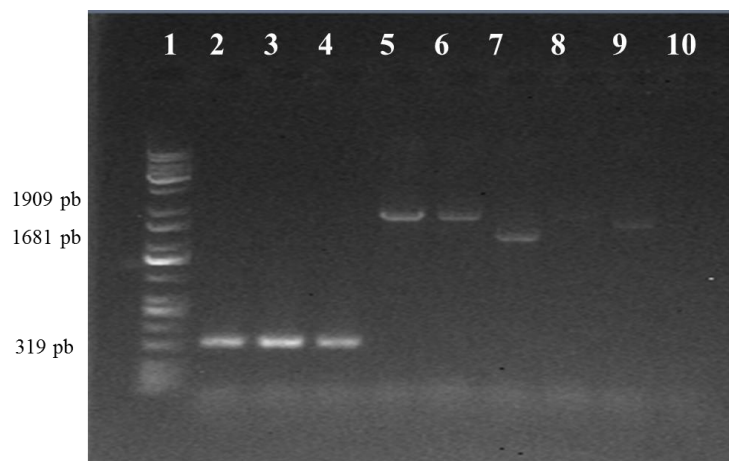
### 5.1 Amostras de *Candida* spp. isoladas de amostras clínicas

Das 163 amostras clínicas, apenas para PCL156 e UL188 a identificação pelo Vitek-2 não foi realizada, sendo identificadas por sequenciamento da região ITS1-5.8S e ITS2 e pelo PCR do *intein* VMA como *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis*. Dentre as espécies mais prevalentes destacam-se *C. albicans* (54%), *C. tropicalis* (17%) e espécies do complexo *C. parapsilosis* (14%) e *C. glabrata* (7%) (Figura 5).



**Figura 5** – Distribuição das *Candida* spp. identificadas nos pacientes pelo LACEN e CPC.

Dentre as 23 espécies do complexo *C. parapsilosis*, o tamanho do produto do PCR do *intein* VMA mostrou que 12 (52%) eram *C. parapsilosis stricto sensu*, 6 (26%) *C. metapsilosis* e 5 (22%) *C. orthopsilosis* (Tabelas 4 e 6). A figura 6 ilustra o tamanho dos produtos da amplificação do *intein* VMA para cada espécie do complexo.



**Figura 6** - Produtos da amplificação do intein VMA para cada espécie do complexo no gel de agarose. 1: Marcador molecular , 2: HL 183 - *C. parapsilosis stricto sensu* (sem o intein), 3: HL 191 - *C. parapsilosis stricto sensu* (sem o intein), 4: HL 303 - *C. parapsilosis stricto sensu* (sem o intein), 5: HL 939 - *C. orthopsilosis*, 6: HL 940 - *C. orthopsilosis*, 7: HL 891 - *C. metapsilosis*, 8: ATCC 96141 - *C. orthopsilosis* (C+), 9: ATCC 96143 - *C. metapsilosis* (C+), 10: Controle negativo.

As coletas das amostras dos pacientes, provenientes do LACEN e CPC, foram realizadas em sítios anatômicos diversos. A tabela 6 mostra a quais sítios anatômicos estavam associados cada espécie de *Candida* isolada. Observou-se que o maior número de amostras foi de urina e hemoculturas, com maior prevalência de *C. albicans*, seguida de *C. tropicalis*, complexo *C. parapsilosis* e *C. glabrata*.

**Tabela 6** – Número de isolados de *Candida* spp. proveniente do LACEN-RN e CPC por sítio anatômico ou material de coleta.

Espécie	SP	PC	SO	SG	RU	LBA	SV	SA	E	PG	F	M	SF	P	AT	FU	H	U	LCR	Total
<i>C. albicans</i>	3	4	1	1	2	5	5	1	4	1	1	2	1	-	4	1	16	36	-	88
<i>C. tropicalis</i>	3	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	3	1	7	11	-	28
<i>C. parapsilosis</i>	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	12
<i>C. metapsilosis</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	3	1	-	6
<i>C. orthopsilosis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	5
<i>C. glabrata</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	7	-	-	12
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	2	-	4
<i>C. guilliermondii</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	3
<i>C. famata</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2
<i>C. pelliculosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	2
<i>C. stefanoascus ciferri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<b>Total</b>	10	6	1	2	5	5	6	1	4	1	2	2	1	2	10	3	41	59	2	163

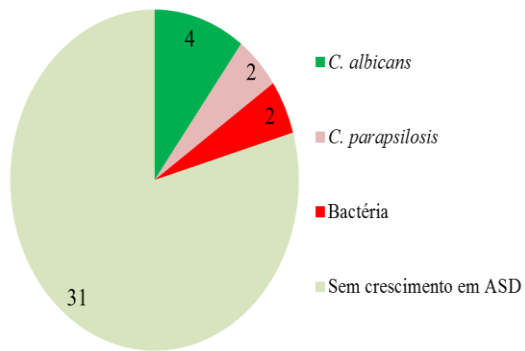
SP = Secreção purulenta, PC = Ponta de cateter, SO = Secreção ocular, SG = Secreção de gastrostomia, RU = Raspado de unha, LBA = Lavado broncoalveolar, SV = Secreção vaginal, SA = Secreção abdominal, E = Escarro, PG = Perigastrostomia, F = Fezes, M = Mão, SF = Secreção de fístula, P = Pé, AT = Aspirado traqueal, FU = Fragmento de úlcera, H = Hemocultura, U = Urocultura, LCR = Líquido cefalorraquidiano.

## 5.2 *Candida* spp. isoladas de amostras de profissionais da saúde

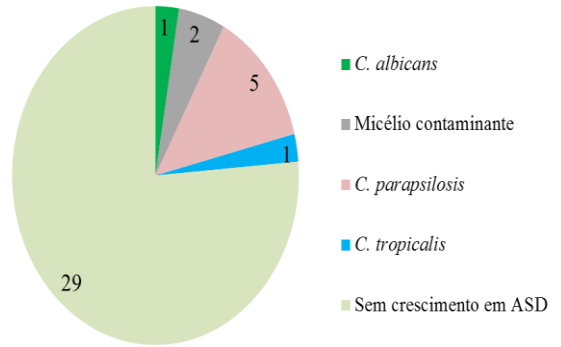
Foram realizadas 196 coletas de amostras biológicas com swab dos profissionais de saúde da UTI Geral do Hospital Giselda Trigueiro e UTI Geral e Pediátrica do Hospital Monsenhor Walfredo Gurgel, no período de agosto de 2015 a agosto de 2016, sendo 98 amostras das mãos e 98 da boca dos profissionais. Destas amostras, 144 (74%) não apresentaram crescimento em Sabouraud-dextrose acrescido de cloranfenicol durante o período de avaliação (15 dias), 23 (12%) das amostras apresentaram micélio contaminante, 10 (5%) *C. albicans*, 6 (3%) *C. parapsilosis*, 3 (2%) *C. tropicalis*, 3 (2%) bactérias, 2 (1%) *C. orthopsilosis*, 2 (1%) *C. glabrata*, 1 (1%) *C. metapsilosis*, 1 (1%) levedura preta e 1 (1%) levedura *Rhodotorula* spp.

Na Figura 7 estes resultados são apresentados separadamente para cada Hospital e UTI de coleta, mostrando que não há diferenças marcantes entre os isolados de *Candida* das diferentes UTIs, com exceção apenas de *C. parapsilosis* isolada de mãos, que foi observada apenas nos profissionais do HGT. *C. albicans* foi à espécie de levedura mais isolada em boca (64% de todas as espécies de *Candida* isoladas), enquanto *C. parapsilosis* seguida de *C. tropicalis* (60 e 30% respectivamente) foram as espécies de *Candida* mais frequentes em mãos (Figura 8).

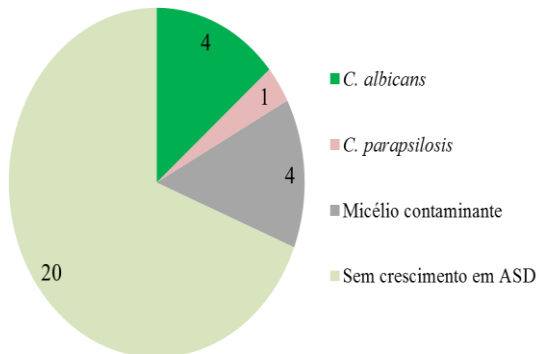
SWAB boca UTI geral dos profissionais de saúde do HGT



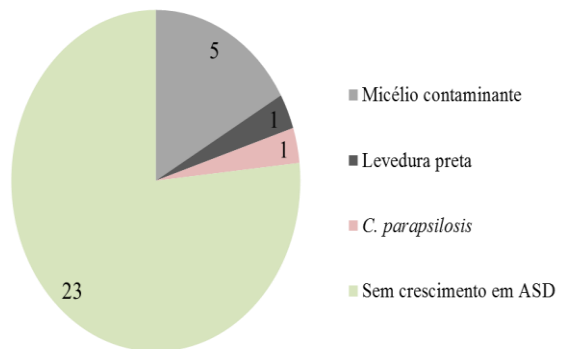
SWAB mãos UTI geral dos profissionais de saúde do HGT



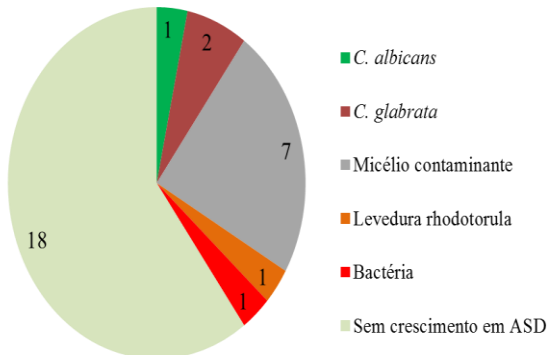
SWAB boca UTI geral dos profissionais de saúde do HMWG



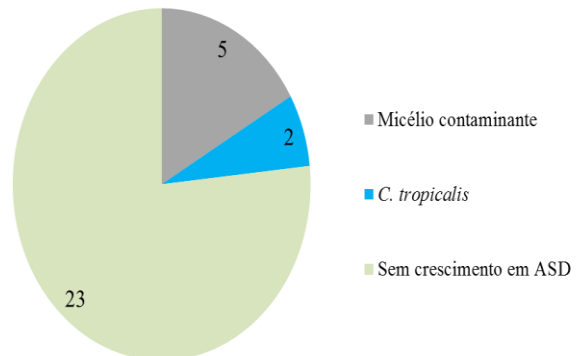
SWAB mãos UTI geral dos profissionais de saúde do HMWG



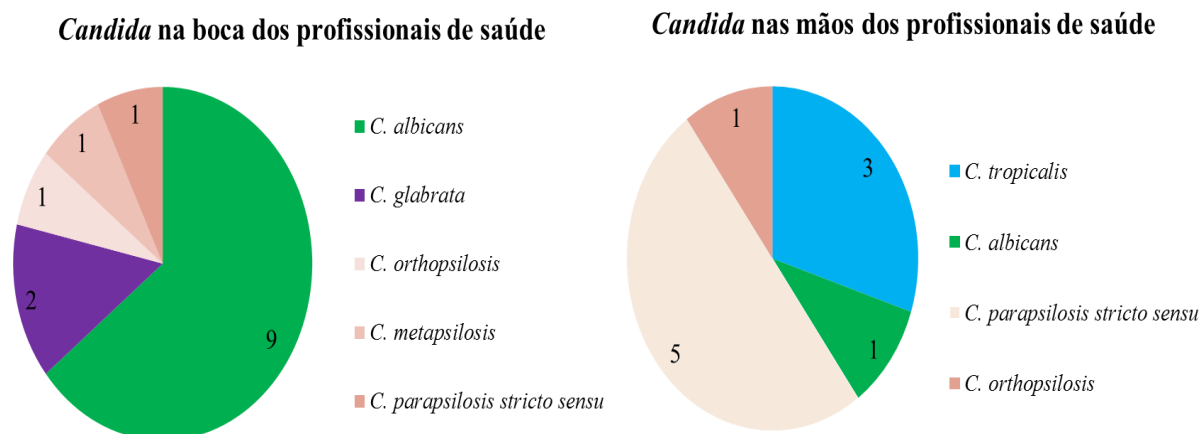
SWAB boca UTI pediátrica dos profissionais de saúde do HMWG



SWAB mãos UTI pediátrica dos profissionais de saúde do HMWG



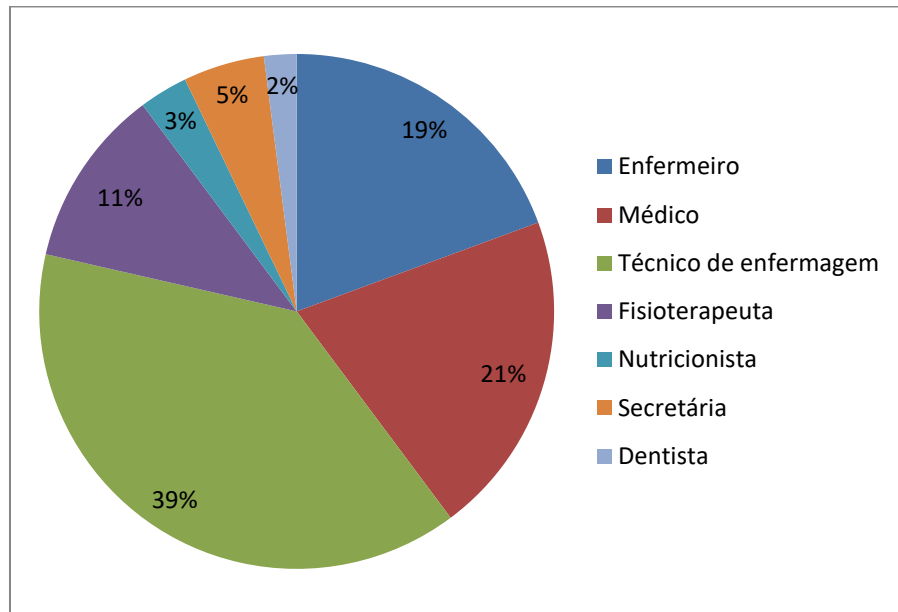
**Figura 7** - Patógenos identificados em culturas de swab de mão e boca dos profissionais de saúde das UTI's do HGT e HMWG.



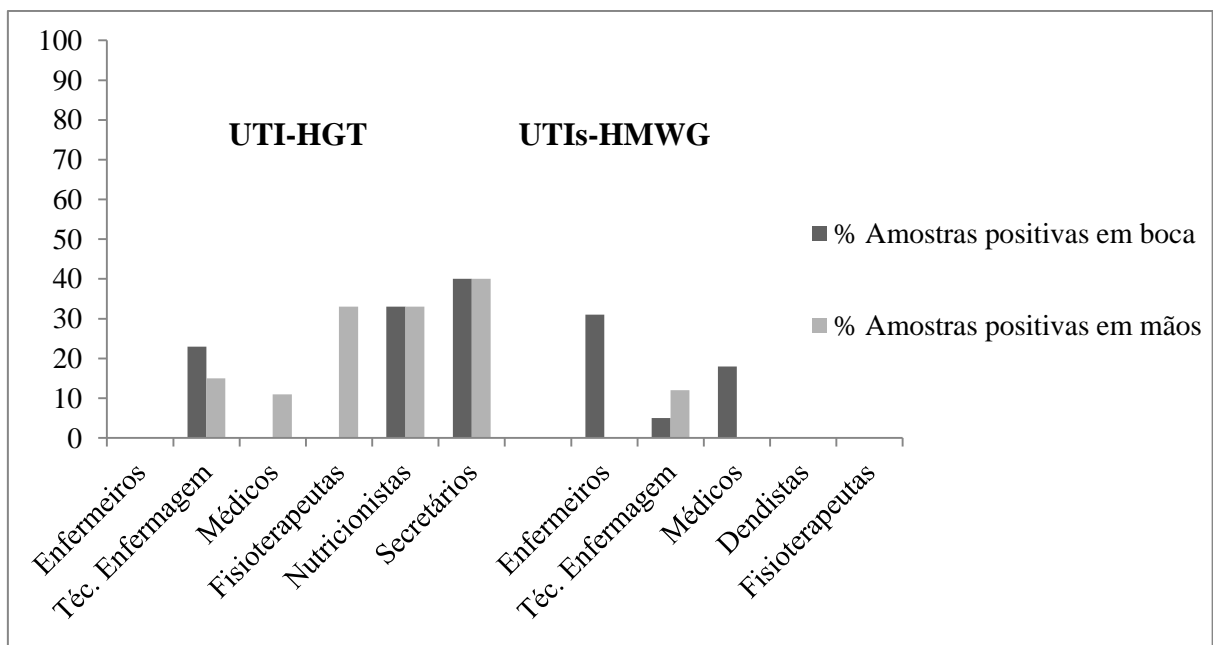
**Figura 8** – Distribuição dos patógenos identificados em culturas de swab de mão e boca dos profissionais de saúde das UTI's do HGT e HMWG.

Estes patógenos foram identificados pelo método CHROMagar *Candida* (Difco) e alternativamente pelo sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 e comparação com banco de dados do GenBank, via blastn, realizando a confirmação das espécies do complexo *C. parapsilosis* através do PCR do *intein* VMA (tabela 4).

Dentre os profissionais que participaram da pesquisa, conforme ilustrado na Figura 9, houve maior participação de técnicos de enfermagem e médicos, 39% e 21% respectivamente. Apenas em 24 das 196 amostras (mão e boca de 98 profissionais) se observou o crescimento de leveduras do gênero *Candida*. Cepas de *Candida* foram isoladas de amostras de enfermeiros (1/26 do HMWG), de médicos (1/18 do HGT e 2/22 do HMWG), de fisioterapeutas (1/6 do HGT), de nutricionistas (2/6 do HGT), de técnicos de enfermagem (5/26 no HGT e 8/50 no HMWG) e em secretários (4/10 do HGT) (Figura 10). Na tabela 7 estão descritas as espécies de *Candida* encontradas nas amostras de mãos e boca dos diferentes profissionais nas UTIs de ambos os hospitais.



**Figura 9** – Distribuição dos profissionais de saúde que participaram da pesquisa nos hospitais HGT e HMWG.



**Figura 10** – Amostras de mãos e mucosa bucal de diferentes profissionais da saúde, das UTIs dos Hospitais HGT e HMWG de Natal/RN com crescimento de *Candida spp.*

**Tabela 7** – Espécies de *Candida* encontradas nas amostras de mãos e boca dos profissionais das UTIs dos Hospitais HGT e HMWG de Natal/RN.

Espécies / sítio de coleta	UTI - HGT								UTIs Geral e Pediátrica - HMWG								Total de amostras *														
	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. metapsilosis</i>		<i>C. orthopsilosis</i>		<i>C. parapsilosis</i>		Total de amostras *																
	M	B	M	B	M	B	M	B	M	B	M	B	M	B																	
Profissionais	M	B	M	B	M	B	M	B	M	B	M	B	M	B	M	B	Total de amostras *														
Enfermeiros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	26												
Médicos	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22												
Fisioterapeutas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	16												
Nutricionistas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	-	-	-	-	-	-	0												
Dentistas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	4												
Téc. Enfermagem	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	50												
Secretários	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	-	-	-	-	-	-	0												
Número de isolados de cada espécie de <i>Candida</i> em cada hospital	5		0		1		0		1		0		6		78		5		2		2		0		0		2		0		118

\* Para cada profissional foram obtidas duas amostras (uma de mão e a outra de boca)

M = mão, B= boca.

UTI HGT = UTI geral do Hospital Giselda Trigueiro.

UTIs HMWG = UTIs geral e pediátrica do Hospital Monsenhor Walfredo Gurgel

### 5.3 Comparação da susceptibilidade a antifúngicos das espécies do complexo *C. parapsilosis* isoladas neste estudo

Na tabela 8 são descritos os valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos, 5-Fluorocitosina, anfotericina B e itraconazol, testados frente a todas as 32 amostras do complexo *C. parapsilosis* obtidas neste estudo, bem como para as cepas ATCC (controle de qualidade).

Todos os isolados se mostraram sensíveis a anfotericina B e a 5- Fluorocitosina, sendo que cerca de 31% das *C. parapsilosis* também se mostraram sensíveis ao itraconazol e as demais (69%) sensíveis dose-dependentes. Cerca de 28% das *C. metapsilosis* também se mostraram sensíveis ao itraconazol e as demais (72%) sensíveis dose-dependentes. Enquanto em *C. orthopsilosis* 80% foram sensíveis ao itraconazol e as demais (20%) sensíveis dose-dependentes. Nenhum isolado apresentou resistência aos antifúngicos testados. Aparentemente, segundo as médias geométricas para os CIM de 24 e 48h, os isolados das

diferentes espécies do complexo *C. parapsilosis*, aqui estudados, não apresentaram diferenças marcantes quanto ao perfil de susceptibilidade aos antifúngicos testados.

**Tabela 8** – CIM dos antifúngicos testados para isolados do complexo *C. parapsilosis*.

Isolado	Espécie	MIC (µg/ml)						Sensível Nº (%)	SDD Nº (%)
		ANF (1)		5-FLU (2)		ITRA (3)			
		24h	48h	24h	48h	24h	48h		
HL328	<i>parapsilosis</i>	0,5	1,0	0,06	0,25	0,06	0,125	1,2,3	-
HL272	<i>parapsilosis</i>	0,5	1,0	0,03	0,5	0,25	0,25	1,2	3
HL500	<i>parapsilosis</i>	1,0	0,5	0,03	0,25	0,25	0,5	1,2	3
HL183	<i>parapsilosis</i>	0,5	1,0	0,03	0,5	0,125	0,25	1,2	3
HL191	<i>parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,06	0,25	0,25	0,25	1,2	3
HL303	<i>parapsilosis</i>	1,0	0,5	0,125	0,5	0,25	0,5	1,2	3
HL260	<i>parapsilosis</i>	1,0	1,0	0,25	0,5	0,125	0,25	1,2	3
HL763	<i>parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,25	0,5	0,06	0,5	1,2	3
HL442	<i>parapsilosis</i>	0,25	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5	1,2	3
HCP461	<i>parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,06	0,25	0,06	0,06	1,2,3	-
RUCP863	<i>parapsilosis</i>	0,5	1,0	0,5	0,5	0,125	0,5	1,2	3
PCL156	<i>parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,125	0,25	0,125	0,25	1,2	3
SPL526	<i>parapsilosis</i>	0,25	0,5	0,125	0,25	0,03	0,03	1,2,3	-
SGUG61	<i>parapsilosis</i>	0,25	0,5	0,125	0,5	0,03	0,03	1,2,3	-
SGUG56	<i>parapsilosis</i>	0,25	0,5	0,125	0,25	0,03	0,03	1,2,3	-
SGUG55	<i>parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,125	0,25	0,03	0,03	1,2,3	-
SGUG43	<i>parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,125	0,5	0,125	0,5	1,2	3
SGUG15	<i>parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,25	0,25	0,06	0,25	1,2	3
N= 18	Média geométrica MIC (µg/ml)	0,46	0,6	0,11	0,33	0,11	0,18		
HL891	<i>metapsilosis</i>	1,0	1,0	0,125	0,5	0,25	0,25	1,2	3
HL196	<i>metapsilosis</i>	0,5	0,25	1,0	2,0	0,06	0,25	1,2	3
HL401	<i>metapsilosis</i>	0,25	0,5	0,25	0,5	0,125	0,25	1,2	3
RUCP180	<i>metapsilosis</i>	0,25	1,0	0,25	0,25	0,125	0,25	1,2	3
UCP311	<i>metapsilosis</i>	0,5	0,25	0,25	0,25	0,125	0,25	1,2	3
ATL400	<i>metapsilosis</i>	0,5	0,5	0,125	0,25	0,06	0,125	1,2,3	-

SGUG58	<i>metapsilosis</i>	0,5	0,5	0,125	0,125	0,125	0,25	1,2	3
SGUG27	<i>metapsilosis</i>	1,0	1,0	0,06	0,25	0,06	0,06	1,2,3	-
<hr/>									
N = 8	Média geométrica MIC (µg/ml)	0,55	0,5	0,18	0,37	0,10	0,18		
<hr/>									
HL940	<i>orthopsilosis</i>	0,5	0,5	0,06	0,25	0,25	0,25	1,2	3
HL001	<i>orthopsilosis</i>	0,5	0,5	0,125	0,25	0,06	0,06	1,2,3	-
HL939	<i>orthopsilosis</i>	0,5	0,5	0,25	0,5	0,06	0,125	1,2,3	-
UL188	<i>orthopsilosis</i>	0,5	0,5	0,125	0,5	0,06	0,06	1,2,3	-
SWUG13	<i>orthopsilosis</i>	0,5	0,5	0,125	0,5	0,06	0,06	1,2,3	-
SWUG20	<i>orthopsilosis</i>	0,5	0,5	0,25	0,25	0,06	0,25	1,2	3
<hr/>									
N = 6	Média geométrica MIC (µg/ml)	0,5	0,5	0,15	0,30	0,09	0,15		
<hr/>									
ATCC 22019	<i>parapsilosis</i>	0,5	1,0	0,25	1,0	0,06	0,125	1,2,3	-
ATCC 6258	<i>krusei</i>	0,5	1,0	1,6	1,6	0,5	0,5	1	2,3

ANF (1) - Anfotericina B, 5-FLU (2) - 5-Fluocitosina, ITRA (3) – Itraconazol. SDD – Sensível Dose Dependente. CIM – Concentração Inibitória Mínima. HL191 – Hemocultura LACEN, HCP461 – Hemocultura Centro de Patologia Clínica, RUCP180 – Raspado de Unha Centro de Patologia Clínica, PCL156 – Perigastrostomia Centro de Patologia Clínica, SPL526 – Secreção Purulenta LACEN, SGUG61 – Swab Giselda UTI Geral, UCP311 – Urina Centro de Patologia Clínica, ATL400 – Aspirado Traqueal LACEN, SWUG20 – Swab Walfredo UTI Geral.

## 6. DISCUSSÃO

As infecções por leveduras do gênero *Candida* constituem um problema crescente de saúde pública, sendo mais comum em pacientes hospitalizados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (SILVA *et al.*, 2014). *C. albicans* ainda é a principal espécie isolada em humanos, no entanto outras espécies como *C. tropicalis* e complexo *C. parapsilosis* tem surgido como patógenos emergentes preocupantes em infecções (YAPAR, 2014). Neste trabalho foi realizado pela primeira vez um estudo comparativo da ocorrência das diferentes espécies de *Candida* em isolados de amostras clínicas e de mãos e boca de profissionais da saúde em Hospitais da cidade do Natal/RN, Brasil.

*C. albicans* foi à espécie mais frequente em todos os tipos de amostras biológicas do nosso estudo, corroborando inúmeros trabalhos epidemiológicos nacionais e internacionais. Isto é de certa forma esperado, uma vez que esta levedura faz parte da microbiota humana, de alguns animais e também de nichos ambientais diversos, em situação de comensalismo, tornando-se patogênico ao haver desequilíbrio no organismo do hospedeiro que favoreça o seu desenvolvimento (FORNARI *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2013; PEIXOTO *et al.*, 2014; GUINEA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014; JESUS *et al.*, 2015).

A segunda espécie de *Candida* mais frequente nos isolados clínicos foi *C. tropicalis*, sobretudo em amostras de urina, observando-se também nessas amostras a presença de *C. glabrata* e *C. krusei*, as quais segundo Silva *et al.* (2014), são comuns nas infecções fúngicas urinárias hospitalares.

As espécies do complexo *C. parapsilosis* se apresentaram como a terceira mais prevalente dentre todas as amostras clínicas dos pacientes, sendo identificadas em isolados de raspado de unha, ponta de cateter, secreção purulenta, aspirado traqueal, urina e hemocultura, com maior incidência nas hemoculturas (segunda espécie mais frequente, após *C. albicans*), visto que estas espécies são descritas como predominantes em infecções da corrente sanguínea, e aquelas relacionadas a cateter venoso central, ventilação mecânica, sondagem e alimentação parenteral, inclusive em pacientes internados em UTI (PAMMI *et al.* 2014; BARBEDO *et al.*, 2016). Dentre as três espécies do complexo, *C. parapsilosis stricto sensu* foi a mais predominante, seguida de *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* corroborando outros estudos, nos quais a incidência

de *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* não ultrapassa a taxa de 10% das infecções pelo complexo (GOMEZ-LOPEZ *et al.*, 2008, SILVA *et al.*, 2009). Este fato está associado à baixa virulência das outras duas espécies quando comparadas a *C. parapsilosis stricto sensu* (BARBEDO *et al.*, 2016).

As espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e complexo *C. parapsilosis* foram mais incidentes em corrente sanguínea e dispositivos médicos invasivos como cateter e sondas e procedimentos como traqueostomia e lavado broncoalveolar, sendo estas condições apropriadas para o desenvolvimento de candidemias. Tal situação é agravante, uma vez que o índice de mortalidade por candidemia no Brasil é elevado (DOI *et al.*, 2016).

Observa-se que as espécies do complexo *C. parapsilosis* são frequentes causadoras de infecções hospitalares, como também são comuns em mãos de profissionais de saúde, consideradas fonte exógena de infecções nosocomiais, destacando-se a prevalência da espécie *C. parapsilosis stricto sensu* do complexo.

Dentre as espécies de *Candida* isoladas nas amostras de mãos dos profissionais *C. parapsilosis stricto sensu* foi a mais prevalente, seguida de *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis* e *C. albicans*, sendo as duas últimas encontradas em igual frequência. Tal observação pode estar relacionada com o fato de *C. parapsilosis* ser frequentemente associada a infecções nosocomiais. A infecção cruzada de pacientes como resultado do contato direto com os profissionais do hospital é corriqueiro, uma vez que as mãos dos profissionais têm sido documentadas como um reservatório de *Candida* spp. (GUO; YANG; LIANG, 2016). Diferentes motivos podem estar associados a esses achados, como número de profissionais de saúde por paciente, qualificação dos profissionais de saúde, reutilização de material descartável, utilização de sistema aberto de infusão venosa, não lavagem das mãos pelos profissionais ao terminar os procedimentos ou ao manipular outros pacientes, infringindo as práticas tidas como padrão de controle de infecção hospitalar.

Outras espécies como *C. glabrata* e as do complexo *C. parapsilosis* também foram encontradas na mucosa bucal dos colaboradores de saúde das unidades estudadas, porém em menor frequência, dado ao fato dessas espécies serem mais relacionadas ao ambiente e não tão presentes na microbiota normal de humanos (FERREIRA *et al.*, 2013; ALTHAUS *et al.*, 2015). A presença de leveduras colonizando os profissionais da saúde é preocupante, pois podem ser fonte potencial de contaminação de microrganismos por transmissão exógena no ambiente hospitalar, contribuindo para a

ocorrência de infecções nosocomiais (ATAÍDES *et al.*, 2010). Aos participantes desta pesquisa não era solicitada a higienização da boca no momento da coleta, estas foram realizadas em momentos aleatórios, nesse sentido ressaltamos a importância do uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) ao realizarem procedimentos com os pacientes.

Ressaltamos a necessidade da educação permanente desses profissionais, de forma que sejam conscientizados da importância dos equipamentos de proteção individual (EPI) (mascaras, luvas, óculos, jaleco, propés) e da lavagem das mãos como controle da transmissão de infecção cruzada ao realizarem qualquer assistência ao paciente, uma vez que tanto os profissionais como o enfermo estão susceptíveis a desenvolverem infecções no ambiente hospitalar. É necessário que os profissionais de saúde, conheçam a legislação e as orientações pertinentes que regulamentam as atividades profissionais e os aspectos relacionados ao desempenho profissional para promover medidas de proteção e prevenção de agravos à saúde (FERRREIRA; MARTINS, 2015).

Apesar deste estudo não objetivar a comparação entre os métodos de identificação de espécie de *Candida*, na tabela 4 podemos observar a congruência da identificação dos isolados do complexo *C. parapsilosis* entre o Vitek-2, o sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 e o PCR do *intein* VMA, corroborando a acurácia do método desenvolvido por Prandini *et al* (2013), reforçando portanto o uso de *inteins* como marcadores moleculares na discriminação de espécies crípticas.

As CIMs do nosso trabalho para anfotericina B e 5-fluorocitosina não mostram diferenças significativas entre as espécies do complexo *Candida parapsilosis*. Por outro lado, *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. metapsilosis* apresentaram maior sensibilidade dose dependente ao itraconazol do que *C. orthopsilosis*. Tal observação reforça a importância do reconhecimento dos perfis de susceptibilidade antifúngica entre estas espécies para o tratamento adequado das infecções causadas por esses patógenos, já que este complexo apresenta perfis de virulência diferentes entre si. Atributos de virulência como a capacidade de produzir proteases extracelulares, secreção de lipase, formação de pseudo-hifas, produção de biofilme em dispositivos médicos implantados, dano aos tecidos do hospedeiro e proliferação rápida, demonstram-se diversificados entre essas espécies (GUO; YANG. LIANG, 2016; BARBEDO *et al*, 2016). Por exemplo, foi visto que *C. metapsilosis* não produz pseudo-hifas, diminuindo a capacidade desta em aderir às células epiteliais, a associando como a menos virulenta do complexo (BARBEDO *et*

*al.*, 2016). Alguns estudos também demonstram a incapacidade de *C. orthopsilosis* em produzir pseudo-hifas (GAGO *et al.*, 2014). Infecções causadas por *C. parapsilosis stricto sensu* são mais frequentes do que aquelas causadas pelos outros membros do complexo, o que pode estar relacionado a um perfil de maior virulência (ASADZADEH *et al.*, 2015).

Até o presente momento não se tinha informação sobre a taxa de ocorrência das diferentes espécies de *Candida*, principalmente aquelas relacionadas a infecções sistêmicas, causando candidemia, no estado do RN. Aparentemente o padrão encontrado corrobora com outros estudos em diferentes regiões brasileiras, mostrando grande prevalência de *C. tropicalis* e do complexo *C. parapsilosis*, sendo a espécie *C. parapsilosos strictu senso* a mais comum do complexo. Achados destas espécies em mãos e boca de profissionais ressaltam a importância de campanhas em prol da higienização de mãos e uso de máscaras e luvas. Estes achados serão divulgados nos Hospitais nos quais este estudo foi realizado, a fim de sensibilizarmos os profissionais a respeito das boas práticas em biossegurança.

## 7. CONCLUSÃO

Em nosso estudo demonstramos a eficácia e aplicabilidade da PCR do *intein* VMA como marcador molecular na diferenciação do complexo *C. parapsilosis* (não distinguíveis fenotipicamente), em três espécies, *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, visando uma maior confiabilidade diagnóstica.

Embora em nossa pesquisa, os testes para os antifúngicos anfotericina B e 5-fluorocitosina não apresentarem diferenças significativas de CIMs entre as espécies do complexo *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* se mostrou mais sensível ao itraconazol do que *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. metapsilosis*. Assim, ressaltamos a importância dos testes de susceptibilidade antifúngica, para o direcionamento e adequação terapêutica, evitando quadros de resistência e/ou multirresistência de cepas fúngicas.

Destacamos nesse estudo dados epidemiológicos quanto à prevalência do complexo *C. parapsilosis* em comparação com outras espécies de *Candida* no estado do Rio Grande do Norte, estando às espécies do complexo *C. parapsilosis* como a terceira mais incidente no total das amostras clínicas avaliadas, sendo a segunda mais frequente em hemoculturas. Tais achados estão em concordância com o perfil encontrado em amostras de profissionais da saúde, nas quais, de forma geral o complexo *C. parapsilosis* é o segundo mais prevalente e especificamente em mãos é significativamente mais prevalente que *C. albicans*, indicando a necessidade da implementação de medidas de biossegurança no manejo dos pacientes nos hospitais. Com nossos dados buscamos a melhoria da qualidade do serviço de saúde prestado no estado, contribuindo com conhecimento científico aplicado à qualificação dos profissionais de saúde, levando a um melhor prognóstico dos quadros de candidemia no Rio Grande do Norte.

## 8. REFERÊNCIAS

- ALBURQUENQUE, C., BELTRÁN, S., OLIVARES, R., FALCONER, M.A., AMARO, J., FUENTES, M., TAPIA, C. 2013. Distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp. la importancia de vigilar también cepas de la comunidade. *Revista chilena infectologia* 30(3):244–251.
- ALCAZAR-FUOLI, L., MELLADO, E. 2014. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *British Journal of Haematology* 166(4):471–484.
- ALTHAUS, V.A., REGGINATO, A., BOSSETTI, V., SCHMIDT, J.C. 2015. Espécies de *Candida* spp. em isolados clínicos e suscetibilidade a antifungicos de uso hospitalar. *Revista Saúde e Pesquisa* 8(1):7-17.
- ASADZADEH, M., AHMAD, S., HAGEN, F., MEIS, J.F., AL-SWEIH, N., KHAN, Z. 2015. Simple, Low-Cost Detection of *Candida parapsilosis* Complex Isolates and Molecular Fingerprinting of *Candida orthopsilosis* Strains in Kuwait by ITS Region Sequencing and Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. *PloS one* 18;10(11):e0142880.
- ASHLEY, E.S.D., LEWIS, R., LEWIS, J.S., MARTIN, C., ANDES, D. 2006. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. *Clinical infectious diseases* 43:S28–S39.
- ATAÍDES, F.S., ABRÃO, F.Y., COSTA, C.R., SILVA, M.R.R., PIMENTA, F.C., PALOS, M.A.P., SOUZA, L.K.H. 2010. Identification of *Candida* species on the saliva of the hospital workers. *Revista Eletrônica de Enfermagem* 12(3):498-501.
- BAGAGLI, E., MARQUES, S.A. Micologia médica molecular: Impacto na epidemiologia e ecologia dos fungos. In: *Compêndio de Micologia Médica*. ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.v.2. p.123-137. 2010.
- BARBEDO, L.S., SGARBI, D.B.G. 2010. Candidíase. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis* 22(1):22–38.
- BARBEDO, L.S., FIGUEIREDO-CARVALHO, M.H.G., MUNIZ, M.M., ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. 2016. The identification and differentiation of the *Candida parapsilosis* complex species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region of the rDNA. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 111(4): 267-270.
- BEDOUT, C., GÓMEZ, B.L. 2010. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. *Infectio* 14(94):159–171.

BERTINIA, A., BERNARDISB, F., HENSGENSA, L.A.M., SANDINIB, S., SENESIA, S., TAVANTI, A. 2013. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *International Journal of Medical Microbiology* 303:98-103.

BRAMBILLA, M., ADAMO, G.M., FRASCOTTI, G., PORRO, D., BRANDUARDI, P. 2015. Physiological effects of GLT1 modulation in *Saccharomyces cerevisiae* strains growing on different nitrogen sources. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2):326–336.

BRANDT, M.E., LOCKHART, S.R., WARNOCK, D.W. Laboratory Aspects of Medical Mycology. In book: *Essentials of clinical mycology*. 2nd ed. New York: Springer; 2011. p.3-25.

BRASIL, 2012. Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012>. Acesso em: 02 setembro 2016.

BRILHANTE, R.S.N., RODRIQUES, T.J.S., CASTELO-BRANCO, D.S.C.M., TEIXEIRA, C.E.C., MACEDO, R.M., BANDEIRA, S.P., ALENCAR, L.P., MOMCEIRO, A.J., CORDEIRO, R.A., BANDEIRA, T.J.P.G., MOREIRA, J.L.B., SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. 2014. Antifungal susceptibility and virulence attributes of animal-derived isolates of *Candida parapsilosis* complex. *Journal of Medical Microbiology* 63: 1568-1572.

BURT, A., KOUFOPANOU, V. 2004. Homing endonuclease genes: The rise and fall and rise again of a selfish element. *Current Opinion in Genetics and Development* 14(6):609-15.

BUTLER, G., RASMUSSEN, M.D., LIN, M.F., SANTOS, M.A.S., SAKTHIKUMAR, S., MUNRO, C.A., RHEINBAY, E., GRABHERR, M., FORCHE, A., REEDY, J.L., AGRAFIOTI, I., ARNAUD, M.B., BATES, S., BROWN, A.J.P., BRUNKE, S., COSTANZO, M.C., FITZPATRICK, D.A., GROOT, P.W.J., HARRIS, D., HOYER, L.L., HUBE, B., KLIS, F.M., KODIRA, C., LENNARD, N., LOGUE, M.E., MARTIN, R., NEIMAN, A.M., NIKOLAOU, E., QUAIL, M.A., QUINN, J., SANTOS, M.C., SCHMITZBERGER, F.F., SHERLOCK, G., SHAH, P., SILVERSTEIN, K.A.T., SKRZYPEK, M.S., SOLL, D., STAGGS, R., STANSFIELD, I., STUMPF, M.P.H., SUDBERY, P.E., SRIKANTHA, T., ZENG, Q., BERMAN, J., BERRIMAN, M., HEITMAN, J., GOW, N.A.R., LORENZ, M.C., BIRREN, B.W., KELLIS, M., CUOMO, C.C. 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *NIH Public Access* 459(7247): 657–662.

CLEVELAND, A.A., FARLEY, M.M., HARRISON, L.H., STEIN, B., HOLLICK, R., LOCKHART, S.R., MAGILL, S.S., DERADO, G., PARK, B.J., CHILLER, T.M. 2012.

Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: Results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clinical Infectious Diseases* 15;55(10):1352-61.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 3<sup>rd</sup> ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008 (Approved standard. M27-A3).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012 (Document M27-S4).

COLOMBO, A.L., GUIMARÃES, T. 2003. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(5):599–607.

COLOMBO, A.L., GARNICA, M., ARANHA CAMARGO, L.F., DA CUNHA, C.A., BANDEIRA, A.C. 2012. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. *Medical Mycolgy* 51: 38–44.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S., PINA-VAZ, C., MENDONCA, D., GONCALVES RODRIGUES, A. 2008. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *European Journal of Clinical Microbiology Infection Diseases*.27(5):365–374.

CUENCA-ESTRELLA, M. 2010. Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances. *Revista Espanola de Quimioterapia* 23(4):169–176.

DIEZMANN, S., COX, C.J., SCHONIAN, G., VILGALYS, R.J., MITCHELL, T.G. 2004. Phylogeny and Evolution of Medical Species of *Candida* and Related Taxa: a Multigenic Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 42(12):5624-5635.

DIMOPOULOS, G., VELEGRAKI, A., FALAGAS, M.E. 2009. A 10-year survey of antifungal susceptibility of candidemia isolates from intensive care unit patients in greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(3):1242–1244.

DOI, A.M., PIGNATARI, A.C.C., EDMOND, M.B., MARRA, A.R., CAMARGO, L.F.A., SIQUEIRA, R.A., MOTA, V.P., COLOMBO, A.L. 2016. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PloS one* 11(1):e0146909.

DONOGHUE, P.O., LUTHEY-SCHULTEN, Z. 2003. On the Evolution of Structure in Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 550–573.

- DORIA, A.C.O.C., SANTOS, T.B., FIGUEIRA, F.R., SORGE, C.P.C., BERNARDES, R.C., BATISTA, A.C.S., KHOURI, S. 2015. Comparative study of blood cultures and catheters which were positive for yeast of the genus *Candida* from hospital origin. *Revista Uivap* 21(38): 2237-1753.
- FAHAMI, S., KORDBACHEH, P., MOAZENI, M., MAHMOODI, M., MIRHENDI, H. 2010. Species identification and strain typing of candida isolates by PCR-RFLP and RAPD-PCR analysis for determining the probable sources of nosocomial infections. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 12(5):539–547.
- FERNANDES, J.A.L., PRANDINI, T.H.R., CASTRO, M.C.A., ARANTES, T.D., GIACOBINO, J., BAGAGLI, E., THEODORO, R.C. 2016. Evolution and Application of Inteins in clinically important *Candida* species : a Review. *Frontiers in Microbiology* 7:1585.
- FERREIRA, M.A., MARTINS, D. 2015. Occurrence fungal species isolated from hands and nails of workers. *Revista Brasileira de Medicina do Trabalho* 14(1):60-70.
- FERREIRA, A.V., PRADO, C.G., CARVALHO, R.R., DIAS, K.S.T., DIAS, A.L.T. 2013. *Candida albicans* and Non-*C. albicans* *Candida* Species: Comparison of Biofilm Production and Metabolic Activity in Biofilms, and Putative Virulence Properties of Isolates from Hospital Environments and Infections. *Mycopathologia* 175:265–272.
- FILETICI, P., MARTEGANI, M.P., VALENZUELA, L., GONZALEZT, A., BALLARIO, P. 1996. Sequence of the GLT1 Gene from *Saccharomyces cerevisiae* Reveals the Domain Structure of Yeast Glutamate Synthase. *Yeast Sequencing Reports* 12:1005–1011.
- FORNARI, G., HERKET, P.F., REDIVO, D.D.B., BENEDETTI, V.P., GLIENKE, C. 2013. Epidemiologia da colonização de leveduras *Candida* da cavidade bucal em pacientes diabéticos. *Saúde e Biologia* 8(2): 1-6.
- GAGO, S., ROSAS, R.G., CUESTA, I., MELLADO, E., IZQUERDO, A.A. 2014. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence* 5(2): 278-85.
- GIAROLA, L.B., BARATIERI, T., COSTA, A.M., BEDENDO, J., MARCON, S.S., WAIDMAN, M.A.P. 2012. Infecção hospitalar na perspectiva dos profissionais de enfermagem: um estudo bibliográfico. *Cogitare Enfermagem* 17(1):151-7.
- GIOLO, M. P., SVIDZINSKI, T.I.E. 2010. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 46(3):225–234.

GOGARTEN, J. P., HILARIO, E. 2006. Inteins, introns, and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. *BMC evolutionary biology*, 6:94.

GOMEZ-LOPEZ, A., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., RODRIGUEZ, D., ALMIRANTE, B., PAHISSA, A. RODRIGUEZ-TUDELA, J.L., CUENCA ESTRELLA, M. 2008. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: Results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(4):506–1509.

GONÇALVES, S.S., AMORIM, C.S., NUCCI, M., PADIVAN, A.C., BRIONES, M.R., MELO, A.S., COLOMBO, A.L. 2010. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: Results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clinical Microbiology and Infection* 16(7):885–887.

GOW, N.A.R. 2013. Multiple mating strategies. *Nature* 494:45-46.

GROSSMAN, N.T., CHILLER, T.M., LOCKHART, S.R. 2014. Epidemiology of Echinocandin Resistance in *Candida*. *Current Fungal Infection Reports* 8(4):243–248.

GROOT, P.W.J., BADER, O., BOER, A.D., WEIG, M., CHAUHANC, N. 2013. Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. *Eukaryotic Cell* 12(4):470-8.

GUIMARÃES, T., NUCCI, M., MENDONÇA, J.S., MARTINEZ, R., BRITO, L., SILVA NIVIA., MORETTI, M.L., SALOMÃO, R., COLOMBO, A.L. 2012. Epidemiology and predictors of a poor outcome in elderly patients with candidemia. *International Journal of Infectious Diseases* 16(6):442–447.

GUINEA, J. 2014. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection* 8(5):10.

GUO, Y., YANG, J., LIANG, G. 2016. A Real-Time PCR Assay Based on 5.8S rRNA Gene (5.8S rDNA) for Rapid Detection of *Candida* from Whole Blood Samples. *Mycopathologia* 181:405.

HAMMOUD, M.S., ALTAIR, A., FOUAD, M., RAINA, A., KHAN, Z. 2013. Persistent candidemia in neonatal care units: risk factors and clinical significance. *International Journal of Infectious Diseases* 17:624–8.

HIGASHI, C.M., TAKASHINA, F.H., RECHENCHOSKI, D.Z., STIPP-ABE, A.T., VESPERO, E.C., QUESADA, R.M.B., PELISSON, M. 2015. Comparison of Vitek-2 automated identification system and PCR-ITS for species characterization of clinical isolates of *Candida* spp.. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* 36(1):233–242.

HINRICHSEN, S.L., FALCÃO, E., VILELLA, T.A.S., COLOMBO, A.L., NUCCI, M., MOURA, L., RÊGO, L., LIRA, C., ALMEIDA, L. 2008. Candidemia em hospital

terciário do nordeste do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(4):394-398.

HIRAI, Y., ASAHATA, S., AINODA, Y., GOTO, A., FUJITA, T., TOTSUKA, K. 2014. Nosocomial *Candida parapsilosis* candidaemia: Risk factors, antifungal susceptibility and outcome. *Journal of Hospital Infection* 87(1):54–58.

HORN, F., HEINEKAMP, T., KNIEMEYER, O., POLLMÄCHER, J., VALIANTE, V., BRAKHAGE, A.A. 2012. Systems biology of fungal infection. *Frontiers in Microbiology* 3(1):20.

HU, B., DU, Z., KANG, Y., ZANG, B., CUI, W., QIN, B., FANG, Q., QUI, H., LI, J. 2014. Catheter-related *Candida* bloodstream infection in intensive care unit patients : a subgroup analysis of the China-SCAN study. *BMC Infectious Diseases* 14:594.

JESUS, J.S.F., BORGES-PALUCH, L.R., CERQUEIRA, T.P.S., VILA NOVA, M.X., HSIE, B.S. 2015. Characterization and occurrence of *Candida* in patients in treatment for câncer. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde* 13(1):114-124.

KALIDAS, S., CESTARI, I., MONNERAT, S., LI, Q., REGMI, S., HASLE, N., LABAIED, M., PARSONS, M., STUART, K., PHILLIPS, M.A. 2014. Genetic validation of aminoacyl-tRNA synthetases as drug targets in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell* 13(4):504–516.

KIM, S.K., EL BISSATI, K., MAMOUN, C.B. 2006. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 152(10):2885–2894.

KOEHLER, P., TACKE, D., CORNELLY, O.A. 2014. Our 2014 approach to candidaemia. *Mycoses* 57(10):581–583.

KOUFOPANOU, V., BURT, A. 2005. Degeneration and domestication of a selfish gene in yeast: Molecular evolution versus site-directed mutagenesis. *Molecular Biology and Evolution*, 22(7):1535–1538.

KOJIC, E.M., DAROUICHE, R.O. 2004. *Candida* infections of medical devices. *Clinical Microbiology Reviews* 17:255–267.

LÓPEZ-MARTÉNEZ, R. Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology* 28(2):178–184.

LIU, X.Q. 2000. Protein-splicing intein: Genetic mobility, origin, and evolution. *Annals Reviews Genetic* 34:61–76.

LIU, X.Q., YANG, J. 2004. Prp8 intein in fungal pathogens: Target for potential antifungal drugs. *FEBS Letters* 572(1–3):46–50.

- LOCKHART, S.R., MESSER, S.A., PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J. 2008. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 46(8):2659–2664.
- LOCKHART, S.R., IQBAL, N., CLEVELAND, A.A., FARLEY, B., M.M., HARRISON, L.H., BOLDEN, C.B., BAUGHMAN, W., STEIN, B., HOLLICK, R., PARK, B.J., CHILLE, T. 2012. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *Journal of Clinical Microbiology* 50(11):3435–3442.
- LOCKHART, S.R. 2014. Current Epidemiology of *Candida* Infection. *Clinical Microbiology Newsletter* 36(17):131–136.
- LOVERO, G., BORGHI, E., BALBINO, S., CIRASOLA, D., GIGLIO, O., PERDONI, F., CAGGIANO, G., MORACE, G., MONTAGNA, M.T. 2016. Molecular identification and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* complex bloodstream isolates in Italy, 2007-2014. *PLoS ONE* 11(2):2007–2014.
- LUPETTI, A. TAVANTI, A., DAVINI, P., GHELARDI, E., CORSINI, V., MERUSI, I., BOLDRINI, A., CAMPA, M., SENESI, S. 2002. Horizontal Transmission of *Candida parapsilosis* Candidemia in a Neonatal Intensive Care Unit. *Journal of Clinical Microbiology* 40(7):2363–2369.
- MAGEE, B.B., MAGEE, P.T. 2005. Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans*. *Revista iberoamericana de micología* 22(4):187–93.
- MAUBON, D., GARNAUD, C., CALANDRA, T., SANGLARD, D., CORNET, M. 2014. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: Where are we now? *Intensive Care Medicine* 40(9):1241–1255.
- MEDRANO, D.J.A., BRILHANTE, R.S.N., CORDEIRO, R.A., ROCHA, M.F.G., RABENHORST, S.H.B., SIDRIM, J.J.C. 2006. Candidemia in a brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 48(1):17-20.
- MENEZES, E.A., VASCONCELOS JÚNIOR, A.A., CUNHA, F.A., CUNHA, M.C.S.O., BRAZ, B.H.L., CAPELO, L.G., SILVA, CL.F. 2012. Identificação molecular e suscetibilidade antifúngica de *Candida parapsilosis* isoladas no Ceará , Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 48(6):415–420.
- MERSEGUEL, K., NISHIKAKU, A.S., RODRIGUES, A.M., PADOVAN, A.N., FERREIRA, R.C., MELO, A.S.A., BRIONES, M.R.S., COLOMBO, A.L. 2015. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. *BMC Infectious Diseases* 15(1):57.

- MCCULLOUGH, M.J., DISALVO, A.F., CLEMONS, K.V., PARK, P., STEVENS, D.A. 2000. Molecular epidemiology of *Blastomyces dermatitidis*. *Clinical Infectious Diseases* 30: 328-335.
- NOVIKOVA, O., TOPILINA, N., BELFORT, M. 2014. Enigmatic Distribution, Evolution, and Function of Inteins. *Journal of Biological Chemistry* 23;289(21): 14490–14497.
- NUCCI, M., QUEIROZ-TELLES, F., TOBÓN, A.M., RESTREPO, A., COLOMBO, A.L. 2010. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases* 51(5):561–570.
- NUCCI, M., QUEIROZ-TELLES, F., ALVARADO-MATUTE, T., TIRABOSCHI, I.R., CORTES, J., ZURITA, J., GUZMAN-BLANCO, M., SANTOLAYA, M.E., THOMPSON, L., SIFUENTES-OSORNIO, J., ECHEVARRIA, J.I., COLOMBO, A.L. 2013. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLoS ONE* 8(3):7.
- PÉREZ, J.C., KUMAMOTO, C.A., JOHNSON, A.D. 2013. *Candida albicans* Commensalism and Pathogenicity Are Intertwined Traits Directed by a Tightly Knit Transcriptional Regulatory Circuit. *PLoS Biology* 11:3.
- PACHECO, D.D.R., SOARES, D.E.D., NETO, C.M.S., SILVA, G.A., PRADO, R.S. 2015. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Curcuma longa* SOBRE *Candida parapsilosis*. *Revista de Patologia Tropical* 44(3):258–270.
- PAMMI, M., Zhong, D., Johnson, Y., Revell, P., Versalovic, J. 2014. Polymicrobial bloodstream infections in the neonatal intensive care unit are associated with increased mortality: a case-control study. *BMC Infectious Diseases* 14(390):1–8.
- PARAMYTHIOTOU, E., Frantzeskaki, F., Flevari, A., Armaganidis, A., Dimopoulos, G. 2014. Department. Invasive fungal infections in the ICU: How to approach, how to treat. *Molecules* 19(1):1085–1119.
- PEIXOTO, J.V., ROCHA, M.G., NASCIMENTO, R.T.L., MOREIRA, V.V., KASHIWABARA, T.G.B. 2014. Candidíase: uma revisão de literatura. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research* 8(2):75–82.
- PERLER, F.B. 2002. InBase: the Intein Database. *Nucleic Acids Research* 30(1):383–384.
- PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20(1):133–163.
- POSEY, K. L., KOUFOPANOU, V., BURT, A., GIMBLE, F.S. 2004. Evolution of divergent DNA recognition specificities in VDE homing endonucleases from two yeast species. *Nucleic Acids Research*. 32(13):3947–3956.

POULTER, R.T., GOODWIN, T.J., BUTLER, M.I. 2007. The nuclear-encoded inteins of fungi. *Fungal Genetics and Biology* 44: 153–179.

PRANDINI, T.H.R., THEODORO, R.C., BRUDER-NASCIMENTO, A.C.M.O., SCHEEL, C.M., BAGAGLI, E. 2013. Analysis of inteins in the *Candida parapsilosis* complex for simple and accurate species identification. *Journal of Clinical Microbiology* 51(9):2830–2836.

PRIMO, M.G.B., RIBEIRO, L.C.M., FIGUEIREDO, L.S.F., SIRICO, S.C.A., SOUZA, M.A. 2010. Adhesion to the practice of hand hygiene by professionals in the health area in a University Hospital. *Revista Eletrônica de Enfermagem* 12(2):266-271.

PRYSZCZ, L.P., NÉMETH, T., GACSER, A., GABALDÓN, T. 2014. Genome comparison of *candida orthopsilosis* clinical strains reveals the existence of hybrids between two distinct subspecies. *Genome Biology and Evolution* 6(5):1069–1078.

PRYSZCZ, L.P., NÉMETH, T., SAUS, E., KSIEZOPOLSKA, E., HEGEDŰSOVÁ, E., NOSEK, J., WOLFE, K.H., GACSER, A., GABALDÓN, T. 2015. The Genomic Aftermath of Hybridization in the Opportunistic Pathogen *Candida metapsilosis*. *PLoS Genetics* 11(10):1–29.

QUINDÓS, G. 2014. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista Iberoamericana de Micologia* 31(1):42–48.

RIBEIRO, P.M., ITO, C.Y.K., JUNQUEIRA, J.C., JORGE, A.O.C. 2009. Isolation of *Candida* spp. using of the chromogenic culture medium CHROMagar *Candida*. *Brazilian Dental Science* 12(4):40–45.

RUIZ, L.S., KHOURI, S., HAHN, R.C., SILVA, E.G., OLIVEIRA, V.K.P., GANDRA, R.F., PAULA, C.R. 2013. Candidemia by Species of the *Candida parapsilosis* Complex in Children's Hospital: Prevalence, Biofilm Production and Antifungal Susceptibility. *Mycopathologia* 175: 231-9.

SABINO, R., SAMPAIO, P., VERÍSSIMO, C. 2014. Genotipagem de *Candida parapsilosis* com marcadores de DNA microsatélite: uma ferramenta para o estudo e controlo das infeções hospitalares. *Instituto Nacional de Saúde Doutor Rodrigo Jorge* 8:30–33.

SARDI, J.C.O.L., SCORZONI, T., BERNARDI, A. M.F., GIANNINI, M.J.S.M. 2013. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology* 62(1):10–24.

SILVA, C.M., CARVALHO-PARAHYM, A.M., MACÉDO, D.P., LIMA-NETO, R.G., FRANCISCO, E.C., MELO, A.S.A., SILVA, M.C.M., JUCÁ, M.B., MELLO, L.R.B.,

AMORIM, R.M.J., NEVES, R.P. 2015. Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii* : Case Report and Review of Literature. *Mycopathologia* 180:69–73.

SILVA, A.P., MIRANDA, I.M., LISBOA, C., PINA-VAZ, C., RODRIGUES, A.G. 2009. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 47(8):2392–2397.

SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, O., WILLIAMS, D.W., AZEREDO, J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews* 36(2):288–305.

SILVA, L.B., DE OLIVEIRA, D.B., DA SILVA, B.V., DE SOUZA, R.A., DA SILVA, P.R., FERREIRA-PAIM, K., ANDRADE-SILVA, L.E., SILVA-VERGARA, M.L., ANDRADE, A.A. 2014. Identification and antifungal susceptibility of fungi isolated from dermatomycoses. *Journal Eur Acad Dermatol Venereol* 28: 633-40.

SINGARAVELU, K., GÁCSEER, A., NOSANCHUK, J.D. 2014. Genetic determinants of virulence - *Candida parapsilosis*. *Revista Iberoamericana de Micologia* 31(1):16–21.

SINGH, R., PARIJA, S.C. 2012. *Candida parapsilosis*: An emerging fungal pathogen. *Indian Journal of Medical Research* 136(4):671–673.

SOUZA, J.H., BLEICH, A., TARTARI, D.C., LOTH, E.A., SIPPERT, E.A., SIMÃO, R.C.G., GANDRA, R.F. 2010. Susceptibilidade antifúngica de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes hospitalizados. *Anais do XIX Encontro Anual de Iniciação Científica UNICENTRO* 28–31.

SPAMPINATO, C., LEONARDI, D. 2013. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Research International* v.2013.

SPREGHINI, E., ORLANDO, F., TAVANTI, A., SENESI, S., GIANNINI, D., MANSO, E., BARCHIESI, F. 2012. In vitro and in vivo effects of echinocandins against *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(9):2195–2202.

TAMURA, N.K., NEGRI, M.F.N., BONASSOLI, L.A., SVIDZINSKI, T.I.E. 2007. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(1):91–3.

TAVANTI, A., DAVIDSON, A.D., FORDYCE, M.J., GOW, N.A.R., MAIDEN, M.C.J., ODDS, F.C. 2005. Population Structure and Properties of *Candida albicans*, as Determined by Multilocus Sequence Typing†. *Journal of Clinical Microbiology* 43(11):5601–5613.

- TAY, S.T., NA, S.L., CHONG, J. 2009. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. *Journal of Medical Microbiology* 58(2):185–191.
- TORO, M., TORRES, M.J., MAITE, R., AZNAR, J. 2011. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(3):418–424.
- TOPILINA, N.I., NOVIKOVA, O., STANGER, M., BANAVALI, N.K., BELFORT, M. 2015b. Post-translational environmental switch of RadA activity by extein – intein interactions in protein splicing. *Nucleic Acids Research* 43(13):6631–6648.
- TRABULSI, L.R, ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5a ed. São Paulo: Atheneu; 2008. p.479- 98.
- TRILLES, L., LAZÉRA, M.S., WANKE, B., OLIVEIRA, R.V., BARBOSA, G.G., NISHIKAWA, M.M., MORALES, B.P., MEYER, W. 2008. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 103(5):455-462.
- TROFA, D., GÁCSEK, A., NOSANCHUK, J.D. 2008. *Candida parapsilosis*, naemerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology* 21: 606-625.
- VOLKMANN, G., IWAI, H. 2010. Protein trans -splicing and its use in structural biology: opportunities and limitations. *Molecular BioSystems* 6:2110-2121.
- VONDENHOFF, G.H.M., VAN AERSCHOT, A. 2011. Aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as potential antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46(11):5227–5236.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds). PCR Protocols: A guide to methods and applications. San Diego: Academic p.315-22.Press. 1990.
- WOOD, D. W., WU, W., BELFORT, G., DERBYSHIRE, V., BELFORT, M. 1999. A genetic system yields selfcleaving inteins for bioseparations. *Nature Biotechnol* 17(9):889–892.
- YAMASHIRO, C.T., KANE, P.M., WOLCZYK, D.F., PRESTON, R.A., STEVENS, T. H. 1990. Role of vacuolar acidification in protein sorting and zymogen activation: a genetic analysis of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *Molecular and Cellular Biology* 10(7):3737–3749.
- YAPAR, N. 2014. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 10:95–105.

ZARRIN, M., MAHMOUDABADI, A.Z. 2009. Invasive candidiasis; a review article. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2(1):1–6.

ZHANG, Y.-Q., RAO, R. 2010. Beyond ergosterol: linking pH to antifungal mechanisms. *Virulence* 1(6):551–554.

ZICCARDI, M., SOUZA, L.O.P., GANDRA, R.M., GALDINO, A.C.M., BAPTISTA, A.R.S., NUNES, A.P.F., RIBEIRO, M.A., BRANQUINHA, M.H., SANTOS, A.L.S. 2015. *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. *International Journal of Medical Microbiology* 305(8):848–859.

Taxonomy Browser. National Center for Biotechnology Information. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5475>. Access in junho 05, 2016.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A: TCLE para a obtenção de amostras de mãos e mucosa bucal de profissionais da saúde.**



**Universidade Federal do Rio Grande do Norte**

**Instituto de Medicina Tropical - IMT**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE (para maiores de idade)**

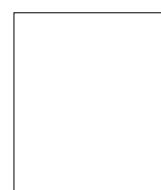
### *Esclarecimentos*

Este é um convite para você participar da pesquisa: **“AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO *Candida parapsilosis* EM AMOSTRAS DE HEMOCULTURA DE HOSPITAIS DE NATAL/RN”**, que tem como pesquisador responsável a Dra. Raquel Cordeiro Theodoro.

Esta pesquisa pretende diferenciar os três tipos distintos do fungo conhecido como *Candida parapsilosis*, uma vez que nos métodos de diagnóstico de rotina, isso não é feito. Esta diferenciação será realizada tanto para amostras fúngicas obtidas de hemoculturas como de esfregaços de mãos de profissionais da saúde. O motivo que nos leva a fazer este estudo é a necessidade de um monitoramento de infecções nosocomiais causadas pelo gênero *Candida*, um dos principais responsáveis por infecções fúngicas hospitalares. Caso você decida participar, você será submetido apenas à coleta de material superficial de suas mãos (swab de mãos) e de sua mucosa oral, a qual será rápida, não invasiva e, portanto completamente indolor. Como benefício, você terá uma maior informação a respeito da microbiota presente em seu local de trabalho bem como a respeito da importância do ato de lavar as mãos ao longo de sua jornada de trabalho, antes e após a manipulação de cuidados aos pacientes. Em caso de algum problema que você possa ter, relacionado com a pesquisa, você terá direito a assistência gratuita que será prestada no próprio Hospital em que você trabalha pela equipe de médicos assistentes. Durante todo o período da pesquisa você poderá tirar suas dúvidas

ligando para Raquel Cordeiro Theodoro (999190546). Você tem o direito de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo para você. Os dados que você irá nos fornecer serão confidenciais e serão divulgados apenas em congressos ou publicações científicas, não havendo divulgação de nenhum dado que possa lhe identificar. Esses dados serão guardados pelo pesquisador responsável por essa pesquisa em local seguro e por um período de 5 anos. Se você tiver algum gasto pela sua participação nessa pesquisa, ele será assumido pelo pesquisador e reembolsado para você. Se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você será indenizado. Qualquer dúvida sobre a ética dessa pesquisa você deverá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, telefone 3215-3135. Este documento foi impresso em duas vias. Uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável Raquel Cordeiro Theodoro. Consentimento Livre e Esclarecido Após ter sido esclarecido sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados nessa pesquisa, além de conhecer os riscos, desconfortos e benefícios que ela trará para mim e ter ficado ciente de todos os meus direitos, concordo em participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO *Candida parapsilosis* EM AMOSTRAS DE HEMOCULTURA DE HOSPITAIS DE NATAL/RN”**, e autorizo a divulgação das informações por mim fornecidas em congressos e/ou publicações científicas desde que nenhum dado possa me identificar.

Natal, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ .



Impressão  
datiloscópica do  
participante

---

Assinatura do participante da pesquisa

### **Declaração do pesquisador responsável**

Como pesquisador responsável pelo estudo “**AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO *Candida parapsilosis* EM AMOSTRAS DE HEMOCULTURA DE HOSPITAIS DE NATAL/RN**” declaro que assumo a inteira responsabilidade de cumprir fielmente os procedimentos metodologicamente e direitos que foram esclarecidos e assegurados ao participante desse estudo, assim como manter sigilo e confidencialidade sobre a identidade do mesmo. Declaro ainda estar ciente que na inobservância do compromisso ora assumido estarei infringindo as normas e diretrizes propostas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – CNS, que regulamenta as pesquisas envolvendo o ser humano.

Natal, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Dra. Raquel Cordeiro Theodoro

Pesquisador responsável

**APÊNDICE B: Termo de Responsabilidade e Compromisso do Pesquisador Responsável**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
IMT – INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL  
**TERMO DE RESPONSABILIDADE E COMPROMISSO DO PESQUISADOR  
RESPONSÁVEL**

Eu, RAQUEL CORDEIRO THEODORO, professora da UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE, responsabilizo-me pela orientação da aluna, MARIA DA CONCEIÇÃO ALEXANDRE CASTRO, do Curso de Pós Graduação em Biologia Parasitária do Centro de Biociências da UFRN, cujo projeto de pesquisa intitula-se “**AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO *Candida parapsilosis* EM AMOSTRAS DE HEMOCULTURA DE HOSPITAIS DE NATAL/RN**” comprometo-me a assegurar que sejam seguidos os preceitos éticos previstos na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e demais documentos complementares.

Responsabilizo-me, também, pelo projeto de pesquisa, pelo fiel acompanhamento das atividades de pesquisa e pelos resultados para sua posterior publicação no meio científico.

Natal, RN, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

**APÊNDICE C: Termo de Responsabilidade e Compromisso do Pesquisador Participante**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
IMT – INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL  
**TERMO DE RESPONSABILIDADE E COMPROMISSO DO PESQUISADOR  
PARTICIPANTE**

Eu, MARIA DA CONCEIÇÃO ALEXANDRE CASTRO, aluna do Curso de Pós Graduação em Biologia Parasitária do Centro de Biociências da UFRN, responsabilizo-me, junto com a minha orientadora, a professora RAQUEL CORDEIRO THEODORO a desenvolver o projeto de pesquisa intitulado “**AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO *Candida parapsilosis* EM AMOSTRAS DE HEMOCULTURA DE HOSPITAIS DE NATAL/RN**” e comprometo-me a assegurar que sejam seguidos os preceitos éticos previstos na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e demais documentos complementares.

Responsabilizo-me, também, pelo zelo com o meu projeto de pesquisa, pelo fiel cumprimento das orientações sugeridas pela minha orientadora nas atividades de pesquisa e, junto com a minha orientadora, pelos resultados da pesquisa para sua posterior publicação no meio científico.

Natal, RN, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do Pesquisador Participante

## APÊNDICE D: Co-autoria em artigo publicado durante o mestrado.



# Evolution and Application of Inteins in *Candida* species: A Review

José A. L. Fernandes<sup>1†</sup>, Tâmara H. R. Prandini<sup>2†</sup>, Maria da Conceição A. Castro<sup>1</sup>,  
Thales D. Arantes<sup>1,3</sup>, Juliana Giacobino<sup>2</sup>, Eduardo Bagagli<sup>2</sup> and Raquel C. Theodoro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Tropical Medicine of Rio Grande do Norte, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil, <sup>2</sup> Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, Brazil, <sup>3</sup> Post-graduation Program in Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

Inteins are invasive intervening sequences that perform an autocatalytic splicing from their host proteins. Among eukaryotes, these elements are present in many fungal species, including those considered opportunistic or primary pathogens, such as *Candida* spp. Here we reviewed and updated the list of *Candida* species containing inteins in the genes *VMA*, *THRS* and *GLT1* and pointed out the importance of these elements as molecular markers for molecular epidemiological researches and species-specific diagnosis, since the presence, as well as the size of these inteins, is polymorphic among the different species. Although absent in *Candida albicans*, these elements are present in different sizes, in some environmental *Candida* spp. and also in most of the non-*albicans* *Candida* spp. considered emergent opportunistic pathogens. Besides, the possible role of these inteins in yeast physiology was also discussed in the light of the recent findings on the importance of these elements as post-translational modulators of gene expression, reinforcing their relevance as alternative therapeutic targets for the treatment of non-*albicans* *Candida* infections, because, once the splicing of an intein is inhibited, its host protein, which is usually a housekeeping protein, becomes non-functional.

**Keywords:** *Candida* spp., intein, vacuolar ATPase, threonyl-tRNA synthetase, glutamate synthetase, molecular identification, new therapeutic targets

## INTRODUCTION

Inteins are invasive genetic elements that occur as intervening sequences in conserved coding host genes. They are transcribed and translated with the flanking host protein sequences and then self-excised by protein splicing. The flanking protein sequences (exteins) are joined by a peptide bond, constituting the functional protein (Chong et al., 1996; Perler, 2005).

Over the past three decades, inteins have been detected mainly in unicellular microorganisms in the three domains of life and in viruses (Perler, 2002). Among the Eukarya domain, inteins are found mostly in fungi, some green algae and other basal eukaryotes (Liu, 2000; Butler et al., 2001, 2006). In a recent review, 2729 genomes of bacteria, 345 of archaea and 6648 of eukarya were analyzed (Topilina et al., 2015b) and 24, 47, and 1.1% of these genomes, respectively, presented at least one intein.

Inteins are usually found at conserved sites of housekeeping proteins that have vital functions in the cell, such as DNA and RNA polymerases, aminoacyl tRNA synthetases, recombinases, topoisomerases, helicases and essential components of the spliceosome (Novikova et al., 2014).

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Joshua D. Nosanchuk,  
Albert Einstein College of Medicine,  
USA

### Reviewed by:

Ailanna Tavanti,  
University of Pisa, Italy  
Margi Butler,  
University of Otago, New Zealand

### \*Correspondence:

Raquel C. Theodoro  
raquel.c.theodoro@gmail.com

† These authors have contributed  
equally to this work.

### Specialty section:

This article was submitted to  
Fungi and Their Interactions,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 16 August 2016

Accepted: 21 September 2016

Published: xx October 2016

### Citation:

Fernandes JAL, Prandini THR,  
Castro MCA, Arantes TD,  
Giacobino J, Bagagli E and  
Theodoro RC (2016) Evolution  
and Application of Inteins in *Candida*  
species: A Review.  
Front. Microbiol. 7:1585.  
doi: 10.3389/fmicb.2016.01585