



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANA CAROLINA PALMEIRA ARRAES**

**DETECÇÃO DA DIVERSIDADE MOLECULAR DE  
*Candida* spp. ISOLADAS DE UTI NEONATAL**

Salvador  
2012

**ANA CAROLINA PALMEIRA ARRAES**

**DETECÇÃO DA DIVERSIDADE MOLECULAR DE  
*Candida* spp. ISOLADAS DE UTI NEONATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Fraga Barros

Salvador  
2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,  
SIBI - UFBA.

C871 Arraes, Ana Carolina Palmeira

Detecção da diversidade molecular de *Candida* spp.  
isoladas de UTI neonatal/ Ana Carolina Palmeira Arraes. –  
Salvador, 2012.

107 f.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Tânia Fraga Barros

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. Candidemia. 2. AP-PCR. 3. PCR-RFLP. 4. *Candida*. I.  
Barros, Tânia Fraga. II. Universidade Federal da Bahia. III.  
Título.

CDU:616-083:173.4



---

---

## TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação:

**Deteção da diversidade molecular de *Candida spp.*  
isoladas de UTI Neonatal**

Elaborada por:

**ANA CAROLINA PALMEIRA ARRAES.**

e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora foi aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito parcial à obtenção do título de

**MESTRE EM BIOTECNOLOGIA**

Salvador, Bahia, 27 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

**Dra. Tânia Fraga Barros**  
Orientadora  
Universidade Federal da Bahia

**Dra. Lília Ferreira de Moura Costa**  
Examinadora Interna  
Universidade Federal da Bahia

**Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski**  
Examinadora Externa  
Universidade Estadual de Maringá

Dedico este trabalho à Professora Tânia, muito mais que uma orientadora, mestre,  
professora, um exemplo profissional.

## Agradecimentos

---

À Deus, por todas as oportunidades de aprendizado, crescimento, amadurecimento e por conseguir realizar este trabalho.

Aos meus pais, Achilles e Luciana, pelo amor, carinho, paciência e, principalmente, pelo incentivo e apoio incondicional na minha caminhada profissional.

Aos meus irmãos, Philipe e Victor, pelo amor, carinho, companheirismo e confiança.

A toda minha família, que torce pelo meu sucesso, e em especial, a minha avó Zeny!!

À Pró Tânia, pelo aprendizado, incentivo, carinho, confiança e dedicação nestes 6 anos de formação e convivência.

Aos meus queridos amigos do LPMC, Corine, Manuela, Sílvia, Adriana, Renata, Carol, João, Talita, Vinícius, Fábio e Juliete, pela amizade, companheirismo e carinho. Vocês foram essenciais!!!

Aos colegas do mestrado, por todos os momentos de aprendizado, amizade e, em especial a Edijane.

As funcionárias da Faculdade de Farmácia, Débora, Elenice, Valmira e Mariluce, pelo apoio e torcida.

Ao Laboratório de Pesquisa em Anemias da Faculdade de Farmácia, na pessoa da Professora Elisângela, pela colaboração neste trabalho.

À Professora Joice Neves, Ana Paula e Milena pela colaboração com as análises.

À Nelzuita Cruz pela iniciativa e colaboração neste trabalho.

A todos os meus amigos, todos aqueles que sempre acreditaram em mim, torcem pelo meu sucesso e que me apoiaram nos momentos mais difíceis!!!

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Ao Projeto de consolidação do curso de Pós-Graduação aprovado pelo CNPq em parceria com a Universidade de São Paulo (Casadinho) no Núcleo de Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas.

A CAPES pela Bolsa concedida.

“Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre.”

(Charles Chaplin)

## Resumo

---

A incidência de candidemia tem aumentado nos últimos anos e o espectro das espécies de *Candida* tem mudado com a emergência das espécies não-*albicans* e com o aumento da resistência antifúngica. A técnica de PCR associada à análise dos polimorfismos de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) e AP-PCR são exemplos de técnicas moleculares utilizadas para a detecção da variabilidade genética desses micro-organismos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar molecularmente *Candida* spp. clinicamente importantes. Foram estudadas 82 leveduras do gênero *Candida*, 73 isolados clínicos e nove cepas padrão de referência da “American Type Culture Collection” (ATCC). O DNA genômico foi extraído através de lise mecânica/química e fenol-clorofórmio. Após amplificação com iniciadores ITS1 e ITS4, os produtos da PCR foram digeridos com as enzimas *DdeI*, *HaeIII*, *BfaI* e *MspI*. Outra amplificação foi realizada com o iniciador arbitrário AP-4. A identificação fenotípica revelou a frequência de 38% de *C. parapsilosis*, 33% de *C. albicans*, 27,5% de *C. tropicalis* e 1,5% de *C. guilliermondii*. Após amplificação, foi possível identificar e diferenciar as espécies *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *C. famata* e *C. glabrata*. A diferenciação entre *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* não foi bem evidenciada com as enzimas *DdeI* e *HaeIII*. Porém, *MspI* conseguiu diferenciar *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae* e *C. famata*, juntamente com *BfaI* que separou *C. albicans* de *C. dubliniensis*. Já a técnica de AP-PCR com o iniciador AP-4, possibilitou a distinção das nove espécies cepas padrão ATCC de *Candida*, pois todas apresentaram perfis de amplificação com número, intensidade e tamanho de banda específico, onde cada espécie foi alocada em grupo distinto e a relação de similaridade variou de 38-69%, ratificando o poder de diferenciação das espécies. As técnicas moleculares foram reprodutíveis e relativamente rápidas, de fácil interpretação e podem ser aplicadas na identificação de espécies clinicamente importantes de *Candida* para auxílio no diagnóstico mais rápido e tratamento mais eficiente.

Palavras-chave: Candidemia, AP-PCR, PCR-RFLP, *Candida*.



## Abstract

---

The incidence of candidemia has increased in recent years and the spectrum of *Candida* species has changed with the emergence of non-*albicans* species and antifungal resistance increased. The PCR analysis of polymorphisms associated to restriction fragment (PCR-RFLP) and AP-PCR are examples of molecular techniques used for detection of genetic variability of these micro-organisms. The objective of this study was to characterize molecularly *Candida* spp. clinically important. We studied 82 *Candida* species, 73 clinical isolates and nine reference standard strains of "American Type Culture Collection" (ATCC). Genomic DNA was extracted by mechanical lysis/phenol-chloroform and chemistry. After amplification with primers ITS1 and ITS4, the PCR products were digested with the enzyme *Ddel*, *HaeIII*, *MspI* and *BfaI*. Another amplification was performed using the arbitrary primer AP-4. The phenotypic identification showed the frequency of 38% of *C. parapsilosis*, 33% of *C. albicans*, 27.5% of *C. tropicalis* and 1.5% of *C. guilliermondii*. After amplification, it was possible to identify and differentiate the species *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *C. famata* and *C. glabrata*. The differentiation between *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* was not clearly demonstrated by the restriction with the enzymes *Ddel* and *HaeIII*. However, *MspI* able to distinguish *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae* and *C. famata*, together with *BfaI* which separated *C. albicans* and *C. dubliniensis*. Already the AP-PCR technique with the primer AP-4, enabled the differentiation of the strains ATCC nine species of *Candida*, since all showed amplification profiles with the number, intensity and size specific band where each species was allocated in distinct group and the relation of similarity ranged from 38-69%, confirming the power of differentiation of species. Molecular techniques were reproducible and relatively fast, easy to interpret and may be applied in the identification of clinically important species of *Candida* to aid in the diagnosis faster and more efficient treatment.

Keywords: Candidemia, AP-PCR, PCR-RFLP, *Candida*.

## Lista de Figuras

---

<b>Figura 01</b>	Patogênese da candidemia e candidíase invasiva.	21
<b>Figura 02</b>	Esquema representativo das regiões do espaço intergênico (ITS) do rDNA.	36
<b>Figura 03</b>	Sítio de restrição das enzimas <i>Ddel</i> , <i>HaeIII</i> , <i>Bfal</i> e <i>MspI</i> .	48
<b>Figura 04</b>	Frequência de isolados clínicos de <i>Candida</i> spp. de UTI neonatal.	51
<b>Figura 05</b>	Integridade do DNA genômico de isolados clínicos de <i>Candida</i> de uma UTI neonatal, em gel de agarose a 0,8%.	51
<b>Figura 06</b>	Produtos de amplificação da região ITS das cepas ATCC de <i>Candida</i> , em gel de agarose a 1%.	52
<b>Figura 07</b>	Produtos da amplificação da região ITS de isolados de <i>Candida</i> de UTI neonatal, em gel de agarose a 1%.	52
<b>Figura 08</b>	Mapa de restrição da região ITS de cepas ATCC de <i>Candida</i> spp., pela enzima <i>Ddel</i> .	53
<b>Figura 09</b>	Perfis de RFLP da região ITS de cepas padrão ATCC de <i>Candida</i> obtidos por restrição com enzima <i>Ddel</i> , em gel de agarose a 2,5%.	54
<b>Figura 10</b>	Perfis de RFLP da região ITS de isolados de <i>Candida</i> de UTI neonatal obtidos por restrição com enzima <i>Ddel</i> , em gel de agarose a 2,5%.	54
<b>Figura 11</b>	Mapa de restrição da região ITS de cepas ATCC de <i>Candida</i> spp., pela enzima <i>HaeIII</i> .	55
<b>Figura 12</b>	Perfis de RFLP da região ITS de cepas padrão ATCC de <i>Candida</i> obtidos por restrição com enzima <i>HaeIII</i> , em gel de agarose a 2,5%.	56
<b>Figura 13</b>	Perfis de RFLP da região ITS de isolados de <i>Candida</i> de UTI neonatal obtidos por restrição com enzima <i>HaeIII</i> , em gel de agarose a 2,5%.	56

<b>Figura 14</b>	Mapa de restrição da região ITS de cepas ATCC de <i>Candida</i> spp., pela enzima <i>Bfal</i> .	57
<b>Figura 15</b>	Perfis de RFLP da região ITS de cepas padrão ATCC de <i>Candida</i> obtidos por restrição com enzima <i>Bfal</i> , em gel de agarose a 2,5%.	58
<b>Figura 16</b>	Perfis de RFLP da região ITS de isolados de <i>Candida</i> de UTI neonatal obtidos por restrição com enzima <i>Bfal</i> , em gel de agarose a 2,5%.	58
<b>Figura 17</b>	Mapa de restrição da região ITS de cepas ATCC de <i>Candida</i> spp., pela enzima <i>Mspl</i> .	59
<b>Figura 18</b>	Perfis de RFLP da região ITS de cepas padrão ATCC de <i>Candida</i> obtidos por restrição com enzima <i>Mspl</i> , em gel de agarose a 2,5%.	60
<b>Figura 19</b>	Perfis de RFLP da região ITS de isolados de <i>Candida</i> de UTI neonatal obtidos por restrição com enzima <i>Mspl</i> , em gel de agarose a 2,5%.	60
<b>Figura 20</b>	Perfis de amplificação por AP-PCR de cepas padrão ATCC de <i>Candida</i> , em gel de agarose a 2%	61
<b>Figura 21</b>	Perfis de amplificação por AP-PCR de isolados clínicos de <i>Candida albicans</i> , em gel de agarose a 2%.	62
<b>Figura 22</b>	Perfis de amplificação por AP-PCR de isolados clínicos de <i>Candida tropicalis</i> , em gel de agarose a 2%.	63
<b>Figura 23</b>	Perfis de amplificação por AP-PCR de isolados clínicos de <i>Candida parapsilosis</i> , em gel de agarose a 2%.	63
<b>Figura 24</b>	Perfis de amplificação por AP-PCR de <i>Candida</i> , em gel de agarose a 2%.	64
<b>Figura 25</b>	Dendograma de perfis de amplificação por AP-PCR de cepas padrão ATCC e isolados de <i>Candida</i> obtido com Coeficiente de Dice e UPGMA.	65

<b>Figura 26</b>	Dendograma dos perfis de amplificação por AP-PCR de cepas ATCC de <i>Candida</i> obtido com Coeficiente de Dice.	66
<b>Figura 27</b>	Dendograma dos perfis de amplificação por AP-PCR de isolados de <i>Candida albicans</i> obtido com Coeficiente de Dice.	67
<b>Figura 28</b>	Dendograma dos perfis de amplificação por AP-PCR de isolados de <i>Candida tropicalis</i> obtido com Coeficiente de Dice.	68
<b>Figura 29</b>	Dendograma dos perfis de amplificação por AP-PCR de isolados de <i>Candida parapsilosis</i> obtido com Coeficiente de Dice.	69
<b>Figura 30</b>	Dendograma dos perfis de amplificação por AP-PCR de isolados de <i>Candida</i> obtido com Coeficiente de Dice.	70

## Lista de Tabelas

---

<b>Tabela 01</b>	Estimativa de massa dos fragmentos de DNA do fago $\lambda$ digerido pela enzima <i>HindIII</i> .	46
<b>Tabela 02</b>	Tamanho esperado dos produtos de PCR da região ITS de <i>Candida</i> com base em sequência de nucleotídeos obtidos no GenBank.	47

## Lista de Abreviaturas

---

<b>AP-PCR</b>	“Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction”
<b>ASD</b>	Ágar Sabouraud dextrose
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>INCQS</b>	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
<b>ITS</b>	Regiões do espaço intergênico
<b>LPMC</b>	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PCR-RFLP</b>	PCR associada ao Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição
<b>RAPD</b>	“Random Amplified Polymorphic DNA”
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>UPGMA</b>	“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”
<b>UTI</b>	Unidades de Terapia Intensiva
<b>UV</b>	Ultra Violeta
<b>YCB</b>	“Yeast Carbon Base”
<b>YNB</b>	“Yeast Nitrogen Base”

# SUMÁRIO

<b>1.0 Introdução</b>	15
<b>2.0 Revisão da literatura</b>	17
2.1 Patogênese da Candidemia	18
2.2 Agentes etiológicos da Candidemia	22
2.3 Epidemiologia das Candidemias	27
2.4 Identificação de espécies de <i>Candida</i> spp.	30
2.4.1 Caracterização bioquímica	30
2.4.2 Caracterização molecular	33
<b>3.0 Objetivos</b>	38
<b>4.0 Material e métodos</b>	40
4.1 Micro-organismos	41
4.1.1 Isolados clínicos	41
4.1.2 Cepas padrão	41
4.1.3. Estoque e manutenção	41
4.2 Caracterização fenotípica	41
4.2.1 Identificação bioquímica	41
4.2.1.1 Produção de tubo germinativo	42
4.2.1.2 Micromorfologia em ágar arroz	42
4.2.1.3 Crescimento a temperatura de 42°C	42
4.2.1.4 Assimilação de Carbono e Nitrogênio	43
4.2.1.5 Fermentação de carboidratos	43
4.2.1.6 Determinação da enzima urease	44
4.2.1.7 Semeadura em meio cromogênico	44
4.3 Caracterização genotípica	44

4.3.1	Extração do DNA genômico	44
4.3.2	Quantificação do DNA genômico	45
	Reação em Cadeia da Polimerase associada ao	
4.3.3	Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP)	46
4.3.4	Construção do mapa de restrição	47
4.3.5	Reação em Cadeia da Polimerase utilizando primer arbitrário (AP-PCR)	48
	4.3.5.1 Análise dos padrões eletroforéticos	48
<b>5.0</b>	<b>Resultados</b>	<b>50</b>
<b>6.0</b>	<b>Discussão</b>	<b>71</b>
<b>7.0</b>	<b>Conclusão</b>	<b>87</b>
<b>8.0</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>89</b>
	<b>Referências</b>	<b>91</b>





Leveduras do gênero *Candida* são micro-organismos redondos ou ovalados, Gram positivos, que causam uma variedade de infecções denominadas candidíases. Clinicamente, essas infecções apresentam cronicidade variada, sintomas diversos, a depender do estado do sistema imunológico do hospedeiro que está infectado. Candidemia é um termo utilizado na clínica médica quando a *Candida* se encontra na corrente sanguínea. Essa infecção ocorre mais frequentemente, em pacientes que estão em tratamento quimioterápico, com doenças debilitantes, acometidos pelo vírus da imunodeficiência adquirida, ou que se encontram internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), principalmente nos limites etários, os idosos e os recém-nascidos. Em UTI neonatal, respondem por quase 80% das fungemias e a *Candida* está entre os cinco patógenos mais comuns por infecções da corrente sanguínea nosocomial, com taxa de mortalidade alta.

A incidência de candidemia tem aumentado nos últimos anos e as espécies, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* normalmente são as mais frequentemente isoladas no laboratório clínico, sendo *C. parapsilosis* a espécie mais prevalente entre os neonatos. Esse espectro tem mudado com a emergência das espécies não-*albicans* e com o aumento da resistência antifúngica. Nesse sentido, torna-se importante a identificação desses micro-organismos em nível de espécie. O processo de identificação de leveduras através de técnicas bioquímicas tradicionais é demorado e pouco confiável. Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética permitindo a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma desses micro-organismos.

Sendo assim, nosso grupo, que vem trabalhando na linha de caracterização fenotípica de leveduras, identificando isolados clínicos bioquimicamente, determinando fatores de virulência e susceptibilidade antifúngica, se motivou a dar início à caracterização genotípica e implantar metodologias de biologia molecular no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFBA, sendo esse o primeiro trabalho de *Candida* que será publicado. Além disso, os resultados desse trabalho contribuirão para caracterizar o perfil epidemiológico das infecções por *Candida* permitindo, através da metodologia utilizada para identificar as espécies mais prevalentes de uma forma mais rápida e confiável.



## 2.1 Patogênese da candidemia

O gênero *Candida* está classificado no Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae (GUARRO, GENE, STCHIGEL, 1999; RIBEIRO et al., 2004; BUTLER et al., 2010). Trata-se de micro-organismos eucarióticos, que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou gemulação, dando origem a células que se denominam blastoconídios e fazem ciclo sexual incompleto. São unicelulares e pleomórficos assumindo forma ovóide ou esférica. Além de colonizar o homem, podem ser encontrada no solo, água, vegetais, alimentos e em diversos ambientes, inclusive hospitalares. Degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, elementos essenciais para seu desenvolvimento (LACAZ et al., 2002; GIOLO, SVIDZINSKI, 2010).

Estão presentes na microbiota da pele e na mucosa do homem e podem ser adquiridas através da passagem do feto via canal vaginal. Logo após o nascimento, são encontradas na cavidade bucal do recém-nascido e duas a três semanas em todo trato gastrointestinal da criança. Posteriormente, habitam comensalmente o organismo do homem, podendo ser encontradas no trato respiratório, intestinal, mucosa vaginal, cavidade oral e pele (RIBEIRO et al., 2004; BARBEDO, SGARBI, 2010).

Os primeiros relatos de lesões causadas por *Candida* no homem foram feitos por Hipócrates (460 a 337 a.C.) e sua descrição referia-se às placas esbranquiçadas presentes na cavidade bucal de recém-nascidos e pacientes debilitados. Foram observadas estas mesmas lesões em crianças enfermas por Galeno (200 a 130 a.C.), já que a manifestação clínica de candidíase bucal em recém-nascidos já era frequente na Europa no século XVIII. Em 1839, Langenbeck observou pela primeira vez, em aftas bucais de um paciente com febre tifóide, leveduras do gênero *Candida* e classificou erradamente esse micro-organismo como agente etiológico da doença (HAZEN, 1995; SIDRIM, ROCHA, 2004).

David Gruby, em 1842, classificou esse micro-organismo no gênero *Sporotrichum*, definiu a candidíase oral e apresentou o primeiro caso de candidíase frente à Academia de Ciências de Paris, na França. Em 1846, Berg definiu a relação da levedura com a candidíase oral e, além disso, demonstrou a presença de *Candida* na boca de crianças saudáveis. Charles Robin, em 1853, denominou esse

micro-organismo de *Oidium albicans*. Anos depois, em 1861, Zenker, descreveu o primeiro paciente acometido de infecção cerebral por disseminação hematogênica por *Candida* na Alemanha. Já em 1890, Zopf renomeou esse micro-organismo de *Monilia albicans* e, somente em 1923, Berkhout transferiu essa espécie para o gênero *Candida* e criou a espécie *C. albicans* (HAZEN, 1995; RIBEIRO et al., 2004).

Portanto, infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* são denominadas candidíases e podem ser agudas ou crônicas, com lesões superficiais ou profundas (SIDRIM; ROCHA, 2004; BARBEDO; SGARBI, 2010). A candidíase mucocutânea acomete a cavidade oral e o canal vaginal, sendo a candidíase oral, conhecida como “sapinho”, a forma mais comum nos seres humanos. As causas predisponentes a infecção são as alterações na microbiota normal após uso de antibióticos prolongados, pH baixo das secreções salivares dos recém-nascidos, hipertrofia das papilas da língua e glossite crônica. Já na candidíase cutânea, há o comprometimento de áreas úmidas do corpo, como espaços interdigitais, regiões das mamas, axilas, pregas das virilhas e debaixo de unhas (LACAZ et al., 2002; ZAITZ et al., 2010).

Quando a infecção ocorre no sangue é chamada de candidemia, e neste caso, pode ocorrer disseminação aos múltiplos órgãos, resultando na formação de micro-abscessos, abscessos renais e hepatoesplênicos, endocardite, meningite, artrite, osteomielite, dentre outros (BARBEDO, SGARBI, 2010; VALLE et al., 2010). A forma disseminada da candidíase ocorre em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), com doenças debilitantes, neoplasias, doenças imunossupressoras e após transplantes de órgãos. Nesses casos, pode atingir diferentes órgãos e tecidos como pulmões, meninges, rins, bexiga, articulações, fígado, coração e olhos (SIDRIM, ROCHA, 2004; KONEMAN et al., 2008; BARBEDO, SGARBI, 2010).

A capacidade do micro-organismo de provocar uma infecção no organismo do hospedeiro está relacionada com sua virulência e a evolução desse processo patogênico resulta da interação entre os fatores de virulência do agente e os mecanismos de defesa do hospedeiro, podendo ocasionar um quadro de doença. A patogenicidade do micro-organismo é mediada por diversos fatores que podem desencadear respostas diferentes do hospedeiro e quando este for capaz de ser oferecer um habitat ideal para proliferação do micro-organismo, e conseqüentemente, o estabelecimento da infecção. A caracterização dos fatores de virulência de

agentes infecciosos tem demonstrado ser complexa e multifatorial, podendo ser esses fatores distintos em dois tipos: os que promovem colonização e invasão e os que causam danos ao hospedeiro. Alguns fatores de virulência compreendem capacidade de adesão e invasão das células como produção de biofilme, dimorfismo, composição da parede celular e secreção de enzimas (MENDES-GIANNINI et al., 1997; GIOLO, SVIDZINSKI, 2010).

A aderência dos micro-organismos patogênicos aos tecidos é considerada a primeira etapa na colonização e disseminação. A aderência de um micro-organismo aos tecidos do hospedeiro também é avaliada de acordo com a sua capacidade de formar biofilmes, na qual os micro-organismos formam agregados, gerando estruturas multicelulares que aderem a superfícies. Sua formação ocorre em resposta a uma variedade de condições, incluindo alta densidade celular, privação de nutrientes e estresse físico ambiental (YANG, 2003; ÁLVARES, SVIDZINSKI, CONSOLARO, 2007).

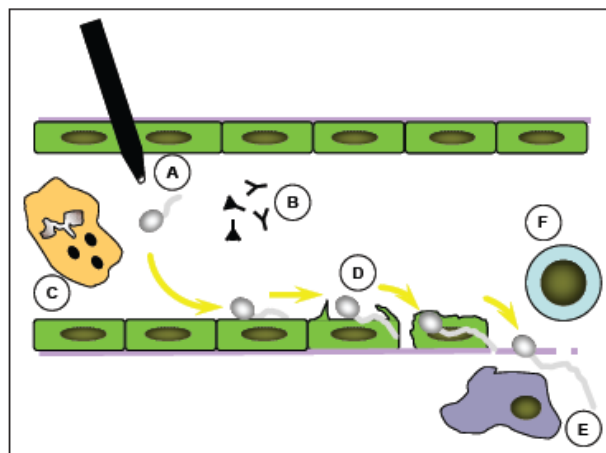
A capacidade de produzir enzimas hidrolíticas é considerada como um importante fator de virulência. Dentro do gênero *Candida*, as principais enzimas são as proteinases, que hidrolisam ligações peptídicas, e as fosfolipases, que hidrolisam os fosfoglicerídeos. Essas enzimas são, portanto, capazes de promover destruição nas membranas celulares por meios hidrolíticos (CANDIDO, AZEVEDO, 2000; YANG, 2003). O processo de adesão e invasão nos fungos envolve os componentes da parede celular, tais como polissacarídeos e glicoproteínas. Os produtos exocelulares com atividade enzimática possuem papel importante na patogênese de uma infecção e a produção de proteinases e fosfolipases são indicadas como fatores relacionados à instalação e a posterior disseminação no organismo do hospedeiro. As proteinases e as fosfolipases possuem papel na aderência e na persistência do patógeno nas superfícies de mucosas, na invasão dos tecidos do hospedeiro e na digestão de imunoglobulinas (MENDES-GIANNINI, 1997; ÁLVARES, SVIDZINSKI, CONSOLARO, 2007).

Fatores patológicos, fisiológicos, mecânicos e iatrogênicos, podem vir a modificar o relacionamento que ocorre entre o hospedeiro e a microbiota autóctone, tornando a levedura capaz de aderir, penetrar e se multiplicar. A suscetibilidade as infecções por *Candida* está relacionada com alterações no sistema imunológico e com o desequilíbrio da microbiota. Os extremos do ciclo de vida humana, infância e velhice, constituem, sem dúvida, as fases de existência do homem a ocorrência de

candidíase é mais comum, em decorrência da imaturidade ou deficiência fisiológica do sistema imune (YANG, 2003; RIBEIRO et al., 2004).

A maioria dos autores sugere que grande parte dos casos de candidemia seja adquirida por via endógena, pela translocação da levedura através do trato gastrointestinal, local onde há colonização por *Candida* em até 70% da população humana normal. A presença de uma predisposição local e/ou generalizada que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal pode ser um agente facilitador de translocação da levedura até os capilares mesentéricos (COLOMBO et al., 1996; RIBEIRO et al., 2004; GIOLO, SVIDZINSKI, 2010; BOW et al., 2010) (Figura 01).

**Figura 01: Esquema representativo da patogênese da candidemia e candidíase invasiva.**



Fonte: BOW et al., modificado, 2010. (A) Penetração de células de *Candida* no espaço endovascular, através de translocação intestinal e/ou procedimentos invasivos; (B) Multiplicação das células da levedura na corrente sanguínea; (C) Interação com componentes solúveis do soro e neutrófilos circulantes; (D) Adesão e penetração do micro-organismo no endotélio vascular com acesso aos órgãos profundos, onde interagem com células dendríticas (E); (F) Ativação da resposta imune.

Essas infecções também podem ser adquiridas por via exógena, através do contato das mãos de profissionais de saúde, em pacientes portadores de cateteres vasculares em posição central, implante de próteses contaminadas, bem como pela administração parenteral de soluções contaminadas. A transmissibilidade de *Candida* spp. e a alta prevalência de contaminação das mãos de profissionais de saúde em UTIs identificam esses profissionais como potenciais reservatórios na transmissão destes agentes a pacientes de alto risco (PFALLER et al., 1995; COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; RIBEIRO et al., 2004; BOW et al., 2010).

## 2.2 Agentes etiológicos da Candidemia

Atualmente, existem cerca de 200 espécies de leveduras do gênero *Candida* e, no início do século XX, acreditava-se que a única espécie patogênica para o homem era *C. albicans*. No entanto, a partir da década de 1950, estudos demonstraram outras espécies que possuem importância médica e, atualmente, cinco delas estão envolvidas em 90% das infecções: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (SULLIVAN et al., 1996; CANTÓN, VIUDES, PEMÁN, 2001; COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; RIBEIRO et al., 2004; MALUCHE et al., 2008; BARBEDO, SGARBI, 2010; BUTLER, 2010; VALLE et al., 2010).

Entretanto, um número progressivo de casos de micoses superficiais e sistêmicas relacionadas a espécies emergentes de *Candida* têm sido descritos, dentre elas: *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspícua*, entre outras. Esse fato se deve, em parte, ao avanço e aprimoramento das técnicas de identificação micológica, número crescente de pacientes imunossuprimidos e, em paralelo, ao aumento de patógenos que emergiram como oportunistas (HAZEN, 1995; PFALLER et al., 1995; COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; GODOY et al., 2003; PFALLER, DIEKEMA, 2007; GÓMEZ et al., 2010; VALLE et al., 2010).

*C. albicans* é comensal da vagina e do trato gastrointestinal de seres humanos, sendo a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e sistêmicas em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todas as partes do mundo (FRIDKIN, JARVIS, 1996; PFALLER et al., 2001; GODOY et al., 2003; CAPRILES et al., 2005; COLOMBO et al., 2006; BARBERINO et al., 2006; ZICKER et al., 2011; NGUYEN et al., 2012). O seu potencial patogênico é bastante conhecido e apresenta como principais fatores de virulência, capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, termotolerância significativa e produção de enzimas como proteinases e fosfolipases. Habitualmente, se considera que a origem de *C. albicans* causadora de infecções, seja a microbiota do trato digestivo humano, porém diversos casos de transmissão horizontal têm sido relatados (FRIDKIN, JARVIS, 1996; RAMAGE et al., 2001; YANG, 2003).

Isolados clínicos de *C. albicans* são naturalmente sensíveis a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, porém casos de resistência adquirida a azólicos já



foram descritos, principalmente, em pacientes que foram expostos prolongadamente a estes medicamentos. *C. albicans* foi o primeiro fungo que teve o seu genoma sequenciado, o que possibilita uma variedade de experimentos e, por conseguinte, um grande avanço na biologia deste fungo, principalmente na expressão dos genes (FRIDKIN, JARVIS, 1996; TOBUDIC et al., 2010; BARBEDO, SGARBI, 2010).

A espécie *C. dubliniensis* foi descrita inicialmente em 1995 em Dublin, Irlanda, onde pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA) eram colonizados por este agente na cavidade oral. Com a utilização de métodos moleculares, foi reconhecida como uma nova espécie, apesar de possuir características fenotípicas e genotípicas semelhantes a *C. albicans* (MARIANO et al., 2003; MIRHENDI et al., 2005; NEPPELENBROEK et al., 2006). Atualmente, ainda são raros os casos de doenças sistêmicas relacionadas a esta espécie, sendo a maior parte dos casos associados a infecções de mucosa oral (CHAVASCO et al., 2006; BARADKAR, MARTHUR, KUMAR, 2008; BRITO et al., 2010). Existem estudos baseados na diferença de virulência entre *C. dubliniensis* e *C. albicans*, com modelos em animais, sendo observado que a *C. dubliniensis* tem uma menor capacidade de produzir hifas, resultando em menores níveis de colonização e invasão tecidual, além de ter facilidade em desenvolver resistência a azólicos (LINARES et al., 2007; LORETO et al., 2010).

Estudos mostram que *C. tropicalis* possui considerável potencial biológico como agente oportunista e frequentemente causa de candidemias em adultos, especialmente em pacientes com linfoma, leucemia, complicações hematológicas malignas, *diabetes mellitus*, apresentando-se mais virulenta que *C. albicans*, com uma alta taxa de mortalidade. Em contrapartida, é raro encontrar esta espécie em neonatos, porém o potencial de transmissão nosocomial não é descartado (RANI et al., 2002; GOLDANI, MÁRIO, 2003; NUCCI, COLOMBO, 2007). Em países da América Latina, particularmente no Brasil, esta espécie é extremamente frequente, constituindo-se um dos principais agentes de candidemia. Os isolados clínicos desta espécie são sensíveis a anfotericina B e, na grande maioria das vezes, aos triazólicos (COLOMBO et al., 1999; GODOY et al., 2003; PFALLER et al., 2004a).

*C. krusei* é um patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea, além de pacientes idosos. As casuísticas revelam que essa espécie é mais frequente nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa do que na

América Latina como agente etiológico de candidemias (GOLDMAN et al., 1993; GODOY et al., 2003; ALMIRANTE et al., 2005; BONATTI et al., 2009; LEROY et al., 2009). É intrinsecamente resistente ao fluconazol e, talvez, por conta disso, nota-se o aumento de fungemias por esse agente em pacientes neutropênicos expostos a este antifúngico, além de altas taxas de mortalidade. O fenótipo de resistência exibido por *C. krusei* é um problema para o tratamento de pacientes em geral, principalmente grupos de imunocomprometidos e, assim como a *C. glabrata*, é considerada uma importante espécie a ser monitorada com relação à resistência antifúngica (PFALLER et al., 2004b; PORTE et al., 2012).

Já *C. parapsilosis* caracteriza-se como um micro-organismo ubíquo comumente isolado do ambiente, do solo, da água e de plantas, além de ser encontrado frequentemente na pele humana, emergindo como um importante patógeno com transmissão predominantemente exógena (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; ALMIRANTE et al., 2006; BARBEDO, SGARBI, 2010). Desde a década de 1980, apresenta-se como um importante patógeno hospitalar de fungemias e, juntamente com a espécie *C. tropicalis*, são a principal causa de candidemias em adultos na América Latina após *C. albicans*. Sua frequência é ainda maior em crianças e recém-nascidos prematuros, internados em UTI, com prevalência de até 50%. Está associada ao uso de cateteres e de nutrição parenteral com manifestações clínicas que incluem fungemias, endocardites, endoftalmites, artrites e peritonites. Os isolados clínicos desta espécie são geralmente sensíveis a anfotericina B e aos derivados azólicos (RIBEIRO et al., 2004; GODOY et al., 2003; MEDRANO et al., 2006; CUGNO, CESARO, 2012). Atualmente, duas novas espécies, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, foram propostas para substituir a denominação de *C. parapsilosis* grupo I e II, respectivamente, formando o complexo “psilosis”, com as três espécies: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. A diferenciação foi realizada com base em diversos critérios, incluindo análise de DNA, eletroforese de isoenzimas, eletroforese de cariótipos, morfotipos, sequências de DNA mitocondrial e habilidade de produção de biofilmes (TAVANTI et al., 2005; ASBECK et al., 2007; ASADZADEH et al., 2009; TAVANTI et al., 2010).

A espécie *C. glabrata* apresenta-se micro morfologicamente como blastoconídio tanto no ambiente como quando patógeno e, especialmente, não forma pseudo-hifas. Nas duas últimas décadas, surge como emergente agente de infecções oportunistas em seres humanos, chegando a ser o segundo ou terceiro

patógeno em casos de candidemia nos EUA e na Europa, principalmente em ambientes hospitalares, como consequência do uso de drogas imunodepressoras e com o advento da SIDA (FIDEL et al., 1999; PFALLER et al., 2004b). Estudos demonstram que a incidência de *C. glabrata* tem aumentado como causa de candidemia em UTIs nos EUA desde 1993, entretanto, em outras partes do mundo, estudos sugerem que as taxas de infecção por *C. glabrata* não aumentaram na mesma proporção como observado nos EUA. Além disso, a taxa de mortalidade é relativamente alta, comparando com a de outras espécies de *Candida não-albicans*, e é apontada como causa de sepse neonatal e infecção em pacientes idosos. Isolados clínicos de *C. glabrata* demonstram sensibilidade intrinsecamente reduzida aos compostos azólicos e, com isso, aumento nas taxas de colonização e infecção tem sido observadas em diferentes grupos de pacientes com exposição prolongada ao fluconazol (COLOMBO et al., 1999; FIDEL et al., 1999; MALANI et al., 2005; PANACKAL et al., 2006; COLOMBO et al., 2012).

As infecções por *C. guilliermondii* ainda não são frequentes, porém é um agente de candidíase emergente. A maioria dos casos antigos de infecção por *C. guilliermondii* estavam associados a onicomicoses, porém, atualmente, já existem relatos de candidemia em pacientes com câncer, neutropênicos, transplantados e internados em UTIs (NUCCI et al., 1998; KRCMERY, BARNES, 2002; GIRMENIA et al., 2006). Em relação a seu tratamento, apesar do número limitado de informações disponíveis na literatura, há relatos de resistência *in vitro* de amostras clínicas à anfotericina B e o tratamento pode apresentar problemas, sobretudo para pacientes imunodeprimidos, pois uma grande porcentagem de linhagens vem diminuindo a sensibilidade para azóis (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; BARBEDO, SGARBI, 2010).

*C. famata*, também conhecida como *Torulopsis candida*, é usualmente encontrada em alguns alimentos, incluindo laticínios e pode ser isolada da cavidade oral do homem, onde vive como comensal. Anteriormente, *C. famata* não era considerada patogênica para os seres humanos, porém, hoje já existem relatos de fungemias, endoftalmites e infecções no sistema nervoso central (RAO et al., 1991; PRINSLOO et al., 2003; CARRASCO et al., 2005; RAMOS et al., 2008). Em 1986, St-Germain e Laverdiere, relataram o primeiro caso de fungemia, associado ao uso de cateter, causada por *C. famata*. Em relação ao tratamento, essa espécie é menos

suscetível aos azólicos em comparação com *C. albicans* (PFALLER, DIEKEMA, 2004b; BARBEDO, SGARBI, 2010).

Em 1959, *C. lusitaniae* foi isolada pela primeira vez a partir do trato gastrointestinal de animais e, em 1979, isolada como patógeno humano de um paciente com leucemia mielóide aguda (PAPPAGIANIS et al., 1979). Esta espécie tem sido reconhecida como um agente patogênico oportunista humano e isolada de sangue, urina, trato respiratório e líquido. Apesar da baixa virulência, fungemia por *C. lusitaniae* tem sido associada a uma elevada taxa de mortalidade devido à sua resistência natural ou adquirida à anfotericina B, porém o mecanismo genético desta resistência é desconhecido (GUINET et al., 1983; MERZ, 1984; MINARI et al., 2001; FAVEL et al., 2004).

*C. kefyr*, também chamada de *C. pseudotropicalis*, é comumente encontrada em produtos industrializados, principalmente, laticínios. Extremamente rara como patógeno humano, pode causar fungemias, esofagites, meningoencefalites. Ocorre, principalmente, em pacientes imunodeprimidos, transplantados e com câncer, sendo isolada em menos de 1% das amostras quando comparada com outras espécies. Já foi isolada da cavidade oral, fezes e vagina, mas o grau de colonização é extremamente baixo em comparação a outras espécies (MORGAN et al., 1984; REUTER et al., 2005; WEICHERT et al., 2012).

*C. haemulonii* foi isolada pela primeira vez em 1962 do intestino do trematódeo *Haemulon scirus*. Atualmente, *C. haemulonii* é um agente emergente responsável por fungemias, com casos já descritos em neonatos, pacientes diabéticos e com neoplasias (KHAN et al., 2007; KIM et al., 2009). Lehmann e colaboradores (1993) descreveram dois grupos geneticamente distintos dentro da espécie (grupo I e II), com base em perfis isoenzimáticos, reações envolvendo DNA e características fisiológicas. A identificação de *C. haemulonii* é complicada devido à semelhança fenotípica com *C. famata* e *C. guilliermondii*. Seus isolados demonstram um aumento na resistência para fluconazol, itraconazol e anfotericina B (LEHMANN et al., 1993; KIM et al., 2009; KIM et al., 2011).

*C. lipolytica* é um micro-organismo ubíquo, geralmente isolado de carnes refrigeradas, derivados de petróleo, materiais de agricultura, plantas e solo. Não é um agente frequente de infecção oportunista, mas já foram relatados casos de infecções oculares e fungemias persistentes relacionadas ao uso de cateter venoso central. Além disso, estudos mostram que *C. lipolytica* é capaz de produzir biofilme

e, geralmente, é suscetível a anfotericina B e aos derivados azólicos (WALSH et al., 1989; SHIN et al., 2000; D'ANTONIO et al., 2002; BARBEDO, SGARBI, 2010).

*C. rugosa* possui um papel importante como agente fúngico na medicina veterinária, pois é frequentemente isolado de casos de mastites em bovinos, entretanto, ainda é raramente isolado de espécimes humanos. A partir de 1985, foram relatados casos de fungemia em duas diferentes instituições nos EUA (REINHARDT et al., 1985; SUGAR et al., 1985) e episódios de candidemia já foram reportados no Brasil (COLOMBO et al., 1999; COLOMBO et al., 2003b). *C. rugosa* coloniza frequentemente pacientes de alto risco internados em UTIs e exibe uma redução da sensibilidade a poliênicos e ao fluconazol (HERNANDEZ et al., 2004; PFALLER et al., 2006).

### 2.3 Epidemiologia das Candidemias

Infecções na corrente sanguínea causadas por leveduras do gênero *Candida* são cada vez mais frequentes em UTIs, incluindo UTI neonatal, respondendo por 70 a 80% das fungemias e representando o quarto grupo mais comum de patógenos responsável por infecção da corrente sanguínea nosocomial, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 40 a 80% (FRIDKIN, JARVIS, 1996; TRICK et al., 2002; BLYTH et al., 2009; STEINBACH, 2010; SHIM et al., 2011).

Vários autores relatam as diferenças nas taxas de incidência de candidemia de acordo com a área geográfica, porém a causa desse contraste ainda não está bem estabelecida. Em geral, os estudos de candidemia no Brasil relatam uma incidência duas vezes maior que em outros países, numa média de 2,49 casos por 1000 internações (COLOMBO et al., 2006). Em contraste, casuísticas em outros países revelam taxas menores de incidência, como por exemplo, nos EUA 0,28-0,96/1000 (WISPLINGHOFF et al., 2004), Canadá 0,45/1000 (MACPHAIL et al., 2002) e países da Europa 0.20-0.38/1000 (TORTORANO et al., 2004).

Dados do “National Nosocomial Infections Surveillance” (NNIS) envolvendo 115 hospitais terciários nos EUA relatam, entre janeiro de 1980 e abril de 1990, que o gênero *Candida* respondeu por 78,3% dos 30477 episódios de infecções fúngicas. Além disso, observou-se um aumento na incidência de duas para 3,8 infecções/1000 internações durante o período do estudo (BECK-SAGUÉ et al., 1993).

O programa SCOPE (Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance) publicou um estudo envolvendo 49 hospitais terciários de várias regiões dos EUA, no período de março de 1995 a setembro de 2002, onde foram documentados 24179 episódios de infecções na corrente sanguínea. O gênero *Candida* foi responsável por 9,5% das infecções e o quarto agente mais comum isolado em hemoculturas, depois de *Staphylococcus* coagulase-negativo (31%), *Staphylococcus aureus* (20%) e *Enterococcus* spp. (9%). A incidência de candidemia foi de 4,6 casos/10.000 internações e a taxa de mortalidade de 39,2%, a maior entre todos os patógenos (WISPLINGHOFF et al., 2004).

Das espécies de *Candida* que causam infecções sistêmicas, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* normalmente representam entre 80 e 90% dos isolados encontrados no laboratório clínico, embora este percentual possa variar dentre determinadas unidades clínicas ao longo do tempo (PFALLER et al., 2001; ALIYU et al., 2006; FRANÇA et al., 2008; HORN et al., 2009; STEINBACH, 2010), sendo a *C. parapsilosis* a espécie mais prevalentemente isolada entre as espécies não-*albicans* em neonatos (SANDVEN et al., 2000; TIRODKER et al., 2003; GOEL et al., 2009).

Pfaller e colaboradores (1998) conduziram um estudo internacional de vigilância de candidemia nos EUA, Canadá e América do Sul, entre janeiro e dezembro de 1997, onde foram relatados 306 episódios de candidemia em 34 centros médicos, 22 nos Estados Unidos, seis no Canadá e seis na América do Sul. Em geral, 53,3% das infecções foram causadas por *C. albicans*, 15,7% *C. parapsilosis*, 15,0% *C. glabrata*, 7,8% *C. tropicalis*, 2,0% *C. krusei*, 0,7% *C. guilliermondii* e 5,8% *Candida* spp. Porém, quando essa distribuição de espécies foi estratificada por país variou significativamente. Nos EUA, 43,8% das candidemias causadas por espécies não-*C. albicans*, onde *C. glabrata* foi a mais comum. No Canadá, a proporção de *C. não-albicans*, 47,5%, foi maior que nos EUA, sendo *C. parapsilosis* a mais comum. Já na América do Sul, *C. albicans* representou 40,5% das candidemias, seguido por *C. parapsilosis* (38,1%) e *C. tropicalis* (11,9%) e apenas um isolado de *C. glabrata*.

Godoy e colaboradores (2003) isolaram 103 leveduras de casos de candidemia, de cinco hospitais terciários de quatro países da América Latina, de março de 1999 a março de 2000, onde *C. albicans* foi a espécie mais frequente e

respondendo por 42%, seguida por *C. tropicalis* (24,2%), *C. parapsilosis* (21,3%), *C. glabrata* (7,7%), *C. guilliermondii* (2,9%) e *C. lusitaniae* (1,9%).

A Confederação Europeia de Micologia Médica, durante setembro de 1997 a dezembro de 1999, notificou um total de 2089 casos de candidemia, de 106 instituições de sete países europeus. Foi reportada uma taxa de incidência de 0,20 a 0,38 casos de candidemia por 1000 admissões, e, além disso, *C. albicans* foi identificada em 56% dos casos, *C. glabrata* em 13,6%, *C. parapsilosis* 13,3 %, *C. tropicalis* 7,2% e outras espécies 9,9% (TORTORANO et al., 2004).

Na Austrália, Blyth e colaboradores (2009) analisaram prospectivamente casos de candidemia em pacientes de UTI neonatal, ao longo de três anos e identificaram 33 casos em recém-nascidos, onde *C. parapsilosis* foi significativamente a espécie mais comum (42,4%), seguida por *C. albicans* 39,4%, *C. glabrata* 9,1%, *C. tropicalis* 3%, *C. dubliniensis* 3% e outras 1%.

No período de janeiro de 2005 a dezembro de 2009, na Grécia, foram identificados 40 casos de candidemia em uma UTI neonatal, onde as espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram as espécies mais recuperadas das hemoculturas, 69 e 24% respectivamente (SPILIOPOULOU et al., 2012).

No Brasil, estudo multicêntrico prospectivo realizado por Colombo e colaboradores (2006), entre março de 2003 a dezembro de 2004, em 11 hospitais de nove cidades brasileiras, revelou 712 casos de episódios de candidemia. No que diz respeito à frequência, *C. albicans* (40,9%), *C. tropicalis* (20,9%), *C. parapsilosis* (20,5%) foram as espécies mais frequentes, seguidas por *C. pelliculosa* (6,2%), *C. glabrata* (4,9%), *C. guilliermondii* (2,4%), *C. krusei* (1,1%) e outros (3,7%).

Gondim e colaboradores (2009) avaliaram as taxas de sepse por *C. albicans* e *C. não-albicans* na UTI neonatal do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, durante janeiro de 2002 a dezembro de 2007. No total, a taxa de sepse foi 13,6%, sendo que as candidemias responderam por 6% das mesmas, correspondendo a 19 casos de candidemia com 47,4% por *C. albicans*, 26,3% por *C. krusei*, 10,53% por *C. parapsilosis*, 5,3% por *C. tropicalis* e 10,5% por *C. glabrata*.

Motta e colaboradores (2010), no Hospital das Clínicas em São Paulo, de janeiro a dezembro de 2006, relataram predominância de *C. albicans* com 50%, nas infecções hematogênicas em pacientes com menos de um ano de idade, enquanto

que *C. parapsilosis* ficou em segundo lugar com 46,9%, seguida de *C. glabrata* com 3,1%.

Foram isoladas 212 leveduras do gênero *Candida* de diferentes espécimes clínicos no Hospital das Clínicas da Escola de Medicina de Botucatu, São Paulo, durante janeiro de 1998 a janeiro de 2005. Os autores relataram frequência global de *C. albicans* (33%), *C. parapsilosis* (31,8%), *C. tropicalis* (17,9%), *C. glabrata* (11,8%), *C. guilliermondii* (4,7%), *C. lusitaniae* (0,9%) e *C. pelliculosa* (0,5%). *C. parapsilosis* foi a espécie mais isolada em amostras de sangue e líquido peritoneal, *C. tropicalis* e *C. glabrata* tiveram alto percentual de isolamento em amostras de urina após *C. albicans*, que demonstrou taxas homogêneas de isolamento nos três tipos de espécimes clínicos (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2011).

## **2.4 Identificação de espécies de *Candida* spp.**

### **2.4.1 Caracterização bioquímica**

O diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas inclui a observação direta de elementos fúngicos nas amostras biológicas, isolamento em cultura, testes bioquímicos e, atualmente, uso de técnicas moleculares. Por conta das peculiaridades apresentadas por diferentes espécies de *Candida*, como, epidemiologia, resistência a antifúngicos, emergência de novas espécies causando infecção, justifica-se a identificação dessas leveduras em nível de espécie principalmente quando relacionadas a doenças sistêmicas (GIOLO, SVIDZINSKI, 2010; ZAITZ et al., 2010).

A observação direta, ou exame direto, é um método presuntivo rápido e de baixo custo, mas na maioria dos casos, não permite a identificação de espécie ou mesmo do gênero dos fungos que não apresentem estruturas morfológicas típicas. O isolamento em cultura ainda é essencial para o processo de diagnóstico e identificação de espécies de fungos, contudo, no caso de *Candida*, cultura e identificação da espécie pode demorar de 5 a 21 dias, em alguns casos, para a obtenção de um resultado definitivo. Além disso, os procedimentos laboratoriais para identificação fúngica, embora simples, requerem pessoal técnico habilitado (LACAZ et al., 2002; ZAITZ et al., 2010).



As espécies do gênero *Candida*, geralmente, crescem bem em meios de composição relativamente simples como o Sabouraud dextrose, desenvolvendo colônias com um aspecto característico. Na sua maioria, produzem colônias glabras, de coloração branca ou bege, úmida e cremosa ou, às vezes, rugosa e seca, com odor característico. Ao microscópio óptico, observam-se células globosas, ovaladas ou alongadas, medindo, em média, de 3 por 7µm a 3 por 14µm, algumas apresentando brotamentos e pseudo-hifas, além de serem Gram-positivas (LACAZ et al., 2002; SIDRIM, ROCHA, 2004; RIBEIRO et al., 2004).

A prova de formação de tubo germinativo permite fazer uma identificação presuntiva das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*, quando as leveduras são incubadas em soro animal ou humano, a 37°C durante cerca de 2 a 3 horas. O tubo germinativo é definido como uma extensão filamentosa da célula leveduriforme com metade da largura e comprimento de três a quatro vezes o diâmetro da célula mãe. É considerado um excelente teste para a identificação presuntiva de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, uma vez que o índice de positividade para este teste é de 94 a 97%. As outras espécies de *Candida*, por exemplo, *C. tropicalis*, não produzem tubo germinativo, podendo apresentar prolongamentos que são pseudo-hifas (SIDRIM, ROCHA, 2004; KONEMAN et al., 2008).

O microcultivo da levedura em ágar fubá-Tween 80 ou ágar arroz-Tween 80, visa diferenciar as estruturas de reprodução assexuada, formadas durante o crescimento do fungo *in vitro*. Quando incubadas em baixa tensão de oxigênio, ocorre o estímulo para a produção de pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídios. Dessa forma, pelas características morfológicas e disposição das diferentes estruturas filamentosas, pode-se sugerir o gênero e até mesmo a espécie da levedura (LACAZ et al., 2002; RIBEIRO et al., 2004; BARBEDO, SGARBI, 2010).

Os testes bioquímicos para a identificação de leveduras baseiam-se na capacidade de assimilação, por via aeróbia ou fermentativa, de diferentes compostos, principalmente de carboidratos. Dentre as provas bioquímicas utilizadas para identificação de leveduras, tem-se a prova de assimilação de fontes de carboidratos e de nitrogênio, auxonograma. O princípio da prova se baseia na capacidade da levedura de crescer aerobicamente na presença de determinada fonte de carboidrato ou nitrogênio como única fonte de energia. Já o zimograma, baseia-se na capacidade das leveduras de fermentar determinados carboidratos

produzindo gás carbônico, na ausência de oxigênio (LARONE et al., 2002; BARBEDO, SGARBI, 2010).

Surgiram na década de 1990 no mercado, os meios cromogênicos com a finalidade de isolar e identificar algumas espécies de *Candida*, como uma forma de triagem. A identificação baseia-se na diferença de coloração das colônias produzidas por reações enzimáticas com substrato cromogênico indicador do meio, após incubação a 35-37°C por 24 a 72 horas. Com esse meio, é possível identificar presuntivamente *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, que geram, respectivamente, colônias de coloração verde, azul e rosa pálido, como por exemplo, o CHROMagar *Candida*® (CHROMagar Company). Além disso, o meio facilita a detecção de culturas mistas com mais de uma espécie de *Candida*. Alguns autores sugerem que isolados da espécie *C. dubliniensis* apresentam coloração verde escura em contrapartida com a espécie *C. albicans* que apresentariam uma coloração verde clara (LACAZ et al., 2002; SIDRIM, ROCHA, 2004; VALLE et al., 2010).

Atualmente, a maior parte dos laboratórios de diagnóstico microbiológico usam sistemas manuais e/ou automatizados vendidos comercialmente, que executam os testes de identificação bioquímica de leveduras. Os sistemas manuais e automatizados existentes no mercado para identificação de leveduras baseiam-se, essencialmente, em provas de assimilação de carboidratos, porém, recomenda-se a realização de provas adicionais, como análise macro e micromorfológica. Contudo, o uso destas ferramentas na maioria dos laboratórios clínicos ainda é limitado por conta do seu custo (SIDRIM, ROCHA, 2004; MALUCHE et al., 2008; ZAITZ et al., 2010).

Esses sistemas consistem em galerias plásticas contendo microcúpulas com carboidratos desidratados, onde se inocula a suspensão da levedura que são incubadas em temperatura e tempo adequados. A leitura é feita por turvação do meio, reação colorimétrica ou mudança do indicador de pH e os resultados são comparados com um banco de dados fornecido pelo fabricante. Os métodos automatizados consistem em sistemas controlados por computador que incubam painéis contendo os substratos desidratados, da mesma forma que os manuais, os quais são reidratados com a suspensão das leveduras e os resultados são automaticamente interpretados. Os sistemas manuais mais conhecidos são AUXACOLOR® (Sanofi Diagnostics-Pausteur), API 20C AUX® (BioMérieux), ID 32C® (BioMérieux), Fungichrom® (International Microbio) e Candifast® (International

Microbio). Já os sistemas automatizados de identificação mais correntemente usados nos laboratórios de diagnóstico microbiológico hospitalar são o VITEK® (BioMérieux) e o WalkAway® (Baxter Diagnostic, Inc., WestSacramento, California) (MALUCHE et al., 2008; ZAITZ et al., 2010).

#### **2.4.2 Caracterização molecular**

Os métodos de identificação de leveduras baseados em caracterização fenotípica e bioquímica apresentam algumas deficiências, já que alguns grupos de leveduras apresentam poucas variações morfológicas. Além disso, consomem tempo desde o isolamento até o diagnóstico definitivo, principalmente, no caso de espécies pouco frequentes. Com isso, devido às limitações dos métodos clássicos para a identificação desses novos agentes de infecções fúngicas sistêmicas e à alta taxa de mortalidade associada a essas infecções, torna-se essencial o desenvolvimento de métodos específicos, sensíveis, rápidos e seguros (RIBEIRO et al., 2004; COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; VALLE et al., 2010).

Atualmente, novas opções de identificação de leveduras, como a utilização de métodos moleculares, têm sido descritas para superar as limitações dos métodos de identificação tradicionais, que utilizam longos períodos de identificação, inaceitáveis para a iniciação da terapêutica utilizada nas infecções invasivas. Com o avanço de estudos de taxonomia com métodos moleculares houve a descoberta de novas espécies causando infecção (OLIVEIRA et al., 2008; ROCHA et al., 2008).

Estudos taxonômicos utilizando marcadores moleculares possibilitaram um aprimoramento nas técnicas de diagnóstico, além de fornecer dados precisos a respeito das características genotípicas e da variabilidade genética existente entre as espécies e dentro de uma mesma espécie de *Candida*. Os avanços na área da biologia molecular, ao longo das últimas duas décadas, levaram ao desenvolvimento de técnicas moleculares para genotipagem de isolados clínicos de leveduras patogênicas (BINELLI et al., 2006; MAROL, YUCESOL, 2007).

A tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi concebida por Kary Banks Mullis, em meados da década de 1980, e muitos métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados ou substituídos pelo uso de inúmeras derivações da técnica de PCR. A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR a torna particularmente importante

para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo e um dos aspectos mais fundamentais da revolução causada pela PCR é a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma (MULLIS, FALOONA, 1987; ANTONINI et al., 2004; MOUSAVI et al., 2007; SHOKOHI et al., 2010).

A utilização dessas técnicas tem sido considerada uma poderosa ferramenta para identificação taxonômica, investigação de surtos de infecção hospitalar e também tem contribuído para os estudos epidemiológicos. Já existem estudos com *Candida* utilizando métodos de biologia molecular como, por exemplo, Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD), Reação em Cadeia da Polimerase associada ao Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP), Real-Time PCR e outros (MIHRENDI et al., 2006; MALUCHE et al., 2008; FAHAMI et al., 2010).

A partir de 1990, foram utilizados iniciadores mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando a necessidade do conhecimento prévio da sequência a ser amplificada. Esta técnica foi desenvolvida, independentemente, por dois grupos de pesquisadores. Williams e colaboradores (1990) patentearam a tecnologia com o nome RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e o grupo de pesquisa comandado por Welsh & McClelland (1990) propôs outra denominação para a técnica, chamando-a de AP-PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction*), afirmando que os iniciadores possuem sequência arbitrária, porém a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso e, sim, em lugares específicos no genoma. Atualmente, técnicas como RAPD e AP-PCR, que utilizam o princípio da PCR, têm sido usadas na identificação de leveduras do gênero *Candida* e em estudos epidemiológicos (BAUTISTA-MUÑOZ et al., 2003; PINTO et al., 2004; MAROL, YUCESYOY, 2007).

Basicamente na reação de RAPD e AP-PCR, um iniciador se liga ao DNA genômico em dois sítios diferentes em fitas opostas do DNA e, se os sítios estiverem localizados a uma distância amplificável, observa-se um pequeno produto de DNA. Além disso, estes iniciadores detectam polimorfismos que funcionam como marcadores, podendo ser usados para construir mapas genéticos. A técnica de RAPD e AP-PCR é uma variação do protocolo da técnica de PCR, com algumas características distintas, como a utilização de um único iniciador, contendo de 9 a 10 bases, onde sua sequência é construída aleatoriamente, o que resulta na

amplificação de uma sequência alvo desconhecida, por isso chamado de iniciador arbitrário. Entretanto, recentemente, podemos encontrar trabalhos na literatura que utilizam iniciadores maiores, com até 20 bases e, ainda assim, a maioria das publicações recentes continua a indicar o método geral tal como AP-PCR ou RAPD independentemente do comprimento do iniciador usado (SOLL, 2000; CASTIGLIONI, BICUDO, 2003; ANTONINI et al., 2004).

Algumas das vantagens dessa técnica residem, principalmente, na possibilidade de utilização de pequenas quantidades de DNA; na não necessidade do uso de sondas marcadas radioativamente; na simplicidade de execução da técnica; na facilidade de aplicação em estudos epidemiológicos, além de não haver necessidade de se conhecer previamente o DNA a ser analisado. Contudo, nesta metodologia alguns fatores podem influenciar o sucesso da reação e a sua reprodutibilidade como, por exemplo, a temperatura de pareamento dos iniciadores, a duração entre os intervalos de transição de desnaturação, pareamento e extensão das cadeias de DNA, a concentração e a qualidade do DNA, a concentração de íons magnésio, a sequência e a concentração do iniciador e o número de ciclos térmicos que será utilizado na reação da PCR (WILLIAMS et al., 1990; WELSH et al., 1990; SANSINFORIANO et al., 2001).

Os marcadores de RAPD podem ser usados para avaliação de polimorfismos intra e interespecies, realizar análises populacionais e epidemiológicas, podendo ser aplicados em uma variedade de organismos. Esse estudo pode ser feito com isolados pertencentes a uma coleção de culturas ou isolados obtidos de diferentes pacientes ou fontes inanimadas, sugerindo que tal método pode ser útil para analisar surtos hospitalares bem como a ocorrência de infecções cruzadas (WILLIAMS et al., 1990; LEHMANN et al., 1992; RESENDE et al., 2004; PINTO et al., 2004; VALÉRIO et al., 2006).

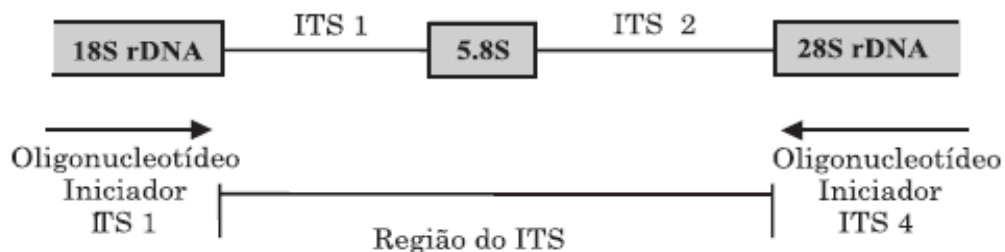
Atualmente, a literatura mostra que os métodos de tipagem molecular com DNA são métodos que mostram melhores resoluções para discriminação de isolados de *Candida* e têm sido utilizados com grande frequência para investigações epidemiológicas no desenvolvimento de medidas de controle dessas infecções (SOLL et al., 2000; BARTIE et al., 2001; MIHRENDI et al., 2006; SANTOS et al., 2010). Várias pesquisas de genotipagem comprovam que espécies de *Candida* isoladas do local de infecção são as mesmas do local de colonização, assim, métodos de genotipagem mostram a similaridade entre cepas colonizantes e

infectantes, comprovando a provável origem endógena da maioria das infecções por tais patógenos (MAROL, YUCESOL, 2007; ASMUNSDOTTIR et al., 2008).

A técnica de PCR associada ao Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) é um método rápido e simples de executar, além de fornecer resultados reprodutíveis, sendo facilmente adaptável à maioria dos laboratórios de diagnóstico. Diferentes regiões-alvo têm sido estudadas para a amplificação do genoma de espécies do gênero *Candida* por PCR-RFLP, sendo o melhor exemplo, as regiões do espaço intergênico (ITS) do rDNA que são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999; DENDIS et al., 2003; TROST et al., 2004).

As regiões ITS estão localizadas entre os genes 18S, 5.8S e 28S do rDNA e podem ser amplificadas por iniciadores específicos, sendo divididas em ITS1, localizada entre os genes 18S e o 5.8S, e ITS2, que separa os genes 5.8S e 28S (Figura 02). O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas, 500 a 800 pb, e aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. As sequências de DNA dos genes ribossomais são altamente conservadas dentro das espécies e as regiões dos espaçadores ITS podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento, sendo frequentemente usadas para taxonomia de espécies e gêneros de fungos (FUNGARO et al., 2000; SIMONA et al., 2009; SHOKOHI et al., 2010).

**Figura 02: Esquema representativo das regiões do espaço intergênico (ITS) do rDNA.**



Fonte: LUPATINI et al, 2008, modificado.

A técnica de PCR-RFLP baseia-se na diferenciação entre os micro-organismos pela comparação dos padrões de restrição obtidos por digestão com endonucleases de restrição de DNA de um produto específico amplificado pela PCR. No caso de fungos, o alvo mais estudado é a região ITS. O grau de similaridade dos padrões gerados permite estabelecer correlações entre as espécies, como por exemplo, a identificação de espécies, gêneros, sorotipos, entre outros. Este método tem sido usado com sucesso para diferenciar os gêneros e algumas espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Histoplasma*, *Aspergillus* (GUILLAMÓN, 1998; ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999; SANTOS et al., 2010).

Por conta do aumento da prevalência de candidemia em ambientes hospitalares, justifica-se que sejam desenvolvidos e utilizados procedimentos técnicos mais rápidos e precisos para a identificação taxonômica das amostras fúngicas, para que o tratamento dos pacientes infectados seja iniciado na maior brevidade possível.





## **Objetivo geral**

Identificar e caracterizar molecularmente leveduras do gênero *Candida* isoladas de casos de infecção em Unidade de Tratamento Intensivo neonatal de uma maternidade referência de Salvador.

## **Objetivos específicos**

1. Caracterizar bioquimicamente isolados clínicos de *Candida*.
2. Caracterizar molecularmente isolados clínicos de *Candida*
  - 2.1. Extrair DNA genômico;
  - 2.2. Identificar as espécies através da técnica de PCR-RFLP;
  - 2.3. Identificar as espécies através da técnica de AP-PCR;
  - 2.4. Identificar variação intraespécie através da técnica de AP-PCR.



## 4.1 Micro-organismos

### 4.1.1 Isolados clínicos

Foram utilizadas 73 leveduras do gênero *Candida* mantidas na coleção de cultura do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) isoladas de pacientes de Unidade de Terapia Intensiva neonatal de uma maternidade referência de Salvador, Bahia.

### 4.1.2 Cepas padrão

Foram utilizadas cepas padrão de referência da “American Type Culture Collection” (ATCC): *C. albicans* 90028, *C. dubliniensis* MYA-646, *C. tropicalis* 28707, *C. krusei* 6258, *C. parapsilosis* 22019, *C. glabrata* 2001, *C. guilliermondii* 6260, *C. lusitaniae* 34449, *C. famata* 62894.

As cepas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micro-organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), através do Dr. Ivano de Filippis.

### 4.1.3 Estoque e manutenção

Todas as leveduras utilizadas no estudo pertencem à coleção de cultura do LPMC da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia e são mantidas à temperatura de -20°C, em Caldo Sabouraud Dextrose acrescido de 20% de glicerol e, em geladeira, por repiques periódicos sucessivos em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD – ACUMEDIA).

No momento do uso, as leveduras foram sub cultivadas em placas de ASD e incubadas a 35°C por 24 a 48 horas, para confirmação da viabilidade e, após o período de incubação, foi realizada a coloração de Gram para confirmação da pureza.

## 4.2 Caracterização fenotípica

### 4.2.1 Identificação bioquímica

A confirmação do gênero *Candida* e identificação de espécies foram realizadas através da identificação micológica clássica de leveduras, segundo Lacaz e colaboradores (2002).

#### 4.2.1.1 Produção de tubo germinativo (REYNOLS, BRAUDE, 1956)

Para a produção do tubo germinativo, uma suspensão leve da levedura em soro humano foi incubada a 35°C por até 3 horas. Após incubação, uma gota da suspensão foi transferida para uma lâmina de microscopia coberta com lamínula e observada ao microscópio, em objetiva de 40x. O tubo germinativo se caracteriza por um filamento fino e cilíndrico originado do blastoconídio da levedura, no qual não se observa nenhuma zona de constrição na base ou ao longo de sua extensão. A presença do tubo germinativo caracteriza as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* e, a ausência, as demais espécies do gênero *Candida*. Para controle da técnica foram utilizadas as cepas padrão ATCC *C. albicans* 90028 e *C. dubliniensis* MYA-646, como controles positivos e a *C. parapsilosis* 20018 como controle negativo.

#### 4.2.1.2 Micromorfologia em ágar arroz (SIDRIM, ROCHA, 2004)

Para a técnica do microcultivo, ágar arroz com Tween-80 [creme de arroz 10,0 g; ágar 10,0 g; Tween 80 (1%); água destilada q.s.p.1000 mL], previamente esterilizado, foi fundido e distribuído, assepticamente, sobre uma lâmina microscópica estéril acondicionada dentro de uma placa de Petri estéril. Após a solidificação, a levedura foi semeada em estrias sobre o meio, a semeadura coberta com uma lamínula e o sistema incubado em câmara úmida à temperatura ambiente por 48 horas. Após o período de incubação, o conjunto foi colocado ao microscópio e a micromorfologia da levedura observada em objetiva de 40x. A capacidade de filamentar, formando pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídios, sugere a espécie de levedura. Para controle da técnica, todas as cepas padrão ATCC foram utilizadas.

#### 4.2.1.3 Crescimento a temperatura de 42°C (SIDRIM, ROCHA, 2004)

A prova do crescimento a 42°C foi utilizada para diferenciar as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*, visto que a primeira possui capacidade de crescer a 42°C e a segunda não possui. Para a prova, uma unidade formadora de colônia (UFC) foi semeada em tubo de ensaio contendo meio ASD inclinado e incubada à 42°C por 48

horas. Para controle da técnica, foram utilizadas cepas padrão ATCC *C. albicans* 90028 e *C. dubliniensis* MYA-646.

#### 4.2.1.4 Assimilação de Carbono e Nitrogênio (Auxonograma) (LARONE, 2002)

Para a prova de assimilação de carboidratos, foi utilizada a técnica de “pour-plate”, onde em uma placa de Petri estéril foram homogeneizados 20,0 mL do meio “Yeast Nitrogen Base” (YNB) [sulfato de amônio 5,0 g; fosfato mono potássio 1,0 g; sulfato de magnésio.7H<sub>2</sub>O 0,5 g; ágar 20,0 g; água destilada 1000 mL], fundido e resfriado à 45°C, e 1,5 mL de uma suspensão aquosa de levedura ajustada à escala 5,0 McFarland ( $15 \times 10^6$  células/mL). Após a solidificação do meio, pequenas quantidades de cristais dos carboidratos (dextrose, sacarose, lactose, galactose, rafinose, inositol, xilose, celobiose, trealose, maltose e dulcitol) foram adicionadas em posições previamente marcadas na superfície do “pour-plate”. As placas foram incubadas à 35°C por 48 horas e a assimilação do carboidrato foi observada através do aparecimento de halo de crescimento leveduriforme na área correspondente a cada fonte de carbono. A dextrose foi utilizada como controle de viabilidade da levedura, visto que todas as leveduras assimilam esse carboidrato. Para assimilação de fontes de nitrogênio, a mesma técnica foi utilizada, porém o meio base utilizado foi “Yeast Carbon Base” (YCB) [dextrose 20,0 g; fosfato mono potássio 1,0 g; sulfato de Magnésio.7H<sub>2</sub>O 0,5 g; ágar 20,0 g; água destilada 1000 mL] e as fontes de Nitrogênio foram a peptona e o nitrato de potássio. Para controle da técnica, todas as cepas padrão ATCC foram utilizadas.

#### 4.2.1.5 Fermentação de carboidratos (Zimograma) (LARONE, 2002)

Para a prova de fermentação de carboidratos, 1,0 mL da suspensão aquosa da levedura, ajustada à escala 5,0 de McFarland ( $15 \times 10^6$  células/mL), foi adicionada a um tubo contendo 3,0 mL de caldo base [azul de bromotimol 0,04 g; extrato de levedura 4,5 g; peptona 0,5 g; etanol a 95% 1,8 mL em água destilada 1000 mL; pH 7,0] contendo um tubo de Durham invertido. Posteriormente, foi adicionado, a cada tubo correspondente, 1 mL de solução de carboidrato (dextrose, sacarose, maltose, galactose, lactose, trealose e rafinose) a 10%, esterilizada por filtração. Os tubos foram incubados à 28°C por até 14 dias. A prova positiva foi atribuída a produção de

gás, detectada pela presença de bolhas de ar no interior do tubo de Durham. A dextrose foi utilizada como controle positivo, já que leveduras do gênero *Candida* fermentam esse carboidrato. Um tubo contendo apenas a suspensão da levedura e o caldo base sem carboidrato foi utilizado como controle negativo. Para controle da técnica todas as cepas padrão ATCC foram utilizadas.

#### 4.2.1.6 Determinação da enzima urease (COX et al., 2000)

Para a pesquisa da enzima urease, uma UFC foi inoculada na superfície do ágar urease de Christensen [peptona 1,0 g; dextrose 1,0 g; cloreto de sódio 5,0 g; fosfato mono potássio 2,0 g; vermelho de fenol 0,012 g; ágar 20,0 g em 900 mL de água destilada; solução de uréia a 20% 100 mL; pH 6,8] e incubada a 35°C por 48 horas. O aparecimento da coloração rosa “pink” no meio indica reação positiva devido a degradação da uréia a amônia, alteração de pH para alcalino e inversão do indicador de pH. Para controle negativo e positivo do experimento, foram utilizadas as cepas padrão ATCC *C.albicans* 10231 e *C. krusei* ATCC 6258, respectivamente.

#### 4.2.1.7 Semeadura em meio cromogênico

Para a identificação presuntiva em meio cromogênico, uma suspensão leve da levedura foi semeada em placas contendo o meio cromogênico Chromagar *Candida* (PROBAC). As placas foram incubadas a 35°C por 48 a 72 horas e, após incubação, observou-se a coloração adquirida pelas colônias. De acordo com o fabricante, as colônias da espécie *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* adquirem coloração esverdeada, *Candida krusei* cor rósea, *Candida tropicalis* azul e as demais espécies, coloração creme. Para controle da técnica foram utilizadas cepas padrão ATCC *C. albicans* 90028, *C. dubliniensis* MYA-646, *C. tropicalis* 28707 e *C. krusei* 6258.

### 4.3 Caracterização genotípica

#### 4.3.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada segundo a técnica descrita por Bolano e colaboradores (2001), modificada. De uma cultura de 48 horas de

crescimento a 35°C, 4 a 5 alçadas da levedura foram transferidas para 2 mL de tampão uréia [uréia 8 M; NaCl 0,5 M; Tris 20 mM; EDTA 20 mM; SDS 2%; pH 8,0], os quais foram incubados por 4 horas, sob agitação de 60 rpm à temperatura ambiente. Após o período de incubação, as células foram recuperadas por centrifugação a 4.000 x g por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 400 µL de tampão de lise [SDS 0,5%; sarkosil 0,5% em TE (EDTA 1 mM; Tris-HCl 1 mM; pH 8,0), pH 8,0]. Foram adicionados 400 µL de fenol:clorofórmio:álcool isopropílico (25:24:1, pH 8,0) (SIGMA) e 400 µL de pérolas de vidro de 212-300 µM de diâmetro (SIGMA). As células foram submetidas à lise mecânica por 3 ciclos de agitação a 420 rpm por 3 minutos, com descanso por 3 minutos a 4°C, a cada ciclo. Após centrifugação por 15 minutos a 17.000 x g, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e, então, foi adicionado isopropanol gelado, no mesmo volume da fase recuperada, para precipitação do DNA à temperatura - 20°C “over night”. As amostras foram centrifugadas a 5180 x g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com álcool 70% gelado. Após nova centrifugação a 5180 x g por 10 minutos, o sedimento foi seco por 15 minutos e ressuspense em 100 µL de TE [EDTA 1 mM; Tris-HCl 1 mM; pH 8,0]. As soluções de DNA genômico foram conservadas a -20°C até o momento do uso.

#### 4.3.2 Quantificação do DNA genômico

A estimativa da concentração do DNA genômico em 1,0 µL de solução foi realizada por comparação da intensidade de fluorescência das bandas geradas de 100 ng do marcador de peso molecular do DNA do fago λ (lambda) digerido pela enzima de restrição *Hind*III (INVITROGEN), após corrida em gel de agarose a 0,8%, e utilização dos cálculos da Tabela 01. Após corrida eletroforética, a 80 V por 60 minutos, o gel foi corado com brometo de Etídio, analisado sob luz Ultra Violeta (UV) e fotografado com auxílio de um fotodocumentador (Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch).

**Tabela 01. Estimativa de massa dos fragmentos de DNA do fago  $\lambda$  digerido pela enzima *HindIII*.**

<b>Fragmento</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Massa estimada (ng)</b>
1	23130	47,7
2	9416	19,4
3	6557	13,5
4	4361	9,0
5	2322	4,8
6	2027	4,2
7	564	1,2
8	125	0,3
<b>Total</b>	<b>48502</b>	<b>100</b>

(pb) pares de base; (ng) nanogramas; ( $\lambda$ ) lambda.

#### 4.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase associada ao Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP)

A técnica de PCR-RFLP foi realizada de acordo com Williams e colaboradores (1995), modificada, para amplificação da região do espaço intergênico (ITS) do rDNA (ITS1-5.8S-ITS2), incluindo o gene 5.8S, com os iniciadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATAGC3'). Para o volume final de reação de 50  $\mu$ L, foram adicionados 50 ng do DNA genômico, 0.08 nM de cada iniciador, 3.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 1X Green buffer e 1.25 U da Taq DNA polimerase (GoTaq® - Promega). Como controle negativo, foi utilizada água Mili-Q no lugar do DNA.

A reação foi realizada em termociclador (BIO RAD) utilizando as seguintes condições: 2 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de pareamento a 55°C, 2 minutos de extensão a 72°C, com extensão final de 10 minutos a 72°C. Após amplificação, o produto foi analisado em gel de agarose a 1,0% em uma corrida eletroforética a 100 V por 2 horas, observados sob a luz UV após coloração com brometo de Etídio e fotografado com auxílio de um fotodocumentador (Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch).



Após confirmação de amplificação, o produto da PCR foi digerido, separadamente, com as enzimas *Ddel*, *HaeIII*, *Bfal* e *MspI* (New England, BioLabs) a 37°C “over night”. Em seguida, o perfil eletroforético foi analisado em gel de agarose a 2,5%, cuja corrida foi feita a 100 V por 2 horas. Os fragmentos da restrição foram observados sob a luz UV, após coloração do gel com brometo de Etídio e fotografado com auxílio de um fotodocumentador (Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch).

Os perfis de restrição gerados pelos isolados foram comparados àqueles obtidos pelas cepas de referência de *Candida* ATCC e confirmados pelos mapas de restrição construídos no item 4.3.4.

#### 4.3.4 Construção do mapa de restrição

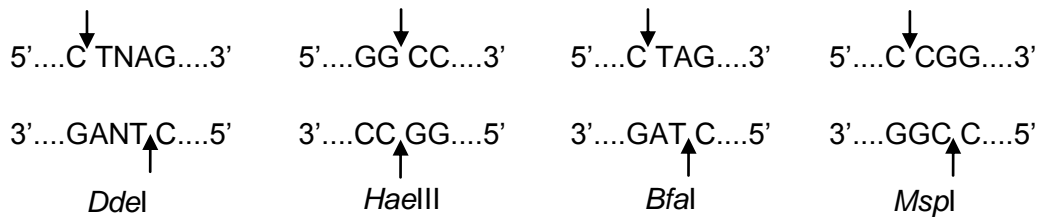
Os sítios de restrição das enzimas *Ddel*, *HaeIII*, *Bfal* e *MspI* (Figura 03) foram localizados nas sequências de nucleotídeos das cepas ATCC obtidas através do acesso ao GenBank (Tabela 02), e os fragmentos gerados, após esse estudo, geraram mapas de restrição de cada cepa.

**Tabela 02. Tamanho esperado dos produtos de PCR da região ITS de *Candida* com base em sequência de nucleotídeos obtidos no GenBank.**

<b>Espécie</b>	<b>Produto (pb)</b>	<b>Número acesso GenBank</b>
<i>C. albicans</i>	532	EU266566.1
<i>C. dubliniensis</i>	544	HQ457427.1
<i>C. tropicalis</i>	526	AY939810.1
<i>C. krusei</i>	517	FJ697171.1
<i>C. parapsilosis</i>	520	AY939798.1
<i>C. glabrata</i>	885	GU199447.1
<i>C. guilliermondii</i>	607	AY939792.1
<i>C. lusitaniae</i>	383	EU149777.1
<i>C. famata</i>	639	EU569041.1

(pb) pares de base.

**Figura 03. Sítio de restrição das enzimas *Ddel*, *HaeIII*, *Bfal* e *MspI*.**



Fonte: A autora. (N): A ou T ou G ou C.

#### 4.3.5 Reação em Cadeia da Polimerase utilizando primer arbitrário (AP-PCR)

A reação de AP-PCR foi feita de acordo com a técnica descrita por Cirak e colaboradores (2003), com o iniciador AP-4 (5'AAATGAAGGGGGTGTCGTT3'). Para um volume final de reação de 50 µL, foram adicionados: 50 ng do DNA genômico, 0,12 nM do iniciador, 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 1X Green buffer e 1,25 U da Taq DNA polimerase (GoTaq® - Promega). Como controle negativo foi utilizada água Mili-Q no lugar do DNA.

A reação foi procedida em termociclador (BIO RAD) com 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido de 15 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 50 segundos de pareamento a 30°C, 1 minuto de extensão a 72°C, seguido de 30 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de pareamento a 55°C, 1 minuto de extensão a 72°C com extensão final de 5 minutos a 72°C. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2,0% cuja corrida foi feita a 100 V por 2 horas. Após coloração com brometo de Etídio, o gel foi observado sob a luz UV e fotografado com auxílio de um fotodocumentador (Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch) e as imagens capturadas pelo programa Software L-Pix Image.

##### 4.3.5.1 Análise dos padrões eletroforéticos

A análise dos resultados gerados pelo método de AP-PCR foi feita utilizando o programa Gel Compar II versão 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) através de análises de agrupamento, de acordo com a similaridade dos padrões de bandas

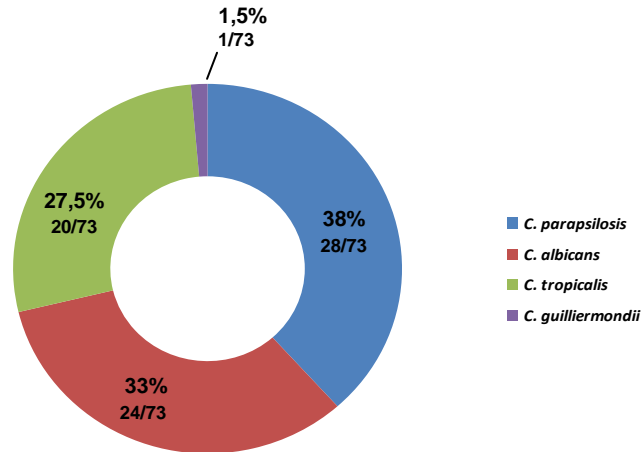
obtidos. O coeficiente de Dice, que se baseia na presença e ausência de bandas, foi utilizado para calcular a similaridade entre os perfis encontrados com uma tolerância de 2% e o método “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” (UPGMA) para gerar dendogramas.

## **5.0 Resultados**

---

Todos os isolados do estudo foram identificados como pertencentes ao gênero *Candida* e a frequência das espécies segundo identificação bioquímica foi de 38% (28/73) de *C. parapsilosis*, 33% (24/73) de *C. albicans*, 27,5% (20/73) de *C. tropicalis* e 1,5% (01/73) de *C. guilliermondii* (Figura 04).

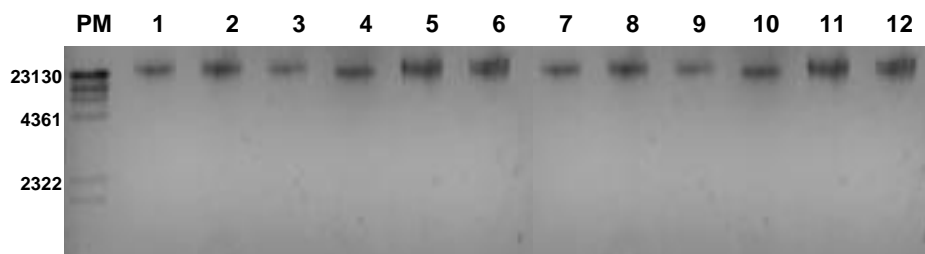
**Figura 04. Frequência de isolados clínicos de *Candida* spp. de UTI neonatal.**



Fonte: A autora.

A técnica de extração de DNA descrita por Bolano e colaboradores (2001), modificada, possibilitou a obtenção do DNA genômico dos 73 isolados de *Candida* e das nove cepas padrão ATCC com excelente integridade, tamanho condizente com o esperado para DNA genômico e alto rendimento (Figura 05). A concentração de DNA foi estimada entre 13,5 e acima de 47,7 ng/μL.

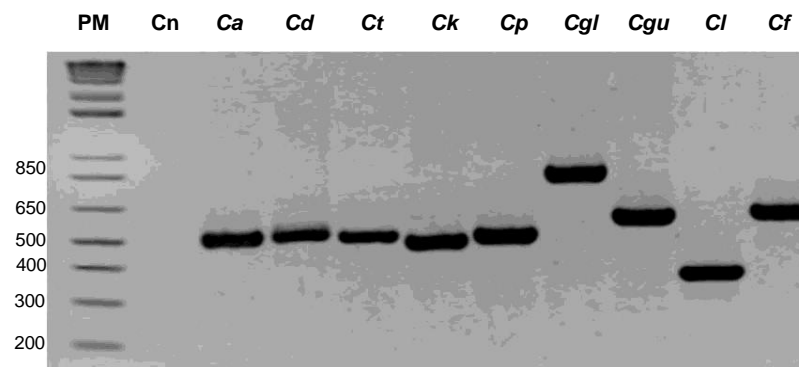
**Figura 05. Integridade do DNA genômico de isolados clínicos de *Candida* de uma UTI neonatal, em gel de agarose a 0,8%.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular Lambda DNA/*Hind*III (Invitrogen); (01-04) *C. albicans*; (05-08) *C. tropicalis*; (09-11) *C. parapsilosis*; (12) *C. guilliermondii*.

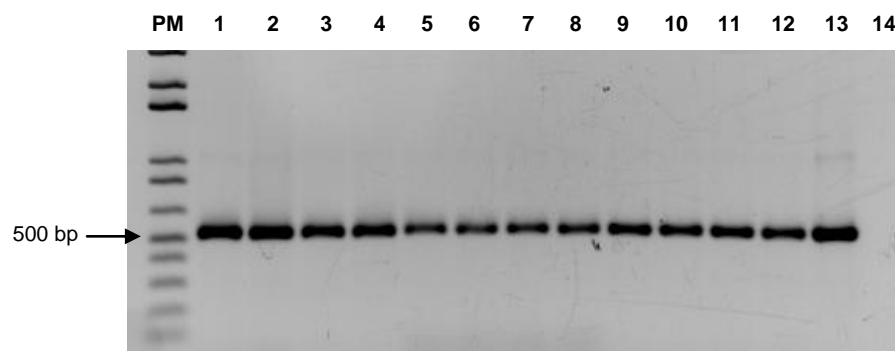
A região ITS foi amplificada com sucesso para todas as leveduras incluídas no estudo. Produtos de tamanhos distintos foram observados quando amplificados de DNA das cepas de referência ATCC (Figura 06), onde as espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* apresentaram produtos acima de 500 pb, não excedendo 550 pb, enquanto as espécies *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. famata* e *C. glabrata* apresentaram produtos de aproximadamente 400, 600, 650 e 850 pb, respectivamente. Já na análise dos produtos amplificados da região ITS dos isolados clínicos foram verificados somente tamanhos entre 500 e 550 pb (Figura 07).

**Figura 06. Produtos de amplificação da região ITS das cepas ATCC de *Candida*, em gel de agarose a 1%.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1 Kb (Invitrogen); (Cn) controle negativo; (Ca) *C. albicans* 90028; (Cd) *C. dubliniensis* MYA-646; (Ct) *C. tropicalis* 28707; (Ck) *C. krusei* 6258; (Cp) *C. parapsilosis* 22019; (Cgl) *C. glabrata* 2001; (Cgu) *C. guilliermondii* 6260; (Cl) *C. lusitaniae* 34449; (Cf) *C. famata* 62894.

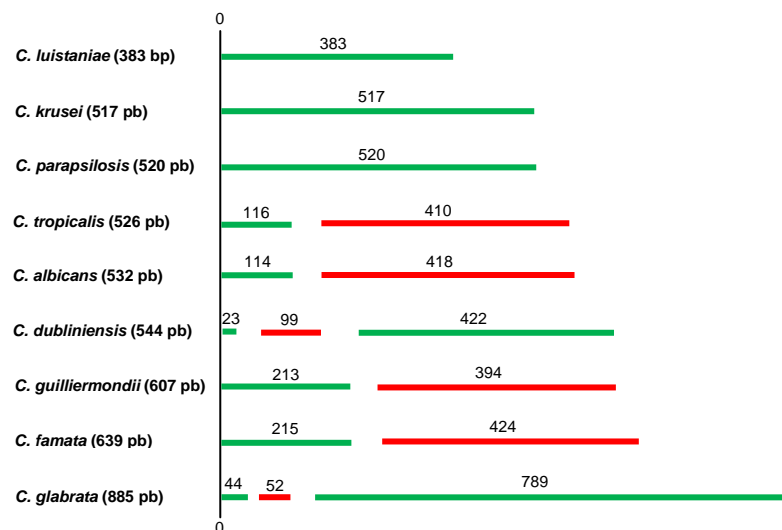
**Figura 07. Produtos da amplificação da região ITS de isolados de *Candida* de UTI neonatal, em gel de agarose a 1%.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (01-04) *C. albicans*; (05-08) *C. tropicalis*; (09-12) *C. parapsilosis*; (13) *C. guilliermondii*; (14) Controle negativo.

Com o estudo teórico das restrições no produto amplificado da região ITS, foi possível gerar mapas para conferir os tamanhos analisados nos géis. O primeiro mapa construído para a restrição com a enzima *Ddel* (Figura 08) mostra que as sequências da região ITS das cepas *C. lusitaniae*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* não apresentam sítio de restrição; que as sequências das espécies *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii* e *C. famata* apresentam apenas um sítio de restrição a 116, 118, 213 e 215 pb, respectivamente, produzindo um perfil com dois fragmentos; enquanto, as sequências das espécies *C. dubliniensis* e *C. glabrata* possuem dois sítios a 23 e 122 e 44 e 96 pb, respectivamente, produzindo um perfil de 3 fragmentos.

**Figura 08. Mapa de restrição da região ITS de cepas ATCC de *Candida* spp., pela enzima *Ddel*.**

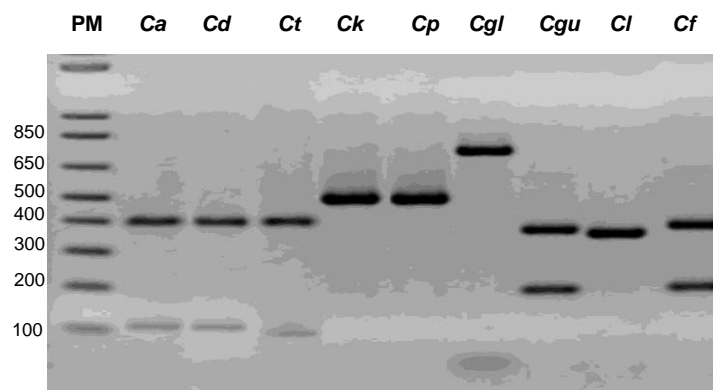


Fonte: A autora.

A análise da enzima *Ddel*, ao restringir os produtos gerados pela amplificação das cepas padrão ATCC de *Candida*, confirma distintos perfis de RFLP (Figura 09), perfis de apenas um fragmento (aproximadamente 400 pb para *C. lusitaniae*; acima de 500 pb para *C. krusei* e *C. parapsilosis* e abaixo de 800 pb para *C. glabrata*); perfis de dois fragmentos (um acima de 100 pb e outro acima de 400 pb para as espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* e um acima de 200 pb e outro de aproximadamente 400 pb para *C. guilliermondii* e *C. famata*).

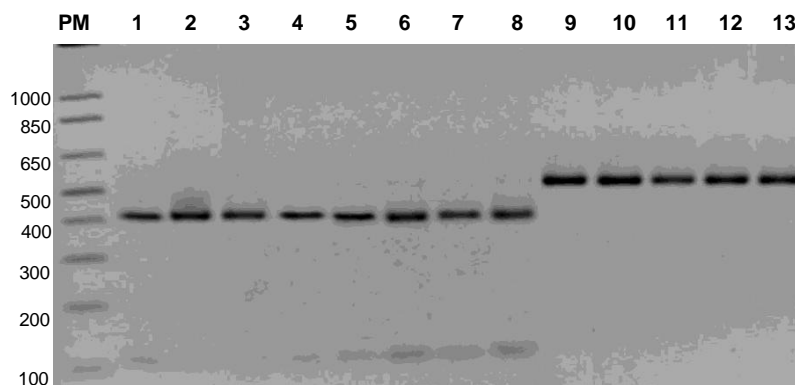
Já para a restrição dos produtos amplificados dos isolados clínicos, os perfis produzidos pela enzima *Ddel* podem ser observados na Figura 10. Para as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* a restrição produziu um perfil de dois fragmentos (um acima de 100 e outro acima de 400 pb) e para *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* a enzima não foi possível gerar fragmentos, podendo então ser observado apenas um fragmento acima de 500 pb.

**Figura 09. Perfis de RFLP da região ITS de cepas padrão ATCC de *Candida* obtidos por restrição com enzima *Ddel*, em gel de agarose a 2,5%.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1 Kb (Invitrogen); (Ca) *C. albicans* 90028; (Cd) *C. dubliniensis* MYA-646; (Ct) *C. tropicalis* 28707; (Ck) *C. krusei* 6258; (Cp) *C. parapsilosis* 22019; (Cgl) *C. glabrata* 2001; (Cgu) *C. guilliermondii* 6260; (Cl) *C. lusitaniae* 34449; (Cf) *C. famata* 62894.

**Figura 10. Perfis de RFLP da região ITS de isolados de *Candida* de UTI neonatal obtidos por restrição com enzima *Ddel*, em gel de agarose a 2,5%.**

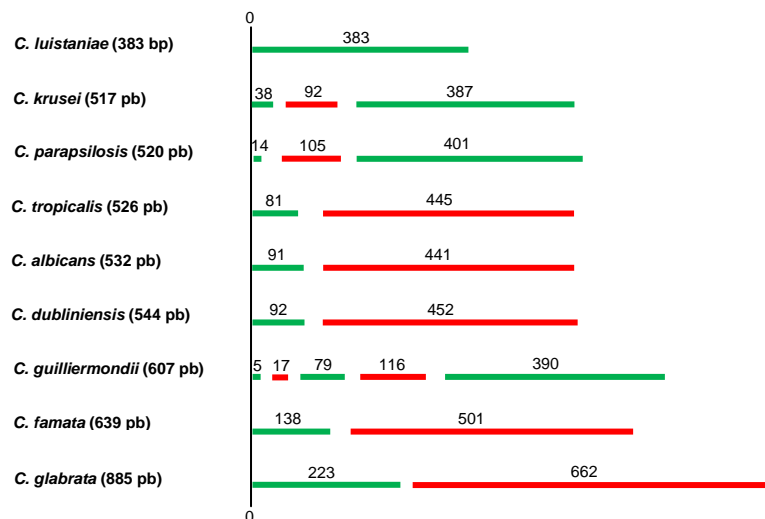


Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (01-04) *C. albicans*; (05-08) *C. tropicalis*; (09-12) *C. parapsilosis*; (13) *C. guilliermondii*.



O estudo teórico para a restrição com a enzima *HaeIII* (Figura 11) mostrou que somente a sequência da espécie *C. lusitaniae* não apresenta sítio de restrição para essa enzima. No entanto, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata* e *C. glabrata* apresentam um único sítio a 81, 91, 92, 138 e 223, respectivamente, produzindo um perfil de dois fragmentos; as sequências das espécies *C. parapsilosis* e *C. krusei* possuem dois sítios a 14 e 115 e 38 e 130 pb, respectivamente, produzindo um perfil de três fragmentos; enquanto a sequência da *C. guilliermondii* apresentam quatro sítios a 5, 22, 101 e 217 pb, produzindo um perfil de cinco fragmentos.

**Figura 11. Mapa de restrição da região ITS de cepas ATCC de *Candida* spp., pela enzima *HaeIII*.**

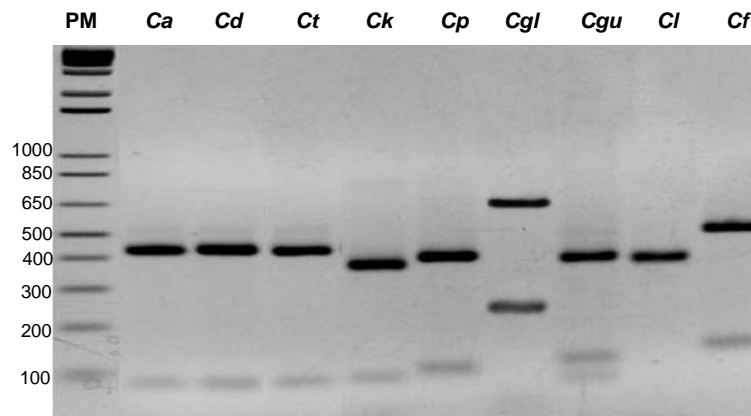


Fonte: A autora.

Quando a enzima *HaeIII* foi utilizada para restrição dos produtos das cepas ATCC (Figura 12) foram obtidos os seguintes perfis: para *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* (um fragmento abaixo de 100 e outro acima de 400 pb); *C. krusei* (um abaixo de 100 e outro abaixo de 400 pb); *C. parapsilosis* (aproximadamente um em 100 e outro em 400 pb); *C. glabrata* (um acima de 200 e outro acima de 650 pb); *C. guilliermondii* (três fragmentos, um abaixo de 100 bp, outro acima de 100 pb e um abaixo de 400 pb); *C. lusitaniae* (um abaixo de 400 pb) e *C. famata* (um acima de 100 e outro em 500 pb).

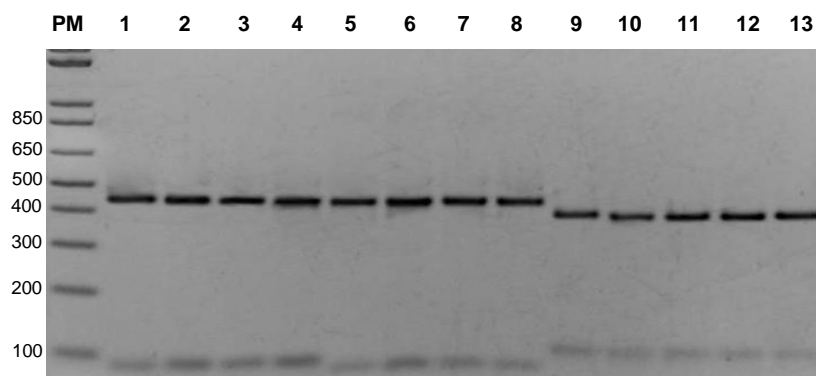
A Figura 13 mostra os perfis dos isolados clínicos com a enzima *HaeIII*, onde todos produziram dois fragmentos, sendo que *C. albicans* e *C. tropicalis* (um acima de 100 pb e outro acima de 400 pb) e os de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (aproximadamente um em 100 pb e outro em 400 pb).

**Figura 12. Perfis de RFLP da região ITS de cepas padrão ATCC de *Candida* obtidos por restrição com enzima *HaeIII*, em gel de agarose a 2,5%.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1 Kb (Invitrogen); (Ca) *C. albicans* 90028; (Cd) *C. dubliniensis* MYA-646; (Ct) *C. tropicalis* 28707; (Ck) *C. krusei* 6258; (Cp) *C. parapsilosis* 22019; (Cgl) *C. glabrata* 2001; (Cgu) *C. guilliermondii* 6260; (Cl) *C. lusitaniae* 34449; (Cf) *C. famata* 62894.

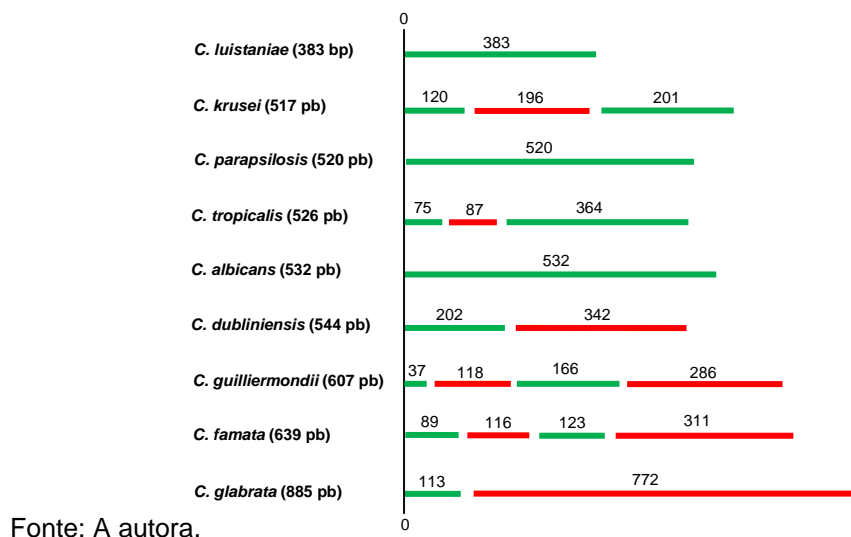
**Figura 13. Perfis de RFLP da região ITS de isolados de *Candida* de UTI neonatal obtidos por restrição com enzima *HaeIII*, em gel de agarose a 2,5%.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (01-04) *C. albicans*; (05-08) *C. tropicalis*; (09-12) *C. parapsilosis*; (13) *C. guilliermondii*.

No mapa construído para a restrição com a enzima *Bfal* (Figura 14) verificou-se que as sequências das espécies *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* não possuem nenhum sítio de restrição, portanto, não são cortadas. As sequências das espécies *C. dubliniensis* e *C. glabrata* e apresenta apenas um único sítio a 202 e 113 pb, respectivamente, gerando perfis de dois fragmentos; perfis de três fragmentos podem ser vistos quando as sequências de *C. krusei* e *C. tropicalis* são digeridas, pois possuem dois sítios a 120 e 316 pb e 75 e 162 pb, respectivamente; e por fim, três sítios foram encontrados nas sequências de *C. guilliermondii* e *C. famata* a 37, 155 e 321 e 89, 205 e 328 pb, respectivamente, gerando perfil de quatro fragmentos.

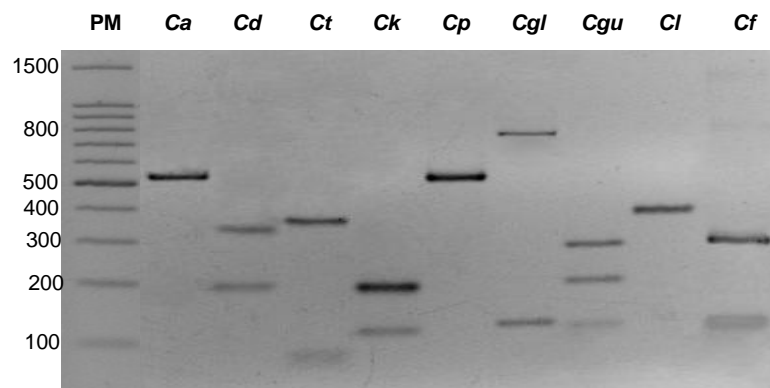
**Figura 14. Mapa de restrição da região ITS de cepas ATCC de *Candida* spp., pela enzima *Bfal*.**



A Figura 15 apresenta a restrição do produto da amplificação da região ITS das cepas ATCC com a enzima a enzima *Bfal*, onde é possível observar perfis de um único fragmento para *C. albicans* e *C. parapsilosis* (acima de 500 pb) e *C. lusitaniae* (abaixo de 400 pb); de dois fragmentos para *C. dubliniensis* (um em 200 e outro acima de 300 pb) e *C. glabrata* (um acima de 100 e outro acima de 700 pb); de três fragmentos para *C. krusei* (um acima de 100 e dois fragmentos sobrepostos acima de 200 pb); *C. tropicalis* (dois fragmentos sobrepostos abaixo de 100 e outro acima de 300 pb); *C. guilliermondii* (dois acima de 100 e outro acima de 200 pb) e de quatro fragmentos para *C. famata* (dois fragmentos sobrepostos acima de 100 e outro acima de 300 pb).

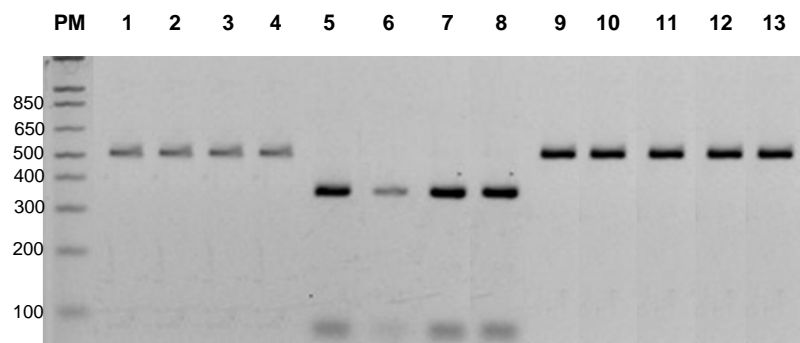
Na Figura 16, é possível confirmar que a restrição com a enzima *Bfal* dos produtos dos isolados clínicos não aconteceu, pois um único fragmento para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (acima de 500 pb) foi observado. No entanto, para os isolados de *C. tropicalis* três fragmentos (dois fragmentos sobrepostos abaixo de 100 e outro acima de 300 pb) foram possíveis de serem vistos.

**Figura 15. Perfis de RFLP da região ITS de cepas padrão ATCC de *Candida* obtidos por restrição com enzima *Bfal*, em gel de agarose a 2,5%.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 100 pb (Invitrogen); (Ca) *C. albicans* 90028; (Cd) *C. dubliniensis* MYA-646; (Ct) *C. tropicalis* 28707; (Ck) *C. krusei* 6258; (Cp) *C. parapsilosis* 22019; (Cgl) *C. glabrata* 2001; (Cgu) *C. guilliermondii* 6260; (Cl) *C. lusitaniae* 34449; (Cf) *C. famata* 62894.

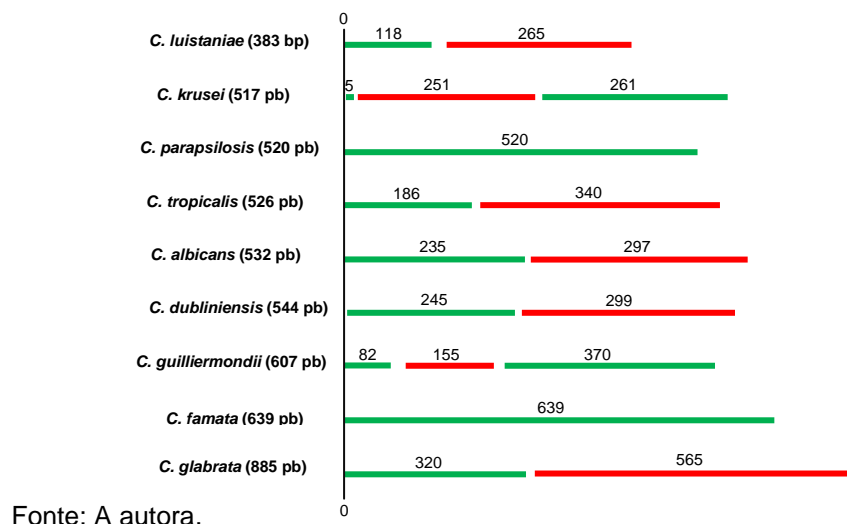
**Figura 16. Perfis de RFLP da região ITS de isolados de *Candida* de UTI neonatal obtidos por restrição com enzima *Bfal*, em gel de agarose a 2,5%.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (01-04) *C. albicans*; (05-08) *C. tropicalis*; (09-12) *C. parapsilosis*; (13) *C. guilliermondii*.

Para restrição com a enzima *MspI* quase todas as sequências estudadas apresentaram um único sítio de restrição, gerando dois fragmentos. A Figura 17 mostra que o sítio da *C. lusitaniae* está a 118 pb; *C. tropicalis* a 186 pb; *C. albicans* a 239 pb; *C. dubliniensis* a 245 e *C. glabrata* a 320 pb. A Figura mostra ainda que as sequências de *C. krusei* e *C. guilliermondii* possuem dois sítios a 5 e 256 e 82 e 237 pb, respectivamente, gerando três fragmentos e as sequências de *C. parapsilosis* e *C. famata* não apresentam sítio de restrição para a enzima.

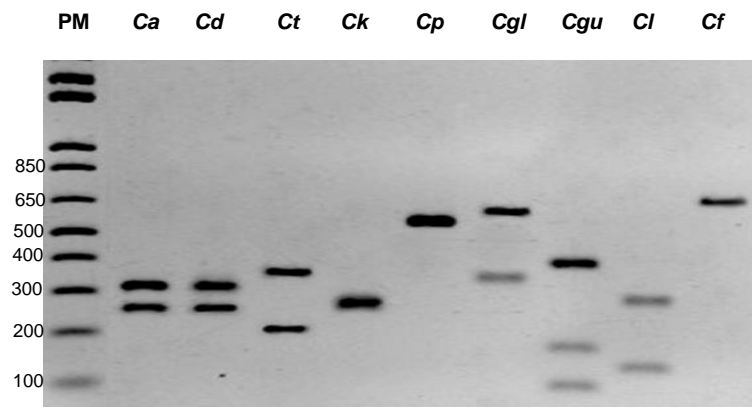
**Figura 17. Mapa de restrição da região ITS de cepas ATCC de *Candida* spp., pela enzima *MspI*.**



Na Figura 18, foi observado um único fragmento para *C. parapsilosis* (acima de 500 pb) e *C. famata* (acima de 600 pb); dois fragmentos para *C. albicans* e *C. dubliniensis* (um acima de 200 e outro abaixo de 300 pb); *C. tropicalis* (um abaixo de 200 e outro acima de 300 pb); *C. krusei* (dois fragmentos sobrepostos acima de 200 pb); *C. glabrata* (um acima de 300 e outro acima de 500 pb); *C. lusitaniae* (um acima de 100 e outro acima de 200 pb); três fragmentos para *C. guilliermondii* (um abaixo e outro acima de 100 e um acima de 300 pb).

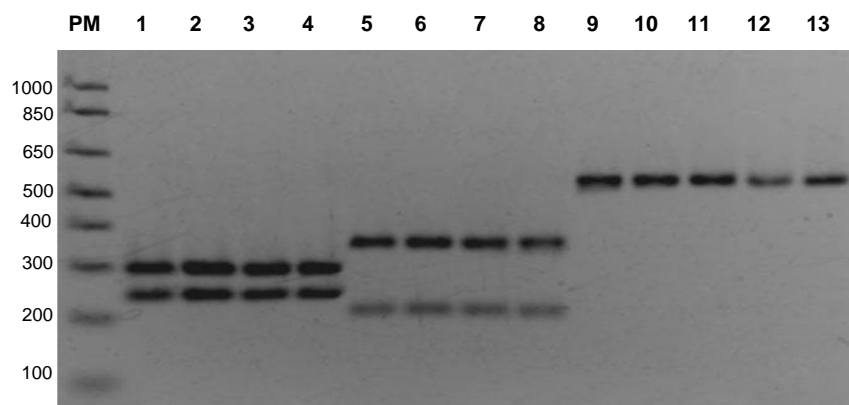
Já na Figura 19, é possível observar que foram produzidos dois fragmentos para os isolados clínicos de *C. albicans* (um acima de 200 e outro abaixo de 300 pb) e *C. tropicalis* (um abaixo de 200 e outro acima de 300 pb); e apenas um fragmento acima de 500 pb para os isolados de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*.

**Figura 18. Perfis de RFLP da região ITS de cepas padrão ATCC de *Candida* obtidos por restrição com enzima *MspI*, em gel de agarose a 2,5%.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1 Kb (Invitrogen); (Ca) *C. albicans* 90028; (Cd) *C. dubliniensis* MYA-646; (Ct) *C. tropicalis* 28707; (Ck) *C. krusei* 6258; (Cp) *C. parapsilosis* 22019; (Cgl) *C. glabrata* 2001; (Cgu) *C. guilliermondii* 6260; (Cl) *C. lusitaniae* 34449; (Cf) *C. famata* 62894.

**Figura 19. Perfis de RFLP da região ITS de isolados de *Candida* de UTI neonatal obtidos por restrição com enzima *MspI*, em gel de agarose a 2,5%.**

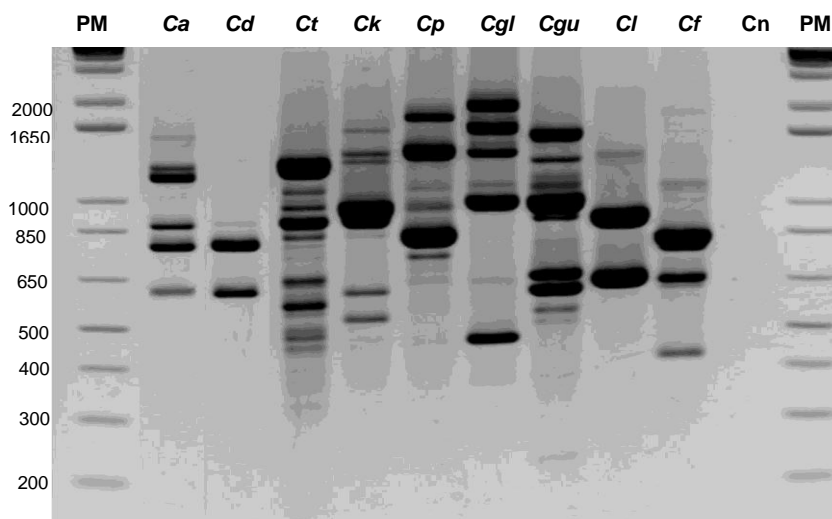


Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (01-04) *C. albicans*; (05-08) *C. tropicalis*; (09-12) *C. parapsilosis*; (13) *C. guilliermondii*.

A reação de AP-PCR com o primer AP-4 possibilitou a obtenção de padrões de amplificação característicos com intensidade, tamanho e número específico de bandas para as nove cepas padrão ATCC de *Candida*. Os resultados mostraram que as diferentes espécies testadas podem ser claramente distinguidas por seus padrões de amplificação, pois o número e o tamanho dos produtos de amplificação foram característicos para cada espécie (Figura 20).

Como pode ser observado na Figura 21, foram obtidas oito bandas de tamanho entre 500 a 1650 pb para *C. albicans*, três bandas de 500 a 1000 pb para *C. dubliniensis*, 12 bandas de 300 a 1650 pb para *C. tropicalis*, 11 bandas de 400 a 1650 pb para *C. krusei*, 12 bandas de 300 a 2000 pb para *C. parapsilosis*, 10 bandas de 300 a 2000 pb para *C. glabrata*, 12 bandas de 200 a 1650 pb para *C. guilliermondii*, três bandas de 650 a 1650 pb para *C. lusitaniae* e seis bandas de 400 a 2000 pb para *C. famata*.

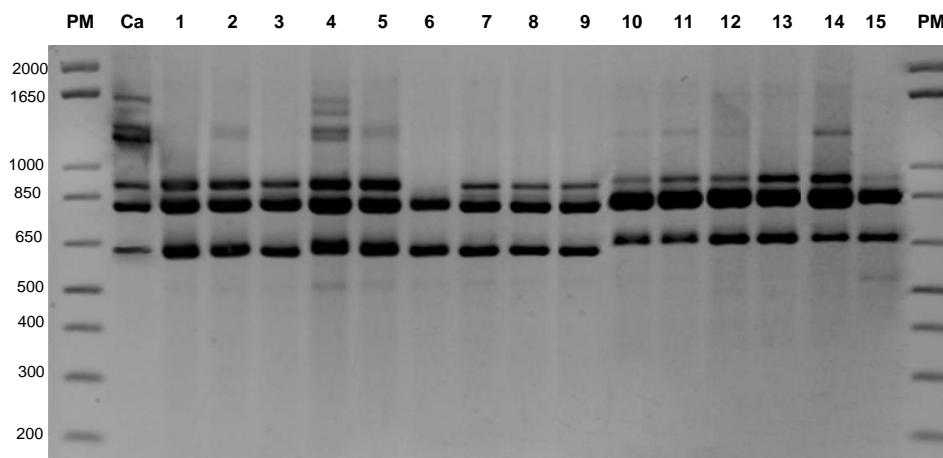
**Figura 20. Perfis de amplificação por AP-PCR de cepas padrão ATCC de *Candida*, em gel de agarose a 2%.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1 Kb (Invitrogen); (Ca) *C. albicans* 90028; (Cd) *C. dubliniensis* MYA-646; (Ct) *C. tropicalis* 28707; (Ck) *C. krusei* 6258; (Cp) *C. parapsilosis* 22019; (Cgl) *C. glabrata* 2001; (Cgu) *C. guilliermondii* 6260; (Cl) *C. lusitaniae* 34449; (Cf) *C. famata* 62894; (Cn) controle negativo.

Os 24 isolados de *C. albicans* apresentaram perfil semelhante ao da cepa ATCC, porém alguns isolados demonstraram perfil semelhante a cepa ATCC de *C. dubliniensis*. Os isolados mostraram perfis de amplificação com diferença de quantidade de bandas, com variação entre 4 a 8 bandas de tamanho entre 500 a 1650 pb, como pode ser observado na Figura 21.

**Figura 21. Perfis de amplificação por AP-PCR de isolados clínicos de *Candida albicans*, em gel de agarose a 2%.**



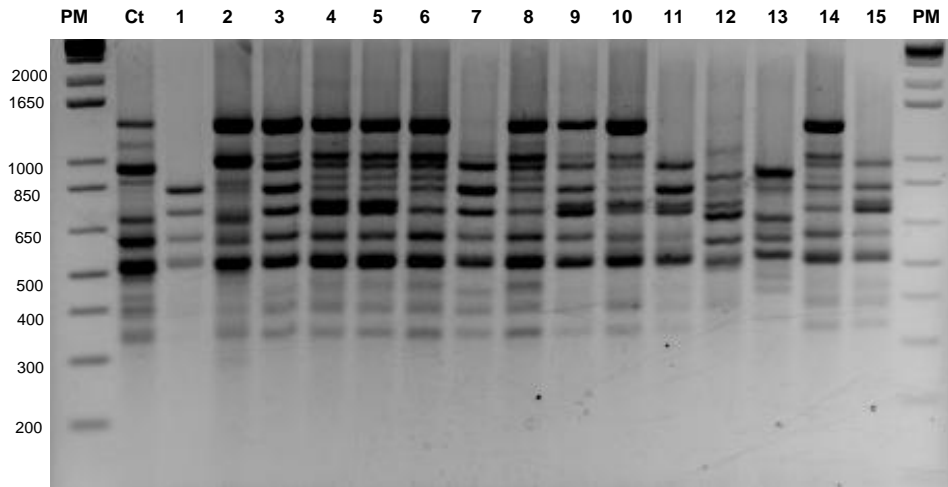
Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (Ca) *C. albicans* ATCC 90028; (1-17) isolados clínicos *C. albicans*.

Todos os 20 isolados de *C. tropicalis* apresentaram perfil semelhante ao da cepa ATCC com padrões de amplificação com variação de quantidade de bandas, mostrando 7 a 12 bandas de tamanho entre 500 a 1650 pb, demonstrando baixa variação intraespécie (Figura 22).

Foi detectada uma variação intraespécie para os isolados de *C. parapsilosis*, foram observados dois perfis diferentes de amplificação. Dos 28 isolados, 19 apresentaram perfil semelhante ao da cepa ATCC com 10 a 14 bandas de tamanho entre 200 a 2000 pb e nove isolados apresentaram padrão distinto e único com 14 a 17 bandas de tamanho entre 300 a 2000 pb (Figura 23).

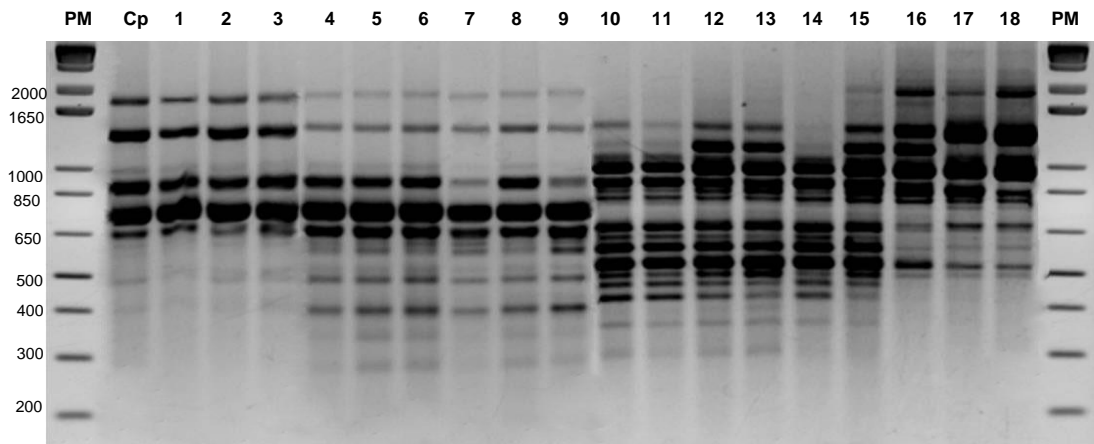


**Figura 22. Perfis de amplificação por AP-PCR de isolados clínicos de *Candida tropicalis*, em gel de agarose a 2%.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (Ct) *C. tropicalis* 28707; (1-15) isolados clínicos *C. tropicalis*.

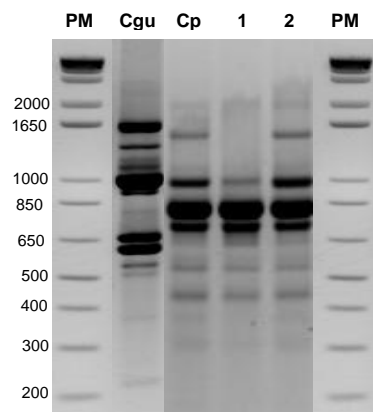
**Figura 23. Perfis de amplificação por AP-PCR de isolados clínicos de *Candida parapsilosis*, em gel de agarose a 2%.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (Cp) *C. parapsilosis* 22019; (1-18) isolados clínicos *C. parapsilosis*.

O único isolado de *C. guilliermondii* apresentou um perfil de amplificação com 12 bandas entre 200 e 2000 pb. Perfil distinto da cepa ATCC da mesma espécie, que apresentou 12 bandas de 200 a 1650 pb, contudo foi parecido com o padrão apresentado pela cepa ATCC e isolados clínicos de *C. parapsilosis* (Figura 24).

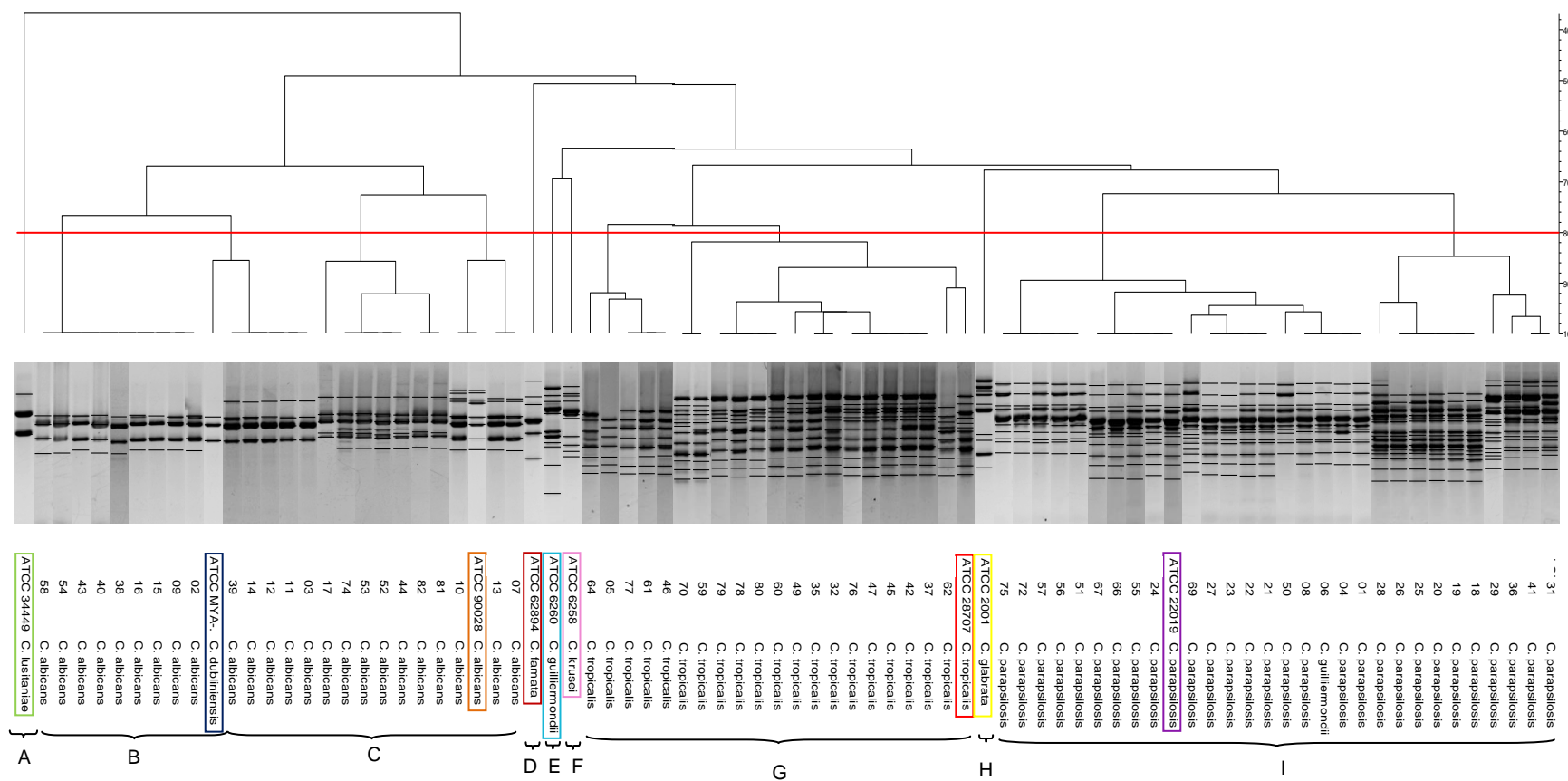
**Figura 24. Perfis de amplificação por AP-PCR de *Candida*, em gel de agarose a 2%.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (Cgu) *C. guilliermondii* 6260; (Cp) *C. parapsilosis* 22019; (1) isolado *C. guilliermondii*; (2) isolado *C. parapsilosis*.

A partir da análise do dendograma gerado com todas as leveduras incluídas no estudo (Figura 25), pode-se observar que todas as nove espécies de *Candida* representadas pelas cepas ATCC foram separadas em grupos distintos e a maioria apresentou relação de similaridade menor que 70%. As cepas padrão ATCC, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. gabrata* foram reunidas, respectivamente, nos grupos A, D, E, F e H. Os isolados clínicos foram distribuídos ao longo do dendograma nos grupos correspondentes as cepas ATCC da mesma espécie, com exceção de 14 isolados de *C. albicans* que foram alocados no grupo B com a ATCC *C. dubliniensis* e do único isolado de *C. guilliermondii* reunido no grupo I com a cepa padrão *C. parapsilosis*. Os outros 10 isolados de *C. albicans* foram associados com a respectiva cepa ATCC no grupo C. No grupo G, foram reunidos os 20 isolados de *C. tropicalis* juntamente com a cepa padrão. Já os 28 isolados de *C. parapsilosis*, foram agrupados com a respectiva cepa ATCC no grupo I.

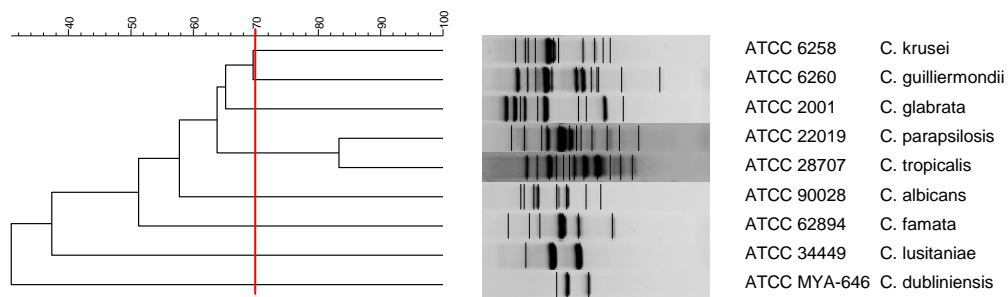
Figura 25. Dendograma de perfis de amplificação por AP-PCR de cepas padrão ATCC e isolados clínicos de *Candida* obtido com Coeficiente de Dice e UPGMA.



Fonte: A autora. A, B, C, D, E, F, G, H, e I: Grupos representativos das nove espécies de *Candida*.

Na Figura 26, pode-se observar dendograma construído somente com as cepas ATCC. Com exceção das espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, que apresentaram similaridade de 84%, todas as outras espécies foram reunidas em grupos com semelhança abaixo ou próxima de 70%.

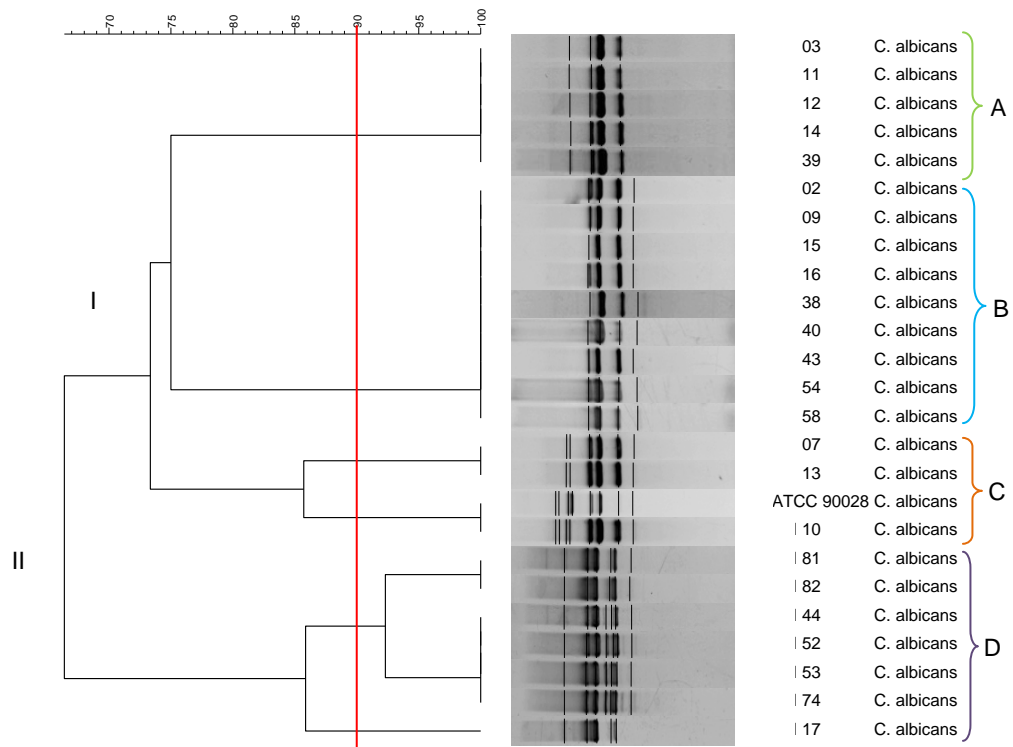
**Figura 26. Dendograma dos perfis de amplificação por AP-PCR de cepas ATCC de *Candida* obtido com Coeficiente de Dice.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (Cgu) *C. guilliermondii* 6260; (Cp) *C. parapsilosis* 22019; (1) isolado *C. guilliermondii*; (2) isolado *C. parapsilosis*.

A Figura 27 mostra o dendograma da espécie *C. albicans* englobando os 24 isolados e a cepa ATCC e pode-se observar a formação de dois grandes grupos (I e II) com similaridade de 66%. O grupo I é composto por 17 isolados além da cepa ATCC *C. albicans* e a formação de subgrupos (A, B, e C) com similaridade de 100% entre os isolados alocados em cada um. A similaridade entre os subgrupos variou de 73-85% e um isolado apresentou similaridade de 100% com a cepa ATCC. Já o grupo II, é composto por sete isolados (subgrupo D), onde a similaridade entre os isolados foi alta e variou 85-100%.

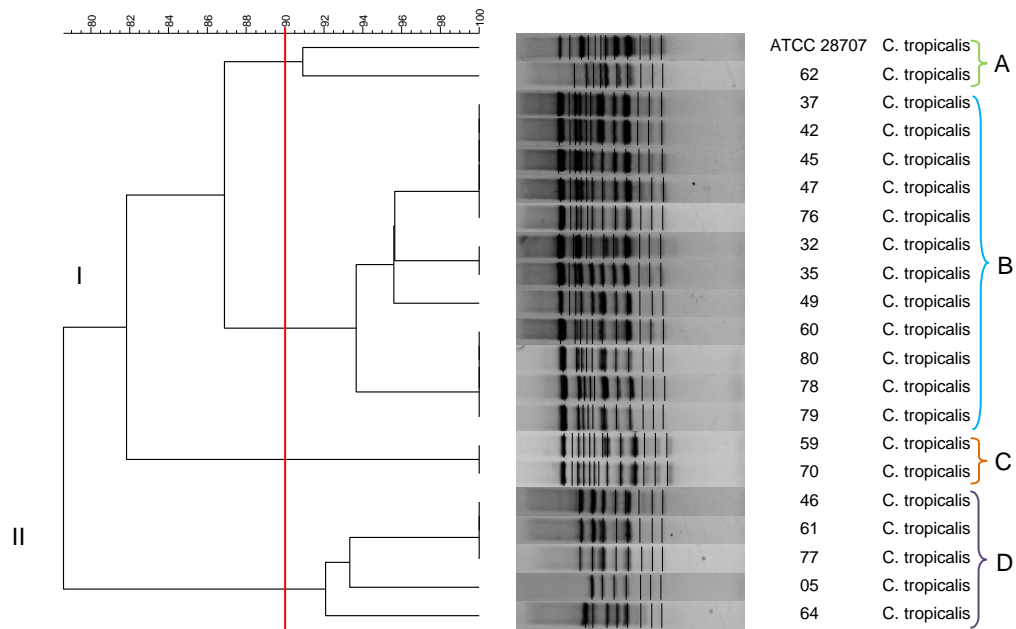
**Figura 27. Dendograma dos perfis de amplificação por AP-PCR de isolados de *Candida albicans* obtido com Coeficiente de Dice.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (Cgu) *C. guilliermondii* 6260; (Cp) *C. parapsilosis* 22019; (1) isolado *C. guilliermondii*; (2) isolado *C. parapsilosis*.

O dendrograma dos isolados da espécie *C. tropicalis* mostra a formação de dois grandes grupos (I e II) com similaridade de 78%. No grupo I, pode-se observar um padrão de amplificação muito semelhante, onde um isolado apresentou similaridade de 91% (subgrupo A) com cepa ATCC *C. tropicalis*. O subgrupo B mostra 12 isolados com alta relação de similaridade 93 a 100%, já o C foi formado com dois isolados com 100% similaridade. O grupo II é composto por cinco isolados (D) e pode-se observar que todos os isolados possuem alta semelhança entre 92-100% (Figura 28).

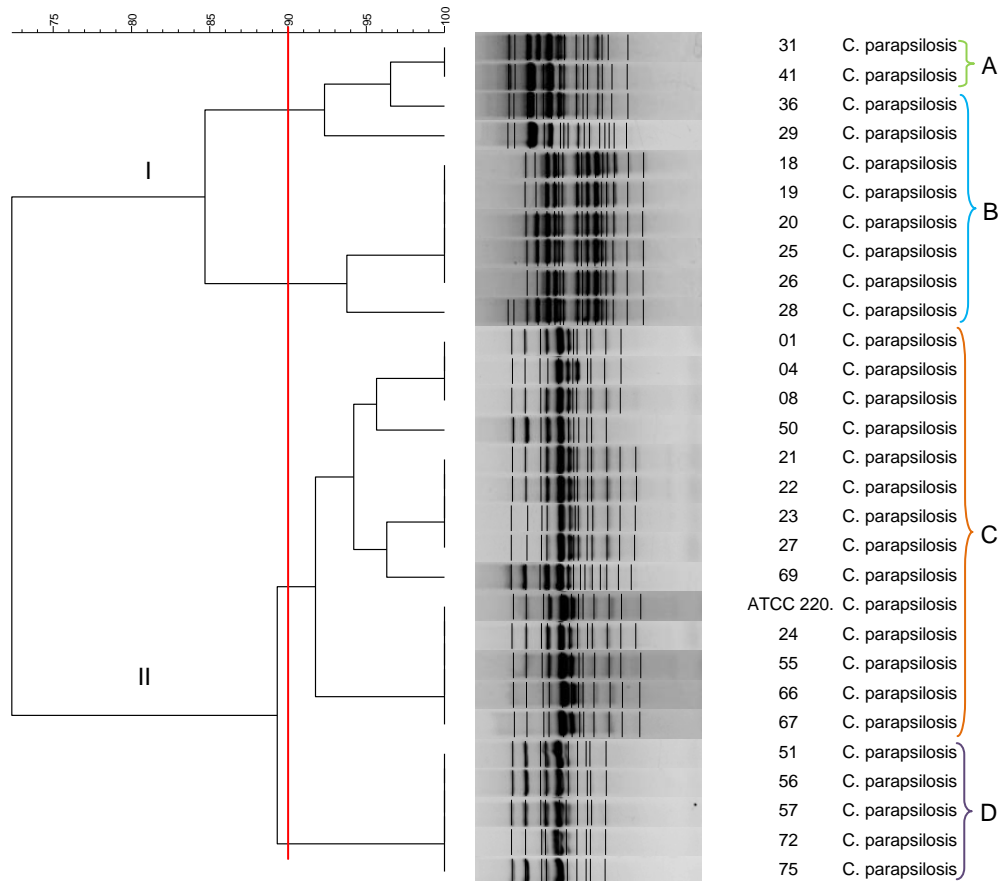
**Figura 28. Dendograma dos perfis de amplificação por AP-PCR de isolados de *Candida tropicalis* obtido com Coeficiente de Dice.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (Cgu) *C. guilliermondii* 6260; (Cp) *C. parapsilosis* 22019; (1) isolado *C. guilliermondii*; (2) isolado *C. parapsilosis*.

Observa-se a formação de dois grandes grupos (I e II) com similaridade de 73% no dendograma dos 28 isolados da espécie *C. parapsilosis*. O grupo I é composto por 10 isolados e pode-se observar a formação de dois subgrupos (A e B) com semelhança de 84% e a similaridade entre os isolados dos dois grupos foi bastante alta e variou entre 92-100%. No grupo II, foram reunidos 18 isolados de *C. parapsilosis* além da cepa ATCC. Foi observado um padrão de amplificação muito semelhante entre os isolados com variação de presença ou ausência de bandas com formação de dois subgrupos (C e D). No C, foram agrupados 13 isolados com similaridades de 92-100%, onde quatro isolados foram alocados com similaridade de 100% com a cepa ATCC *C. parapsilosis*. Já no D, foram reunidos cinco isolados com alta similaridade de 100%. (Figura 29).

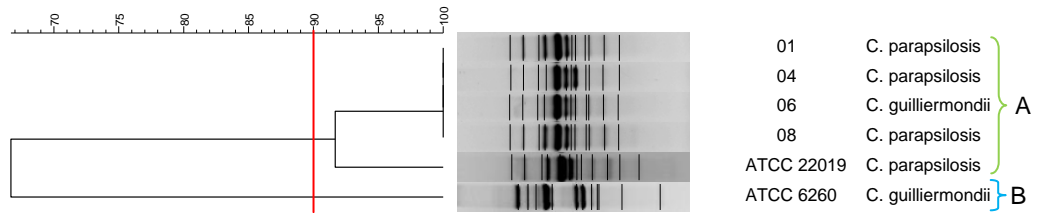
**Figura 29. Dendograma dos perfis de amplificação por AP-PCR de isolados de *Candida parapsilosis* obtido com Coeficiente de Dice.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (Cgu) *C. guilliermondii* 6260; (Cp) *C. parapsilosis* 22019; (1) isolado *C. guilliermondii*; (2) isolado *C. parapsilosis*.

Na Figura 30, pode-se observar o dendrograma do isolado de *C. guilliermondii*, que foi agrupado no mesmo grupo (A) que a cepa ATCC *C. parapsilosis* com uma similaridade de 92%, enquanto que apresentou apenas 63% de semelhança com a cepa *C. guilliermondii* que ficou alocada em outro grupo (B). Além disso, esse isolado apresentou similaridade de 100% com três isolados da espécie *C. parapsilosis*, sendo classificado como não relacionado com ATCC *C. guilliermondii* e altamente relacionado com ATCC *C. parapsilosis*.

**Figura 30. Dendograma dos perfis de amplificação por AP-PCR de isolados de *Candida* obtido com Coeficiente de Dice.**



Fonte: A autora. (PM) Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen); (Cgu) *C. guilliermondii* 6260; (Cp) *C. parapsilosis* 22019; (1) isolado *C. guilliermondii*; (2) isolado *C. parapsilosis*.





Espécies do gênero *Candida*, em particular *C. albicans*, têm emergido como importantes patógenos nosocomiais, estando associadas a quase 80% de todas as infecções fúngicas nosocomiais, representando a maior causa de fungemia. Candidemia é a quarta causa mais comum de infecção na corrente sanguínea em hospitais terciários e sua ocorrência tem sido associada à longa permanência hospitalar com alta mortalidade (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; WISPLINGHOFF et al., 2004; FRANÇA et al., 2008). Nos últimos anos, o número de infecções sistêmicas causadas por espécies de *Candida não-albicans* tem aumentado e, sabe-se que na América Latina há predomínio de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* entre as espécies *não-albicans* causadoras de candidemia, sendo pouco frequente a ocorrência de fungemias por *C. glabrata*. Porém, nos EUA e em muitos países da Europa, a espécie predominante é *C. glabrata* (DIEKEMA et al., 2002; COLOMBO et al., 2003c; TORTORANO et al., 2004; HINRICHSEN et al., 2008).

O aumento do isolamento *in vitro* de espécies de *Candida não-albicans*, em casos de candidemia, tem sido relatado por muitos autores, que sugerem estar esse aumento relacionado à redução da susceptibilidade antifúngica dessas espécies, além do uso profilático de fluconazol (DIEKEMA et al., 2002; ALMIRANTE, et al., 2005; COLOMBO et al., 2006). Fato que causa preocupação com o sucesso do tratamento dessas infecções, pois algumas destas espécies podem mostrar resistência aos antifúngicos usados na rotina (DIEKEMA et al., 2002; MEDRANO et al., 2006).

A resistência à anfotericina B já foi descrita em *C. lusitanae* e em outras espécies como *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr* e *C. rugosa*. Adicionalmente, as espécies *C. glabrata* e *C. krusei* possuem resistência intrínseca ao fluconazol e isolados de *C. dubliniensis* são mais suscetíveis a adquirir resistência a esse antifúngico. A sensibilidade reduzida às equinocandinas já foi relatada em isolados de *C. parapsilosis*, onde foram observados valores mais altos de concentrações inibitórias mínimas (CIM) (COLOMBO et al., 1999; PFALLER, DIEKEMA, 2002; ZAITZ et al., 2010).

Um estudo prospectivo realizado em quatorze hospitais de Barcelona, na Espanha, entre janeiro de 2002 a dezembro de 2003, 345 casos de candidemia foram diagnosticados, com quatro episódios de candidemia recorrente, sendo a maior incidência observada em pacientes com mais de 65 anos e em crianças. Nesse estudo, a espécie mais isolada foi a *C. albicans* (51%), seguida das espécies

*C. parapsilosis* (23%), *C. tropicalis* (10%), *C. glabrata* (9%) e *C. krusei* (4%), sendo a *C. parapsilosis* a espécie mais frequente nos neonatos, somando 67% dos casos (ALMIRANTE et al., 2006).

Capriles e colaboradores (2005), em um hospital pediátrico na Venezuela, durante um ano, identificaram 44 casos de infecção por *Candida*, sendo que 72,06% por *C. albicans*, 13,24% por *C. parapsilosis*, 10,29% por *C. tropicalis*, 2,94% por *C. guilliermondii* e 1,47% por *C. glabrata*. Já Goel e colaboradores (2009), na Índia, relatam 825 casos de suspeita de septicemia neonatal por *Candida*, durante junho a dezembro de 2008, onde foram isoladas 67 leveduras, sendo a espécie mais prevalente a *C. tropicalis* (61,19%), seguida por *C. albicans* (19,40%), *C. glabrata* (11,94%), *C. parapsilosis* (5,97%) e *C. guilliermondii* (1,49%).

Em outro estudo prospectivo da Espanha, em 30 hospitais, durante treze meses, de janeiro de 2009 a fevereiro de 2010, foram identificados 203 episódios de candidemia em crianças. Destes, 72 episódios ocorreram em neonatos com prevalência de *C. albicans* (52,8%), *C. parapsilosis* (33,3%), *C. tropicalis* (4,2%), *C. glabrata* (5,5%), *C. famata* (1,4%), *C. lusitaniae* (1,4%) e *C. krusei* (1,4%) (PEMÁN et al., 2011).

Com relação à epidemiologia de candidemia no Brasil, existem poucos estudos sobre a distribuição e frequência de isolados de *Candida* e, no Nordeste Brasileiro, esses relatos são ainda mais escassos.

No período de agosto de 2002 a agosto de 2003, um total de 120 isolados de *Candida* foi recuperado de pacientes com candidemia na Santa Casa Complexo Hospitalar em Porto Alegre. A espécie *C. albicans* (48,3%) foi a mais prevalente, seguida por *C. parapsilosis* (25,8%), *C. tropicalis* (13,3%), *C. glabrata* (3,3%), *C. krusei* (1,7%), *C. famata* (1,66%), *C. sake* (1,66%), *C. guilliermondii* (1,66%), *C. lusitaniae* (0,83%), *C. dubliniensis* (0,83%) e *C. lipolytica* (0,83%) (ANTUNES et al., 2004). Ainda em Porto Alegre, foi conduzido um estudo retrospectivo no Hospital das Clínicas, no período de abril de 1998 a agosto de 2004. Foram relatados 131 casos de candidemia e na distribuição das espécies, *C. albicans* (45%) foi a mais prevalente, seguida de *C. parapsilosis* (24,4%), *C. tropicalis* (15,3%), *C. glabrata* (6,9%), *C. krusei* (4,6%) e 3,8% outras espécies (*C. pelliculosa*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. kefyr*) (AQUINO et al., 2005). Esses estudos demonstram a importância da identificação da espécie de leveduras, pois foram identificadas espécies pouco frequentes causando candidemia.

Em um hospital terciário de Fortaleza, Ceará, no período de dois anos, 50 hemoculturas foram positivas para *Candida* quando analisadas de 40 pacientes com candidemia, com a frequência de *C. parapsilosis* em 36%, *C. albicans* em 28%, *C. tropicalis* em 16%, *C. guilliermondii* em 12%, *C. glabrata* em 4% e *Candida* sp. em 4%. Esses resultados mostram o crescimento do número de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans*, que totalizaram 72% em contraste a 28% de *C. albicans* (MEDRANO et al., 2006).

Na Bahia, um estudo caso-controle retrospectivo de 69 casos de candidemia em oito anos, dentro de três hospitais privados da cidade do Salvador, revelou somente 14 amostras positivas para *C. albicans* contra 55 amostras de *Candida* não-*albicans*, sendo quatro identificadas como *C. tropicalis*, outras quatro como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. famata* e as 47 restantes como *Candida* sp.. Os autores concluem que houve uma maior prevalência de espécies não-*albicans*, mas como a caracterização destes isolados não foi realizada, não é possível definir o perfil exato de tais infecções nesses hospitais e sugerem que *C. tropicalis* poderia ser a espécie não-*albicans* mais prevalente em Salvador (BARBERINO et al., 2006).

Já em Natal, na unidade de cuidados intensivos neonatal do hospital maternidade Januário Cicco, entre janeiro de 2003 e dezembro de 2004, foram avaliados todos os neonatos com cateter venoso umbilical. De um total de 240 cateteres, 41 foram positivos para leveduras e destas 34 foram identificadas como *C. albicans* (38%), *C. parapsilosis* (29%), *C. tropicalis* (20%), *C. guilliermondii* (3%), *C. famata* (3%) e *Trichosporum* sp. (3%). O estudo mostra que embora *C. albicans* seja isoladamente a espécie predominante, existe o aumento das espécies de *Candida* não-*albicans* quando analisadas conjuntamente (FERNANDES et al., 2007).

Hinrichsen e colaboradores (2008) investigaram a incidência de candidemia e distribuição de espécies de *Candida*, entre setembro de 2003 a março de 2004, em um hospital privado terciário de Recife. Foram observados 21 episódios de candidemia em 18 pacientes e as espécies de *C. não-albicans* representaram mais de 50% dos casos, predominando *C. parapsilosis* (33%) e *C. tropicalis* (24%), seguidas de *C. glabrata* (9,0%), *C. guilliermondii* (5,0%) e a espécie *C. albicans* representou 29,0% dos casos.

Xavier e colaboradores (2008) realizaram um estudo do tipo descritivo retrospectivo, baseado em resultados positivos de hemocultura de pacientes internados na UTI neonatal do Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, entre dezembro de 1998 e outubro de 2006. Dos 25 casos de candidemia revisados, *C. albicans* foi a causa mais comum (44%), seguida de *C. parapsilosis* (40%), *C. tropicalis* (12%), *C. glabrata* (4%).

O programa de Vigilância Epidemiológica do sistema *National Healthcare Safety Network* (NHSN) avaliou a ocorrência de candidemias em neonatos críticos e foi realizado no período de agosto de 2007 a abril de 2008 no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. No total, 114 neonatos foram incluídos no estudo e, apesar de ter sido detectado apenas um caso de candidemia (0,9%), 19,3% (22/114) dos neonatos estavam colonizados por *Candida*, correspondendo a 45 amostras recuperadas de mucosa oral e perianal, sendo caracterizadas como *C. albicans* (51,1%), *C. krusei* (22,2%), *C. glabrata* (15,6%), *C. parapsilosis* (8,9%) e *C. tropicalis* (2,2%). Esses dados mostram que as espécies mais frequentes que colonizaram os neonatos não são as mais descritas como frequentes em casos de candidemia (BORGES et al., 2009).

O nosso estudo é o primeiro a descrever frequência de espécies com caracterização molecular de isolados de *Candida* spp. de uma UTI neonatal na cidade do Salvador. Nele, 67% das leveduras foram identificadas como *Candida* não-*albicans*, fato que corrobora a literatura atual, onde as taxas de infecções por *C. não-albicans* estão superando as taxas de infecções por *C. albicans*. A maioria dos autores sugere que candidemia por *C. parapsilosis* esteja associada à presença de cateter vascular e à nutrição parenteral, *C. tropicalis* com câncer e neutropenia e *C. krusei* e *C. glabrata* associadas à exposição prévia aos antifúngicos azólicos (PFALLER, 1995; COLOMBO et al., 1999; COLOMBO et al., 2006; PFALLER, DIEKEMA, 2007).

A distribuição de espécies de *Candida* isoladas de infecções nosocomiais no ambiente de UTI neonatal tem mudado nos últimos anos, embora a *C. albicans* continue como a espécie mais predominante isoladamente (RODRIGUEZ et al., 2006; REISSA et al., 2008). Em muitas UTIs neonatais, *C. parapsilosis* emergiu como patógeno predominante, causando candidemia em recém-nascidos (HUANG et al., 2004; BENJAMIN et al., 2010; ROILIDES, 2011).

Nos isolados analisados nesse trabalho, a *C. parapsilosis* foi a espécie mais frequente, correspondendo a 38% dos isolados. Sabe-se que o papel da *C. parapsilosis* como agente de candidemia por contaminação exógena está associado à nutrição parenteral e cateter venoso em posição central, usados comumente em pacientes críticos. Além disso, *C. parapsilosis* é a levedura colonizadora mais frequente da região subungueal dos trabalhadores da saúde e a mais frequentemente isolada das mãos desses profissionais (BONASSOLIA, BERTOLIA, SVIDZINSKI, 2005; COLOMBO et al., 2006).

Porém, *C. tropicalis* é raramente encontrada em recém-nascidos, ao contrário dos adultos e crianças com doenças hematológicas malignas, nas quais provoca infecções com alta taxa de mortalidade. A frequência da espécie *C. tropicalis* encontrada por nós é um fato incomum quando se trata de isolados de UTI neonatal, já que a mesma não é descrita como agente frequente nesse tipo de paciente (RODRIGUEZ et al., 2006; REISSA et al., 2008; BENJAMIN et al., 2010; ROILIDES, 2011). Roilides e colaboradores (2004) relatam que a *C. tropicalis* é um patógeno incomum entre neonatos e que a colonização e posterior infecção, pode ocorrer por via cruzada ou associada a intervenções terapêuticas, como uso de cateter venoso e nutrição parenteral. Além disso, sugerem que a epidemiologia de *C. tropicalis* em recém-nascidos não está clara, mas, o potencial para transmissão nosocomial deve ser considerado.

Os métodos laboratoriais tradicionais para a identificação das diferentes espécies de leveduras são bastante laboriosos e leva-se muito tempo para chegar a um resultado final. Com a finalidade de facilitar este processo existem atualmente diferentes métodos de identificação e, recentemente, a utilização de técnicas de biologia molecular tem sido considerada uma importante ferramenta para identificação de patógenos e para estudos de epidemiologia molecular. O aumento da prevalência e da ocorrência de leveduras do gênero *Candida* e de outros gêneros em ambientes hospitalares, torna-se um fator adicional de risco à saúde dos pacientes internados ou dos profissionais e visitantes. Assim, justifica-se plenamente que sejam desenvolvidos e utilizados procedimentos técnicos mais rápidos e precisos para a identificação taxonômica das amostras fúngicas, para que o tratamento dos pacientes infectados seja iniciado na maior brevidade possível (MOUSAVI et al., 2007; XAVIER et al., 2008; SHOKOHI et al., 2010).

Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética em nível de sequência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético, como, por exemplo, a PCR. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações (BORIOLLO et al., 2005).

A extração de DNA trata-se de um procedimento relativamente simples, cuja técnica não envolve metodologia complexa e sofisticada. No entanto, se tratando de micro-organismos eucariontes, como os fungos, a quebra de parede e membrana celular é uma etapa que necessita de um tratamento mais vigoroso do que nos protocolos de micro-organismos procariontes, como as bactérias, já que a parede celular fúngica é mais espessa e rígida (IROBI et al., 1999; LIU et al., 2000; BOLANO et al., 2001; MOUSAVI et al., 2007). Os métodos convencionais para extração de DNA a partir de células de leveduras utilizam lise enzimática, lise mecânica com pérolas de vidro, lise química com detergentes e fenol-clorofórmio (LÖÖKE et al., 2011). Por termos tido dificuldades na obtenção do DNA das leveduras utilizadas nesse estudo, sentimos necessidade de utilizar um protocolo que associasse a lise mecânica com pérolas de vidros à lise química. O resultado foi satisfatório, pois foi possível obter DNAs genômicos de excelente integridade e rendimento, para todos os isolados de *Candida*.

O uso da técnica de PCR-RFLP com iniciadores específicos para a região ITS é bastante relatado atualmente para identificação de *Candida* spp. Como consequência disso, atualmente, um grande número de sequências ITS de diferentes fungos estão disponíveis nos bancos de dados de sequências de nucleotídeos. Já existem trabalhos descritos na literatura que utilizam a técnica de PCR-RFLP baseada na região ITS para amplificação e posterior análise de polimorfismo com uso de enzimas de restrição para identificação de espécies do gênero *Candida* (MORACE et al., 1997; GUILLAMÓN et al., 1998; TROST et al., 2004; PINTO et al., 2004; MOHAMMADI et al., 2012; MOUSAVI et al., 2012). A análise do DNA de espécies de *Candida* utilizando essa técnica possui a vantagem de ser fácil, rápido e confiável, quando comparados com os métodos fenotípicos (WILLIAMS et al., 1995; FUNGARO et al., 2000; SANTOS et al., 2010; MOUSAVI et al., 2012).

Ao avaliarmos os tamanhos dos produtos da PCR da região ITS, usando os iniciadores específicos ITS1 e ITS4, para as cepas ATCC, confirmamos que identificar isolados das espécies *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. famata* e *C. glabrata* seria possível somente com a primeira etapa do método de PCR-RFLP utilizado, pois os tamanhos dos produtos da amplificação foram específicos e distintos. No entanto, para as espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* ficou clara a necessidade da digestão enzimática dos produtos de PCR, pelo fato desses valores estarem próximos e todos acima de 500 pb, não excedendo 550 pb, em 98,5% dos isolados clínicos utilizados, os quais já haviam sido identificados fenotipicamente como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

Outro ponto que foi possível orientar o estudo foi a comparação e confirmação dos produtos de amplificação obtidos com os DNAs das cepas padrão ATCC e dos isolados clínicos com as expectativas de tamanho feitas com base na pesquisa da sequência da região ITS no GenBank, pois os 98,5% esperados apresentaram o tamanho esperado de acima de 500 pb, não excedendo 550 pb. No entanto, para nossa surpresa, o produto do isolado da espécie *C. guilliermondii* ficou fora da expectativa do tamanho do produto obtido pelo DNA da cepa ATCC e do tamanho encontrado no GenBank de aproximadamente 600 pb. O tamanho observado na reação foi exatamente idêntico aos outros isolados, acima de 500 pb, não excedendo 550 pb, fato que gerou dúvidas imediatas com relação à identificação fenotípica. Nesse sentido, a segunda etapa da reação foi importante e necessária para a realidade dos isolados clínicos envolvidos nesse estudo.

Foi possível constatar e confirmarmos que todos os perfis das cepas ATCCs gerados pelas quatro enzimas de restrição utilizadas, *Ddel*, *HaeIII*, *Bfal* e *MspI*, ficaram dentro das estimativas de tamanhos de fragmentos gerados nos mapas de restrição desenhados pelos cortes nas sequências de nucleotídeos da região ITS, obtidas no GenBank.

Com a restrição pela enzima *Ddel*, foi difícil a diferenciação das espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*, com um perfil muito próximo e semelhante de dois fragmentos de aproximadamente 100 e 400 pb, bem como para as espécies *C. krusei* e *C. parapsilosis*, de aproximadamente 500 pb. Quando a enzima utilizada foi a *HaeIII*, a mesma situação de não possibilidade de diferenciação clara entre essas espécies foi constatada tendo em vista um perfil muito semelhante de dois



fragmentos próximos de aproximadamente 100 e 400 pb. A diferenciação entre as espécies teve um perfil melhor de diferenciação quando a restrição foi realizada com a enzima *Bfal*, pois somente as espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis* não conseguiram ser diferenciadas; além dessa enzima ter sido a única que diferenciou as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*. A digestão com a enzima *MspI* permitiu a completa distinção entre as sete espécies *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. famata*, porém não diferenciou as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Esse perfil vem mostrar a necessidade da utilização de mais de uma enzima de restrição na reação de PCR-RFLP da região do ITS, para que se possa abranger o maior número de espécies a serem identificadas pela técnica.

Os perfis de restrição gerados pelos isolados clínicos, identificados bioquimicamente como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, comparativamente aos gerados pelas cepas padrão de referência foram idênticos, o que permitiu o sucesso da identificação dos mesmos pela técnica de PCR-RFLP, não havendo discriminação entre a técnica fenotípica e a genotípica para esses isolados. A dúvida gerada, na primeira etapa da reação, com relação à identificação fenotípica do isolado de *C. guilliermondii*, nessa etapa nos levou a reidentificá-lo, pois os resultados dos perfis de restrição, com as quatro enzimas incluídas nesse estudo, são idênticos aos perfis da espécie *C. parapsilosis*. Com relação à identificação dos outros isolados podemos correlacionar uma concordância de 98,5% entre a identificação entre as técnicas fenotípica e molecular.

Williams e colaboradores (1995) descreveram o uso da técnica de PCR-RFLP para identificação de oito espécies de *Candida* clinicamente importantes, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*, utilizando iniciadores específicos para a região ITS, ITS1 e ITS4, com posterior restrição desses produtos de amplificação com as enzimas *Ddel*, *HaeIII* e *Bfal*. Os produtos de amplificação com os iniciadores, ITS 1 e ITS 4, obtidos apresentaram tamanhos específicos para a *C. glabrata* de 800 pb, *C. guilliermondii* de 600 pb e *C. pseudotropicalis* de 650 pb e um produto de aproximadamente 520 pb para as demais espécies. Além disso, os autores concluíram que a enzima *Bfal* proporcionou melhor distinção baseada nos perfis de restrição entre os isolados e que *Ddel* e *HaeIII* podem ser usadas para confirmação desses resultados.

Irobi e colaboradores (1999) relataram o uso da técnica de PCR-RFLP para identificação de sete espécies de *Candida* com os iniciadores específicos ITS5 e NL4, com as mesmas enzimas de restrição do estudo anterior. A PCR com o DNA das espécies *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. inconspicua* gerou produtos de tamanhos únicos de aproximadamente 1500, 1300 e 1100 pb, respectivamente, e para as espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* um produto de aproximadamente 1200 pb foi obtido. Dos 114 isolados clínicos estudados, 78 foram identificados bioquimicamente como *C. albicans* e 10 como *C. dubliniensis*, porém após realização do PCR-RFLP, foi possível detectar que na verdade dois isolados identificados como *C. albicans* eram da espécie *C. dubliniensis* e um identificado como *C. dubliniensis* era *C. albicans*. A restrição com a enzima *Ddel* possibilitou essa diferenciação e todos os outros isolados tiveram identificação bioquímica confirmada pelo PCR-RFLP.

Em 2003, Cirak e colaboradores também utilizaram os iniciadores específicos ITS1 e ITS4 e as mesmas enzimas de restrição do estudo de Willians e colaboradores (1995) para identificação de espécies de *Candida*. Os 44 isolados obtidos de diversos espécimes clínicos foram identificados como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. rugosa*. Os autores concluíram que a enzima *HaeIII* diferenciou a espécie *C. albicans* das outras não-*albicans*. Entretanto, em nossos resultados e os descritos por Williams e colaboradores (1995), a restrição com essa enzima não distinguiu claramente as espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, dado que foi demonstrado e confirmado pelo mapa de restrição construído.

Outros autores também obtiveram resultados semelhantes utilizando com mesmos iniciadores e enzimas que utilizamos para identificação de *Candida* (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999; KORABECNA et al., 2003; MOUSAVI et al., 2007; SIMONA et al., 2009; MOHAMMADI et al., 2011). No entanto, o produto obtido de aproximadamente 400 pb para *C. glabrata* por Santos e colaboradores (2010) não corrobora os outros estudos já publicados, com um tamanho de aproximadamente 880 pb, incluindo o nosso; nem a estimativa de tamanho feita pela análise da sequência de nucleotídeos da região ITS encontrada no GenBank. Neste contexto, colocamos a importância do estudo teórico baseado na pesquisa da sequência de nucleotídeos, feita em um banco de dados, com consequente localização dos iniciadores para estimativa do tamanho dos produtos de amplificação. Além disso, o

posterior estudo dos sítios de restrição das enzimas nas sequências estudadas de cada espécie de *Candida* e a utilização de cepas padrão para padronização dessas técnicas também se torna fundamental.

Mirhendi e colaboradores (2006) propuseram a utilização da técnica de PCR-RFLP com os iniciadores específicos ITS1 e ITS4 e uma única enzima de restrição, a *MspI*, para identificação de 137 isolados das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Os autores relatam o sucesso do trabalho com a produção de perfis únicos para essas espécies e não julgam necessária a utilização de outras enzimas. Porém, ressaltam que a restrição com *MspI* não permitiu a diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, dado que corrobora nossos resultados para a restrição com essa enzima, além de termos mostrado que as espécies *C. lusitaniae* e *C. famata* produzem perfis únicos.

Posteriormente, com a mesma metodologia, Fahami e colaboradores (2010) identificaram com sucesso 104 isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. famata* e *C. lusitaniae*. Esses dados corroboram os resultados do nosso estudo, pois utilizamos os mesmos iniciadores e também a enzima *MspI* e obtivemos resultados satisfatórios na identificação de 73 isolados. Em 2012, com a mesma enzima e os mesmos iniciadores, Mousavi e colaboradores identificaram e diferenciaram 139 isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. kefyr*.

Nawrot e colaboradores (2011) publicaram um estudo teórico sobre a análise do sítio de restrição de enzimas nas sequências de nucleotídeos do rDNA de quatorze espécies de *Candida* clinicamente relevantes e avaliaram o potencial para ser usado no método de RFLP para a construção de testes de diagnóstico. As espécies estudadas foram *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. lusitaniae* e *C. lipolytica*. Os tamanhos estimados dos produtos de amplificação da região ITS, com iniciadores ITS1 e ITS4, confirmam nossas estimativas também feitas com base em pesquisa no GenBank, pois após análise do sítio de restrição com a enzima *HaeIII*, foi possível diferenciar onze espécies de *Candida*. Além disso, os autores também relatam que a enzima *Bfal* pode ser utilizada para diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, dado também confirmado com nossos resultados.

Grande parte dos estudos não inclui a espécie *C. dubliniensis* entre as espécies padronizadas para identificação, esse fato pode ser justificado por conta da sua alta similaridade genotípica com *C. albicans*, o que dificulta a diferenciação dessas espécies (BAUTISTA-MUÑOZ et al., 2003; MIHERNDI et al., 2005; NEPPELENBROEK et al., 2006). Entretanto, deve ser levado em consideração que já existem relatos de infecção sistêmica causada por essa espécie que comumente causa candidíase oral e que são necessários métodos que identifiquem corretamente essa espécie (BARADKAR et al., 2008; LORETO et al., 2010; YU et al., 2012; KHAM et al., 2012). No nosso estudo, *Bfal* foi a única enzima que diferenciou as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*, podendo então ser utilizada para confirmação de casos em que há suspeita de infecção por *C. dubliniensis*.

Constatamos que a técnica de PCR-RFLP utilizando os iniciadores específicos ITS1 e ITS4 e a restrição com enzima *MspI* mostrou resultados satisfatórios para a maioria das espécies incluídas no estudo, com exceção de *C. dubliniensis*; porém foi capaz de diferenciar as principais espécies de *Candida* que são relatadas como mais frequentes causando candidemia no nosso país, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*. Demonstrou ser uma técnica rápida, fácil interpretação, reprodutível e que pode ser aplicada para identificação de espécies clinicamente importantes de *Candida* para auxílio no diagnóstico mais rápido e tratamento mais eficiente. Com relação a identificação de *C. dubliniensis*, sugerimos o uso da enzima *Bfal* para diferenciação com a espécie *C. albicans*.

Apesar da origem dos isolados incluídos no nosso estudo ser de UTI neonatal, acreditamos que essa técnica pode ser utilizada para isolados de *Candida* provenientes de infecções invasivas, candidíases cutâneas e casos de colonização, além de isolados de outros espécimes clínicos. Existem trabalhos descritos na literatura utilizando a técnica de PCR-RFLP com isolados clínicos de *Candida* provenientes de origens diversas, como por exemplo, pacientes portadores de SIDA (IROBI et al., 1999), portadores de vaginites (MOUSAVI et al., 2007), pacientes com câncer (SHOKOHI et al., 2010), com candidemia (FAHAMI et al., 2010; GHARI, 2012), com candidíases diversas (MOHAMMADI et al., 2011), candidíase vulvovaginal (MOHAMMADI et al., 2012) e colonização oral (MOUSAVI et al., 2012).

A técnica de AP-PCR com o iniciador AP-4 possibilitou a distinção das nove espécies cepas padrão ATCC de *Candida* incluídas no estudo, já que todas as espécies apresentaram perfis de amplificação com número, intensidade e tamanho

de banda específico. Essa diferenciação pode ser feita claramente pelo gel de eletroforese, e também na análise do dendograma, já que cada espécie foi alocada em grupo distinto e a relação de similaridade variou de 38-69%, ratificando o poder de diferenciação das diferentes espécies.

No presente estudo, os resultados com a amplificação com o iniciador AP-4 foram obtidos após otimização das condições ideais para detecção de produtos de PCR satisfatórios para análise desses perfis. Além disso, as reações também foram repetidas mais de uma vez para confirmação da reprodutibilidade da técnica com esse iniciador. Um dos fatores que limitam o uso dessa técnica em estudos de genética molecular é a reprodutibilidade dos produtos de amplificação que depende das condições da reação de PCR. Por conta disso, se torna extremamente importante a otimização das condições de amplificação da reação para que esses resultados sejam reprodutíveis intra e interlaboratórios (WILLIAMS et al., 1990; WELSH, MCCLELLAND, 1990; CASTIGLIONI, BICUDO, 2003).

Sansinforiano e colaboradores (2001) estudaram as condições para otimização da reação de RAPD para leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus*. Dentre os fatores estudados, estavam as concentrações de DNA Taq polimerase, íons magnésio, iniciadores arbitrários, dNTPs, DNA molde, condições de amplificação, temperatura de pareamento. Os autores concluíram que todos esses fatores são extremamente importantes para a padronização e otimização da reação. Também relataram que concentrações diferentes de íons magnésio foram necessárias para otimizar a reação para *Candida* e *Cryptococcus*, além de diferenças na duração do tempo de pareamento do iniciador. Além disso, as amplificações RAPD são repetidas várias vezes, onde a maioria dos marcadores são reproduzíveis e identificáveis; além de se estabelecer melhoramentos nos procedimentos de eletroforese, como a utilização de géis de agarose contendo baixo ponto de fusão (*Low Melting Point*), mais resolutiva, ou então um tempo de migração maior (WILLIAMS et al., 1990; WELSH, MCCLELLAND, 1990; CASTIGLIONI, BICUDO, 2003).

Com relação à identificação dos isolados, a amplificação com o iniciador AP-4 possibilitou a identificação dos isolados *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, confirmando a identificação bioquímica destes. Porém, quatorze isolados de *C. albicans* foram alocados no mesmo grupo que a cepa padrão ATCC *C. dubliniensis*. Esse fato demonstra que o iniciador AP-4 não permitiu a produção de perfis de amplificação

específicos para essas duas espécies, ressaltando a importância da inclusão da espécie *C. dubliniensis* em estudos de identificação molecular de *Candida* a fim de encontrar marcadores de amplificação que possibilitem essa diferenciação. Porém, vale ressaltar que com relação ao isolado da espécie *C. guilliermondii*, essa técnica possibilitou a identificação correta desse isolado como *C. parapsilosis*, pois apresentou alta similaridade com a cepa ATCC e 100% de similaridade com outros isolados dessa espécie.

Thanos e colaboradores (1996) obtiveram resultados satisfatórios para identificação de espécies de *Candida* utilizando os iniciadores arbitrários AP-3 (10 nucleotídeos), T3B (19 nucleotídeos) derivado das regiões espaçadoras intergênicas e os microssatélites (GTG)<sub>5</sub> e (AC)<sub>10</sub>. Os autores observaram produtos de amplificação distintos e reprodutíveis para vinte e seis espécies diferentes de *Candida* e outras oito espécies de fungos. Os números e tamanhos dos produtos de amplificação foram característicos para cada espécie e foi possível distinguir claramente os seus padrões de amplificação. O poder discriminatório dos quatro iniciadores utilizados neste estudo foi semelhante, no entanto, diferenças mais importantes e significativas foram observadas entre os perfis gerados por iniciadores T3B e AP-3.

Em outro estudo, relatado por Correia e colaboradores (2004) com o iniciador T3B com 19 nucleotídeos, foi possível identificar as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*. Todos os isolados clínicos foram alocados nos respectivos grupos com as cepas ATCC correspondentes e 98% dos 177 isolados foram identificados com sucesso. Para análise de dendograma, foi utilizado coeficiente de Dice e o poder de discriminação do iniciador foi considerado satisfatório, pois foi possível distinguir claramente espécies altamente correlacionadas como *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Os quatro isolados que apresentaram perfis peculiares de amplificação foram investigados por sequenciamento do domínio D1/D2 do rDNA 26S e as sequências de três isolados mostraram uma similaridade de 100% entre eles e um isolado foi altamente relacionado com *C. parapsilosis*, porém essa relação pode ser justificada por conta das três espécies geneticamente distintas *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*.

Os isolados de *C. tropicalis* apresentaram uma baixa variação intraespécie e a maioria dos isolados apresentou similaridade maior que 90%. Segundo Roilides e

colaboradores (2004), esse fato pode ser justificado por conta dessa espécie ser pouco frequente em neonatos e a origem da infecção ser possivelmente exógena por via cruzada. Já na amplificação com os isolados da espécie *C. albicans*, observou-se uma maior variação intraespécie, porém foram observados grupos consistentes com 100% de similaridade entre os isolados, alguns autores relatam que a maioria das infecções causadas por essa espécie tem origem endógena (RIBEIRO et al., 2004; BARBEDO, SGARBI, 2010; GIOLO, SVIDZINSKI, 2010). Dentre os isolados de *C. parapsilosis*, foi possível observar uma variação intraespécie com a formação de dois perfis de amplificação específicos e essa variação pode ser justificada pelo fato de atualmente a espécie *C. parapsilosis* ser formada por um complexo de três espécies só distinguidas molecularmente (TAY et al., 2009; TAVANTI et al., 2010). Nossos resultados, só podem sugerir a presença do complexo *parapsilosis*, pois seria necessária a utilização de cepas padrão ATCC das espécies *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* para confirmação. Lehmann e colaboradores (1992) observaram a presença de três grupos consistentes com amplificação distinta entre os isolados de *C. parapsilosis* e também houve a sugestão de se tratar de espécies correlacionadas geneticamente.

Valério e colaboradores (2006) estudaram os perfis gerados pela técnica de RAPD utilizando 15 iniciadores, sendo onze deles com sequência de 10 nucleotídeos e quatro com 19 a 21 nucleotídeos em treze isolados de *Candida*. Foram detectadas poucas diferenças entre os isolados da mesma espécie, sendo difícil identificar iniciadores capazes de detectar polimorfismos intraespecíficos entre as espécies, estudando *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Contudo, dois isolados identificados bioquimicamente como *C. albicans* foram reidentificados como *C. glabrata* após reação de RAPD e os autores sugerem que os testes fenotípicos foram insatisfatórios.

Rocha e colaboradores (2008) analisaram por amplificação aleatória de DNA polimórfico 34 isolados de *Candida*, 24 *C. albicans*, quatro *C. tropicalis*, dois *C. parapsilosis*, dois *C. dubliniensis*, um *C. glabrata* e um *C. krusei* e foi utilizado o iniciador OPG-10, com dez nucleotídeos. Os resultados demonstraram que a reação de RAPD foi capaz de classificar os isolados de forma coerente, reunindo os isolados da mesma espécie em um mesmo grupo no dendograma, com exceção dos dois isolados de *Candida parapsilosis*, e esse fato pode ser justificado pela nova classificação da espécie *C. parapsilosis* em complexo *parapsilosis*.

Os dados gerados por amplificação de DNA com iniciadores arbitrários podem ser avaliados de forma visual no gel de agarose ou digitalmente, utilizando-se softwares específicos para essa finalidade. O Coeficiente de Dice é um parâmetro muito utilizado para avaliar similaridade de *Candida* neste tipo de estudo (SOLL et al., 2000). Além da análise feita visualmente no gel de agarose, também usamos o coeficiente de Dice e o método UPGMA em nosso estudo para avaliação dos resultados obtidos com a reação de AP-PCR e a escolha demonstrou ser satisfatória para avaliação dos perfis obtidos com essa reação. A opção por esses parâmetros foi feita por conta da descrição na literatura e recomendação da maioria dos autores por esses, já que não existe um consenso em reações de RAPD e AP-PCR sobre qual utilizar.

A identificação incorreta de leveduras demonstrou que os tradicionais testes bioquímicos, largamente utilizados para identificação das espécies, podem não demonstrar sensibilidade para pequenas diferenças entre os isolados de leveduras provenientes de candidemia hospitalar. Neste contexto, concluímos que as técnicas moleculares utilizadas nesse estudo podem ser utilizadas com o objetivo de identificar espécies de *Candida* clinicamente importantes auxiliando no tratamento adequado.





1. A frequência encontrada de 67% de espécies de *Candida não-albicans* e a predominância de *C. parapsilosis* enfatizam a importância da identificação dessas leveduras.
2. A técnica de extração de DNA demonstrou resultados satisfatórios.
3. A identificação pela técnica de PCR-RFLP, utilizando os iniciadores universais ITS 1 e ITS4 para identificação de nove espécies de *Candida*, demonstraram os melhores resultados com as enzimas *MspI* e *BfaI*.
4. O estudo teórico feito com as sequências das nove espécies da região ITS obtidas no GenBank e os mapas construídos com base no sítio de restrição das enzimas foram importantes para confirmar os resultados da técnica de PCR-RFLP.
5. A análise genotípica realizada com a técnica de AP-PCR com iniciador AP-4:
  - a. Demonstrou poder discriminatório diferenciando as espécies de *Candida*, com exceção das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*.
  - b. Sugestiu a existência de espécies diferentes do Complexo *parapsilosis*.
6. Com as técnicas moleculares de PCR-RFLP e AP-4, foi possível reidentificar o isolado de *C. guilliermondii* como *C. parapsilosis*.
7. A correlação entre a identificação através das técnicas bioquímicas e dos métodos de biologia molecular foi de 98,5%.



1. Ampliar o estudo com outras espécies de *Candida* e com isolados oriundos de espécimes clínicos diferentes.
2. Distinguir as espécies do Complexo *parapsilosis* com sequenciamento e outras técnicas moleculares.
3. Incluir outros iniciadores arbitrários para determinação de melhores marcadores moleculares para identificação de espécies e avaliação de variações intraespécies.
4. Realizar tipagem molecular com a técnica de PFGE (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”).
5. Determinar os tipos seqüências pela técnica de MLST (“Multilocus Sequence Typing”).
6. Correlacionar a caracterização molecular com avaliação de susceptibilidade antifúngica.

## REFERÊNCIAS

- ALIYU, S. H.; ENOCH, D. A.; ABUBAKAR II, A. R.; CARMICHAEL, A. J.; FARRINGTON, M.; LEVER, M. L. Candidemia in a large teaching hospital: a clinical audit. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 99, p. 55-663, 2006.
- ALMIRANTE, B.; RODRIGUEZ, D.; PARK, B. J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A. M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S. K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; WARNOCK, D. W.; PAHISSA, A. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1829-1835, 2005.
- ALMIRANTE, B.; RODRIGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; ALONSO-TARRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; PAHISSA, A. Epidemiology, Risk Factors, and Prognosis of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections: Case-Control Population-Based Surveillance Study of Patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1681-1685, 2006.
- ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, out. 2007.
- ANTONINI, S. R. C.; MENEGHIN, S. P.; URASHIMA, A. S. **Técnicas Básicas de Biologia Molecular**. Araras: EdUFSCar, 2004. 57p.
- ANTUNES, A. G. V.; PASQUALOTTO, A. C.; DIAZ, M. C.; D'AZEVEDO, P. A.; SEVERO, L. C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 5, p. 239-241, 2004.
- AQUINO, V. R.; LUNARDI, L. W.; GOLDANI, L. Z.; BARTH, A. L. Prevalence, Susceptibility Profile for Fluconazole and Risk Factors for Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 2005.
- ASADZADEH, M.; AHMAD, S.; AL-SWEIH, N.; KHAN, Z. U. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 745-752, 2009.
- ASBECK, E. C.; HUANG, Y.; MARKHAM, A. N.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 164, p. 287-293, 2007.
- A'SMUNDSO'TTIR, L. R.; ERLENDSDO'TTIR, H.; HARALDSSON, G.; GUO, H.; XU, J.; GOTTFREDSSON, M. Molecular Epidemiology of Candidemia: Evidence of

Clusters of Smoldering Nosocomial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 17-24, 2008.

BARADKAR, V. P.; MARTHUR, M.; KUMAR, S. Neonatal septicaemia in a premature infant due to *Candida dubliniensis*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 382-38, 2008.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARBERINO, M. G.; SILVA, N.; REBOUÇAS, C.; BARREIRO, K.; ALCÂNTARA, A. P.; NETTO, E. M.; ALBUQUERQUE, L.; BRITES, C. Evaluation of Blood Stream Infections by *Candida* in Three Tertiary Hospitals in Salvador, Brazil: A Case-Control Study. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 36-40, 2006.

BARTIE, K. L.; WILLIAMS, D. W.; WILSON, M. J.; POTTS, A. J. C.; LEWIS, M. A. O. PCR Fingerprinting of *Candida albicans* Associated with Chronic Hyperplastic Candidosis and Other Oral Conditions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4066–4075, nov. 2001.

BAUTISTA-MUNÓZ, C.; BOLDO, X. M.; VILLA-TANACA, L.; HERNANDEZ-RODRÍGUEZ, C. Identification of *Candida* spp. by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Direct PCR Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 414-420, jan. 2003.

BECK-SAGUÉ, C.; JARVIS, W. R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. **Journal Infectious Diseases**, v. 167, n. 5, p. 1247-1251, maio 1993.

BENJAMIN, D. K. J. R.; POOLE, C.; STEINBACH, W. J.; ROWEN, J. L.; WALSH, T. J. Neonatal candidemia and end-organ damage: a critical appraisal of the literature using meta-analytic techniques. **Pediatrics**, v. 112, n. 3, p. 634-640, 2003.

BENJAMIN, D. K. J. R.; DRISCOLL, T.; SEIBEL, N. L.; GONZALEZ, C. E.; RODEN, M. M.; KILARU, R.; CLARK, K.; DOWELL, J. A.; SCHRANZ, J.; WALSH, T. J. Safety and Pharmacokinetics of intravenous anidulafungin in children with neutropenia at high risk for invasive fungal infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 632-638, 2006.

BENJAMIN, D. K. J. R.; STOLL, B. J.; GANTZ, M.G.; WALSH, M. C.; SÁNCHEZ, P. J.; DAS, A.; SHANKARAN, S.; HIGGINS, R. D.; AUTEN, K. J.; MILLER, N. A.; WALSH, T. J.; LAPTOOK, A. R.; CARLO, W. A.; KENNEDY, K. A. C.; FINER, N. N.; DUARA, S.; SCHIBLER, K.; CHAPMAN, R. L.; VAN, M. K. P. V.; FRANTZ, I. D.; PHELPS, D. L.; POINDEXTER, B. B.; BELL, E. F.; O'SHEA, T. M.; WATTERBERG, K. L.; GOLDBERG, R. N.; SHRIVER, E. K. Neonatal candidiasis epidemiology, risk factors, and clinical judgment. **Pediatrics**, v. 126, n. 4, p. 865-873, 2010.

BLYTH, C. C.; CHEN, S. C. A.; SLAVIN, M. A.; SERENA, C.; NGUYEN, Q.; MARRIOTT, D.; ELLIS, D.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. Not Just Little Adults:

Candidemia Epidemiology, Molecular Characterization, and Antifungal Susceptibility in Neonatal and Pediatric Patients. **Pediatrics**, v. 123, n. 5, p. 1360-1368, 2009.

BINELLI, C. A.; MORETTI, M. L.; ASSIS, R. S.; SAUAIA, N.; MENEZES, P. R.; RIBEIRO, E.; GEIGER, D. C.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M.; OLIVEIRA, M. S.; BARONE, A. A.; LEVIN, A. S. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidemia. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 12, n. 6, p. 538-543, 2006.

BOLANO, A.; STINCHI, S.; PREZIOSI, R.; BISTONI, F.; ALLEGRUCCI, M.; BALDELLI, F.; MARTINI, A.; CARDINALI, G. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, v. 1, p. 221-224, 2001.

BONASSOLIA, L. A.; BERTOLIA, M.; SVIDZINSKI, T. I. E. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, p. 159-162, 2005.

BORGES, R. M.; SOARES, L. R.; BRITO, C. S.; BRITO, D. V. D.; ABDALLAH, V. O. S.; FILHO, P. P. G. Fatores de risco associados à colonização por *Candida* spp. em neonatos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 431-435, 2009.

BORIOLO, M. F. G.; HÖFLING, J. F.; MENDES, A.; ROSA, E. A. R. Molecular tools for the characterization of *Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923) in epidemiological surveys. **Revista Estudos de Biologia**, v. 27, n. 58, p. 21-47, 2005.

BONATTI, H.; STELZMUELLER, I.; BERGER, N.; LECHNER, M.; GRIF, K.; GELTNER, C.; MARGREITER, R.; LASS-FLO, C. Infections Caused by *Candida krusei* in Five Transplant and Two Surgical Patients. **Surgical Infections**, v. 10, n. 3, p. 265-271, 2009.

BOW, E. J.; EVANS, G.; FULLER, J.; LAVERDIÈRE, M.; RENNIE, R.; SHAFRAN, S. D.; SHEPPARD, D.; CARLE, S.; PHILLIPS, P.; VINH, D. C. Canadian clinical practice guidelines for invasive candidiasis in adults. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 122-150, 2010.

BRITO, G. N. B.; INOCÊNCIO, A. C.; QUERIDO, S. M. R.; JORGE, A. O. C.; KOGAITO, C. Y. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* spp. oral isolates from HIV positive patients and control individuals. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 1, p. 28-33, 2010.

BRUDER-NASCIMENTO, A.; CAMARGO, C. H.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T. M.; AUGUSTO, C.; MONDELLI, A. L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary Hospital. **BMC Research Notes**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2010.

BUTLER, G. Fungal Sex and Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 140-159, 2010.

- CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 437-442, 2000.
- CANTÓN, E.; VIUDES, Á.; PEMÁN, J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, p. 51-55, 2001.
- CAPRILES, C. H. M.; MATA-ESSAYAG, S.; AZPIRÓZ, A.; PONENTE, A.; MAGALDI, S.; PÉREZ, S. C.; ROSELLÓ, A.; COLELLA, M. T.; MACHUCA, J. Neonatal candidiasis in Venezuela: Clinical and epidemiological aspects. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 47, n. 1-2, p. 11-20, 2005.
- CARRASCO, L.; RAMOS, M.; GALISTEO, R.; PISA, D.; FRESNO, M.; GONZA´LEZ, M. E. Isolation of *Candida famata* from a Patient with Acute Zonal Occult Outer Retinopathy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 635-640, 2005.
- CASTIGLIONI, L.; BICUDO, H. E. M. C. A Técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e suas aplicações para estudos em genética molecular. **Revista UNORP**, v. 3, n. 2, p. 63-77, 2003.
- CHAVASCO, J. K.; PAULA, C. R.; HIRATA, M. H.; ALEVA, N. A.; de MELO, C. E.; GAMBALE, W.; RUIZ, L. da S.; FRANCO, M. C. Molecular Identification Of *Candida dubliniensis* Isolated From Oral Lesions Of Hiv-Positive And Hiv-Negative Patients In São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 21-26, 2006.
- CIRAK, M. Y.; Kalkanci, A.; Kustimuret, S. Use of Molecular Methods in Identification of *Candida* Species and Evaluation of Fluconazole Resistance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1027-1032, 2003.
- COLOMBO, A. L. Gastrointestinal translocation as a possible source of candidemia in na AIDS patient. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 197-200, 1996.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M. L.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S. B. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 281-286, 1999.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003a.
- COLOMBO, A. L.; MELO, A. S. A.; ROSAS, R. F. C.; SALOMÃO, R.; BRIONES, M.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 46, n. 4, p. 253-257, 2003b.
- COLOMBO, A. L.; PERFECT, J.; DINUBILE, M.; BARTIZAL, K.; MOTYL, M.; HICKS, P.; LUPINACCI, R.; KARTSONIS, C. S. N. Global Distribution and Outcomes for



*Candida* Species Causing Invasive Candidiasis: Results from an International Randomized Double-Blind Study of Caspofungin Versus Amphotericin B for the Treatment of Invasive Candidiasis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, p. 470-474, 2003c.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUE´R, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; da MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A. L.; GARNICA, M.; ARANHA, C. L. F.; DA CUNHA, C. A.; BANDEIRA, A. C.; BORGHI, D.; CAMPOS, T.; SENNA, A. L.; VALIAS, D. M. E.; DIAS, V. C.; NUCCI, M. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, jul. 2012. Disponível em: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/13693786.2012.698024>. Acesso em: 13 jul. 2012.

CORREIA, A.; SAMPAIO, P.; ALMEIDA, J.; PAIS, C. Study of Molecular Epidemiology of Candidiasis in Portugal by PCR Fingerprinting of *Candida* Clinical Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5899-5903, 2004.

COUTO, E. M. P.; CARLOS, D.; MACHADO, E. R. Candidíase em neonatos: uma revisão epidemiológica. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 197-213, 2011.

COX, G. M.; JEE, J. M.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infection and Immunity*, v. 68, n.2, p. 443-448, 2000.

CUGNO, C.; CESARO, S. Epidemiology, risk factors and therapy of candidemia in pediatric hematological patients. **Pediatric Reports**, v. 4, n. 9, p. 30-33, 2012.

DENDIS, M.; HORVÁTH, R.; MICHÁLEK, J.; RUZICKA, F.; GRUJALVA, M.; BARTOS, M.; BENEDIK, J. PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 12, p. 1191-1202, 2003.

DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; BRUEGGEMANN, A. B.; COFFMAN, S. L.; DOERN, G. V.; HERWALDT, L. A.; PFALLER, M. A. Epidemiology of Candidemia: 3-Year Results from the Emerging Infections and the Epidemiology of Iowa Organisms Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1298-1302, 2002.

D'ANTONIO, D.; ROMANO, F.; PONTIERI, E.; FIORITONI, G.; CARACCILO, C.; BIANCHINI, S.; OLIOSO, P.; STANISCIÀ, T.; SFERRA, R.; BOCCIA, S.; VETUSCHI, A.; FEDERICO, G.; GAUDIO, E.; CARRUBA, G. Catheter-Related Candidemia Caused by *Candida lipolytica* in a Patient Receiving Allogeneic Bone Marrow Transplantation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1381-1386, 2002.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURUL, L. F.; QUEROI, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two

ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 329-337, 1999.

FAHAMI, S. H.; KORDBACHEH, P.; MOAZENI, M.; MAHMOODI, M.; MIRHENDI, H. 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**, v. 12, n. 5, p. 539-547, 2010.

FAVEL, A.; MICHEL-NGUYEN, A.; DATRY, A.; CHALLIER, S.; LECLERC, F.; CHASTIN, C.; FALLAGUE, K.; REGLI, P. Susceptibility of clinical isolates of *Candida lusitanae* to five systemic antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 526-529, 2004.

FERNANDES, A. C. S.; SOUSA JÚNIOR, F. C.; OLIVEIRA, S. M.; CALICH, L.; MILAN, E. P. Prevalence of *Candida* Species in umbilical catheters implanted in newborns in Natal, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 104-107, 2007.

FIDEL JÚNIOR, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 80-96, 1999.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: incidence, frequency of different species, risk factors and antifungal susceptibility. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 23-28, 2008.

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

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, p. 12-16, 2000.

GHAHRI, M.; MIRHENDI, H.; FOOLADI, A. I.; BEYRAGHI, S. Species Identification of *Candida* Strains Isolated from Patients with Candidemia, Hospitalized in Tehran, by Enzymatic Digestion of ITS-rDNA. **Journal of Isfahan Medical School**, vol 29, n. 167, 2012.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GIRMENIA, C.; PIZZARELLI, G.; CRISTINI, F.; BARCHIESI, F.; SPREGHINI, E.; SCALISE, G.; MARTINO, P. *Candida guilliermondii* Fungemia in Patients with Hematologic Malignancies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2458-2464, 2006.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I. N.; SEVERO, L. C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; de ALMEIDA, L. P.; da MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Species Distribution and Antifungal Susceptibility Profile of *Candida* spp. Bloodstream Isolates from Latin

American Hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 401-405, 2003.

GOEL, N.; RANJAN, P. K.; AGGARWAL, R.; CHAUDHARY, U.; SANJEEV, N. Emergence of *Nonalbicans Candida* in neonatal septicemia and antifungal susceptibility: Experience from a tertiary care Center. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 1, p.53-55, 2009.

GOLDMAN, M.; POTTAGE JÚNIOR, J. C.; WEAVER, D. C. *Candida krusei* fungemia. Report of 4 cases and review of the literature. **Medicine (Baltimore)**, v. 72, n. 3, p. 143-150, 1993.

GOLDANI, L. Z.; MÁRIO, P. S. S. *Candida tropicalis* Fungemia in a Tertiary Care Hospital. **Journal of Infection**, v. 46, n. 3, p. 155-160, 2003.

GÓMEZ, J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E.; HERNÁNDEZ, A.; ESPINOSA, C.; RUIZ, J. Candidemias nosocomiales: nuevos retos de um problema emergente. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 23, n. 4, p. 158-168, 2010.

GONDIM, B. A.; BRITO, D. V. D.; BRITO, C. S.; DOLINGER, E. J. O. V.; ABDALLAH, V. O. S.; FILHO, P. P. G. Fatores de risco para colonização e sepse por *Candida albicans* e *Candida* não *albicans* em neonatos críticos. **Arquivo Ciência Saúde**, v. 16, n. 3, p. 105-109, 2009.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 12, n. 3, p. 454–500, 1999.

GUILLAMÓN, J. M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology**, v. 169, p. 387-392, 1998.

GUINET, R.; CHANAS, J.; GOULLIER, A.; BONNEFOY, G.; AMBROISE-THOMAS, P. Fatal Septicemia Due to Amphotericin B-Resistant *Candida lusitanae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 443-444, 1983.

HAZEN, K. C. New and Emerging Yeast Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 462-478, 1995.

HERNANDEZ, S.; GONZALEZ, G. M.; MCCARTHY, D. I.; COLOMBO, A. L.; NAJVAR, L. K.; BOCANEGERA, R.; GRAYBILL, J. R. Alternatives to amphotericin B for *Candida rugosa* infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 477-480, 2004.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, É.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 394-398, 2008.

HORN, D. L. ; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E. J.; FISHMAN, J. A.; TEINBACH, W. J.; OLYAEI, A. J.; MARR, K. A.; PFALLER, M. A.; CHANG, C.; WEBSTER, K. M. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p. 1695-1703, 2009.

HUANG, Y.C.; SU, L. H.; WU, T. L.; LIN, T. Y. Genotyping analysis of colonizing candidal isolates from very-low-birthweight infants in a neonatal intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 58, n. 3, p. 200-203, 2004.

IROBI, J.; SCHOOF, A.; GOOSSENS, H. Genetic identification of *Candida* species in HIV-positive patients using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of its DNA. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, p. 401-406, 1999.

KHAN, Z. U.; AL-SWEIH, N. A.; AHMAD, S.; AL-KAZEMI, N.; KHAN, S.; JOSEPH, L.; CHANDY, R. Outbreak of Fungemia among Neonates Caused by *Candida haemulonii* Resistant to Amphotericin B, Itraconazole, and Fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 2025-2027, 2007.

KIM, M.; SHIN, J. H.; SUNG, H.; LEE, K.; KIM, E.; RYOO, N.; LEE, J.; JUNG, S.; PARK, K. H.; KEE, S. J.; KIM, S. H.; SHIN, M. G.; SUH, S. P.; RYANG, D. W. *Candida haemulonii* and Closely Related Species at 5 University Hospitals in Korea: Identification, Antifungal Susceptibility and Clinical Features. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 57-61, 2009.

KIM, S.; KO, K. S.; MOON, S. Y.; LEE, M. S.; LEE, M. Y.; SON, J. S. Catheter-related Candidemia Caused by *Candida haemulonii* in a Patient in Long-term Hospital Care. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, p. 297-300, 2011.

KONEMAN, E.; WOODS, G.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; ALLEN, S.; WINN JR, W. C.; JANDA, W. **Diagnóstico Microbiológico**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KORABEČNÁ, M.; LIŠKA, V.; FAJFRÍKB, K. Primers ITS1, ITS2 and ITS4 Detect the Intraspecies Variability in the Internal Transcribed Spacers and 5.8S rRNA Gene Region in Clinical Isolates of Fungi. **Folia Microbiologica**, v. 48, n. 2, p. 233-238, 2003.

KRCMERY, V.; BARNESZ, A. J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, p. 243-260, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Leveduras de Interesse Médico. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de micologia médica**, 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. cap. 6.

LARONE, D. H. Yeast and yeast like organisms. In: \_\_\_\_\_. **Medical important fungi: a guide to identification**, 4 ed. Washington, ASM Press Washington, 2002. cap. 4.

LEHMANN, P. F.; LIN, D.; LASKER, B. A. Genotypic Identification and Characterization of Species and Strains within the Genus *Candida* by Using Random Amplified Polymorphic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3249-3254, 1992.

LEHMANN, P. F.; WU, L.; PRUITT, I. W. R.; MEYER, S. A.; AHEARN, D. G. No. 7. Unrelatedness of Groups of Yeasts within the *Candida haemulonii* Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 1683-1687, 1993.

LEROY, O.; GANGNEUX, J. P.; MONTRAVERS, P.; MIRA, J. P.; GOUIN, F.; SOLLET, J. P.; CARLET, J.; REYNES, J.; ROSENHEIM, M.; REGNIER, B.; LORTHOLARY, O. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 5, p. 1612-8, 2009.

LINARES, C. E. B.; LORETO, E. S.; SILVEIRA, C. P.; POZZATTI, P.; SCHEID, L. A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 4, p. 203-206, 2007.

LIU, D.; COLOE, S.; BAIRS, R.; PEDERSON, J. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 471-475, 2000.

LORETO, E. S.; SCHEID, L. A.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. *Candida dubliniensis*: Epidemiology and Phenotypic Methods for Identification. **Mycopathologia**, v. 169, p. 431-443, 2010.

LÖÖKE, M.; KRISTJUHAN, K.; KRISTJUHAN, A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. **BioTechniques**, v. 50, p. 325-328, 2011.

LUPATINI M.; MELLO, A. H.; ANTONIOLLI, Z. I. Caracterização do DNA ribossômico do isolado de scleroderma UFSMSc1 de *Eucalyptus grandis* W. hill ex-aiden. **Revista Brasileira Ci Solo**, vol. 32, p. 2677-2682, 2008.

LUPETTI, A.; TAVANTI, A.; DAVINI, P.; GHELARDI, E.; CORSINI, V.; MERUSI, I.; BOLDRINI, A.; CAMPA, M.; SENESI, S. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2363-2369, 2002.

MACPHAIL, G. L.; TAYLOR, G. D.; BUCHANAN-CHELL, M.; ROSS, C.; WILSON, S.; KUREISHI, A. Epidemiology, treatment and outcome of candidemia: a five-year review at three Canadian hospitals. **Mycoses**, v. 45, p. 141-145, 2002.

MALANI, A.; HMOUD, J.; CHIU, L.; CARVER, P. L.; BIELACZYC, A.; KAUFFMAN, C. A. *Candida glabrata* Fungemia: Experience in a Tertiary Care Center. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 975-981, 2005.

MALUCHE, M. E.; DOS SANTOS J. I. *Candida* sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 65-67, 2008.

MARIANO, P. DE L. S.; MILAN, E. P.; da MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. *Candida dubliniensis* Identification in Brazilian Yeast Stock Collection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 533-538, 2003.

MAROL, S.; YUCESOY, M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. **Mycoses**, v. 51, p. 40-49, 2007.

MEDRANO, D. J. A.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; RABENHORST, S. H. B.; SIDRIM, J. J. C. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 17-20, 2006.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; RICCI, T. A.; HANNA, S. A.; SALINA, M. A. Fatores envolvidos na patogênese fúngica. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 18, n. 2, p. 207-299, 1997.

MERZ, W. G. *Candida lusitanae*: Frequency of Recovery, Colonization, Infection, and Amphotericin B Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 1194-1195, 1984.

MINARI, A.; HACHEM, R.; RAAD, I. *Candida lusitanae*: A Cause of Breakthrough Fungemia in Cancer Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 186-190, 2001.

MIRHENDI, H.; KORDBACHEH, P.; KAZEMI, B.; SAMIEI, S.; PEZESHKI, M.; KHORRAMIZADEH, M. R. A PCR-RFLP Method to Identification of the Important Opportunistic Fungi: *Candida* Species, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium solani*. **Iranian Journal of Public Health**, v. 30, n. 3-4, p. 103-106, 2001.

MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; ZOMORODIAN, K.; MAEDA, N.; OHSHIMA, T.; YAMAGUCHI, H. Differentiation of *Candida dubliniensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 58, p. 235-237, 2005.

MIRHENDI, H., MAKIMURA, K.; KHORRAMIZADEH, M.; YAMAGUCHI, H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. **Journal Medicine Mycology**, v. 47, n. 3, p. 225-229, 2006.

MOHAMMADI, R.; MIRHENDI, H.; YADEGARI, M. H.; SHADZI, S.; JALALIZAND, N. Identification and Frequency of *Candida* Species in Patients with Different Forms of Candidiasis in Isfahan, Using PCR-RFLP Method. **Journal of Isfahan Medical School**, v. 29, n. 133, 2011.

MOHAMMADI, R.; NAZERI, M.; MESDAGHINIA, E.; MIRHENDI, S. H. Identification of *Candida* Species among Patients with Vulvovaginal Candidiasis in Kashan by PCR-RFLP Method. **Journal of Isfahan Medical School**, v. 29, n. 165, 2012.

MORACE, G.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; CASCIO, G. L.; FADDA, G. Identification of Various Medically Important *Candida* Species in Clinical Specimens

by PCR-Restriction Enzyme Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 667-672, 1997.

MORGAN, M. A.; WILKOWSKE, C. J.; ROBERTS, G. D. *Candida pseudotropicalis* Fungemia and Invasive Disease in an Immunocompromised Patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 1006-1007, 1984.

MOUSAVI, S. A. A.; KHALES, E.; SHAHIDI, B.; AGHIGHI, S.; SHARIFI, F.; ARAM, F. Rapid Molecular Diagnosis for *Candida* species Using PCR-RFLP. **Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 583-587, 2007.

MOUSAVI, S. A. A.; SALARI, S.; REZAIE, S.; NEJAD, N. S.; HADIZADEH, S.; KAMYABI, H.; JUNDISHAPUR, H. A. Identification of *Candida* Species Isolated From Oral Colonization in Iranian HIV-Positive Patients, by PCR-RFLP Method. **Jundishapur Journal Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 336-340, 2012.

MOTTA, A. L.; ALMEIDA, G. M. D.; JÚNIOR, J. N. A.; BURATTINI, M. N.; ROSSI, F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 441-448, 2010.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NAWROT, U.; CZMAJDUCH, N.; GOŚCINIAK, G. Identification of *Candida* using analysis of restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA. **Mikologia Lekarska**, v. 18, n. 4, p. 192-196, 2011.

NEPPELENBROEK, K. H.; CAMPANHA, N. H.; SPOLIDORIO, D. M. P.; SPOLIDORIO, L. C.; SEO, R. S.; PAVARINA, A. C. Molecular fingerprinting methods for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. **Oral Diseases**, v. 12, p. 242-253, 2006.

NGUYEN, K.; ZMETER, G.; CLARIS, O.; KASSAI, B. Epidemiology of invasive *Candida* infection in a neonatal intensive care unit in France. **Acta Paediatrica**, v. 101, p. 137-139, 2012.

NUCCI, M.; SILVEIRA M. I.; SPECTOR, N.; SILVEIRA, F.; VELASCO, E.; MARTINS, C. A.; DEROSI, A.; COLOMBO, A. L.; PULCHERI, W. Fungemia in cancer patients in Brazil: Predominance of non-*albicans* species. **Mycopathologia**, v. 141, p. 65-68, 1998.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 77-82, 2007.

OLIVEIRA, R. G.; SOBRINHO, N. U.; SOUZA, M. V. B.; YAMAMOTO, L.; OKAY, T. S.; DEL NEGRO, G. M. B. Comparison of four random amplified polymorphic DNA

(RAPD) systems to assess genetic relatedness and fluconazole susceptibility of *Candida tropicalis* pediatric isolates. **Pediatrics**, v. 30, n. 2, p. 88-94, 2008.

PANACKAL, A. A.; GRIBSKOV, J. L.; STAAB, J. F.; KIRBY, K. A.; RINALDI, M.; MARR, K. A. Clinical Significance of Azole Antifungal Drug Cross-Resistance in *Candida glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1740-1743, 2006.

PAPPAGIANIS, D.; COLLINS, M. S.; HECTOR, R.; REMINGTON, J. Development of Resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae* Infecting a Human. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 16, n. 2., p. 123-126, 1979.

PEMAN, J.; CANTO´N, E.; LINARES-SICILIA, M. J.; ROSELLO, E. M.; BORRELL, N.; RUIZ-PE´REZ-DE-PIPAON, M. T.; GUINEA, J.; GARCÍA, J.; PORRAS, A.; GARCÍA-TAPIA, A. M.; PE´REZ-DEL-MOLINO, L.; SUA´REZ, A.; ALCOBA, J.; GARCÍA-GARCÍA, I. Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Bloodstream Fungal Isolates in Pediatric Patients: a Spanish Multicenter Prospective Survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4158-4163, 2011.

PFALLER, M. A. Epidemiology of candidiasis. **Journal of Hospital Infection**, v. 30, p. 329-338, 1995.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; SADER, H. S.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A. International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and Antifungal Susceptibilities of Isolates Collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1886-1889, 1998.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; GROUP, THE SENTRY PARTICIPANT. International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and In Vitro Susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3254-3259, 2001.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 10, p. 11-23, 2004a.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4419-4431, 2004b.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; COLOMBO, A. L.; KIBBLER, C.; NG, K. P.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A. *Candida rugosa*, an Emerging Fungal Pathogen with Resistance to Azoles: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3578-3582, 2006.



PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PINTO, P. M.; RESENDE, M. A.; KOGA-ITO, C. Y.; TENDLER, M. Genetic Variability Analysis among Clinical *Candida* spp. Isolates Using Random Amplified Polymorphic DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 147-152, 2004.

PORTE, L.; LEÓN, P.; GÁRATE, C.; GUZMÁN, A. M.; LABARCA, J.; GARCÍA, P. Susceptibilidad a azoles y anfotericina B de aislados de *Candida* spp. Experiencia de una red de salud universitaria, entre 2004 y 2010. **Revista Chilena de Infectología**, v. 29, n. 2, p. 149-155, 2012.

PRINSLOO, B.; WELDHAGEN, G. F.; BLAINE, R. W. *Candida famata* central nervous system infection. **South African Medical Journal**, v. 93, n. 8, p. 601-602, 2003.

RAMAGE, G.; WALLE, K. V.; WICKES, B. L.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2475-2479, 2001.

RAMOS, M.; PISA, D.; MOLINA, S.; RÁBANO, A.; JUARRANZ, A.; CARRASCO, L. Fungal Infection in Patients with Multiple Sclerosis. **The Open Mycology Journal**, v. 2, p. 22-28, 2008.

RANI, R.; MOHAPATRA, N. P.; MEHTA, G.; RANDHAWA, V. S. Changing trends of *Candida* species in neonatal septicaemia in a tertiary North Indian hospital. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 42-44, 2002.

RAO, N. A.; NERENBERG, A. V.; FORSTER, D. J. *Torulopsis candida* (*Candida famata*) Endophthalmitis Simulating Propionibacterium acnes Syndrome. **Archives of Ophthalmology**, v. 109, p. 1718-1721, 1991.

REINHARDT, J. F.; RUANE, P. J.; WALKER, L. J.; GEORGE, W. L. Intravenous Catheter-Associated Fungemia Due to *Candida rugosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 1056-1057, 1985.

RESENDE, J. C. P.; FRANCO, G. R.; ROSA, C. A.; HAHN, R. C.; HAMDAN, J. S. Phenotypic and genotypic identification of *Candida* spp. isolated from hospitalized patients. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 21, p. 24-28, 2004.

REUTER, C. W.; MICHAEL, M.; MORGAN, A.; BANGE, F.; GUNZER, F.; EDER, F.; HERTENSTEIN, B.; GANSER, A. *Candida kefyr* as an Emerging Pathogen Causing Nosocomial Bloodstream Infections in Neutropenic Leukemia Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 1365-1366, 2005.

REYNOLDS R., BRAUDE A. The filament inducing property of blood for *Candida albicans*: its nature and significance. **Clinical Research Definitions and Procedures**, v. 4, n. 40, p. 417-420, 1956.

RIBEIRO, E. L.; GUIMARÃES, R. I.; INÁCIO, M. C. C.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S. M. DA S.; NAVES, P. L. F. Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais. **NewsLab**, v. 64, p. 106-128, 2004.

ROCHA, B. A.; DEL NEGRO, G. M. B.; YAMAMOTO, L.; DE SOUZA, M. V. B.; PRECIOSO, A. R.; OKAY, T. S. Identification and differentiation of *Candida* species from pediatric patients by random amplified polymorphic DNA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 1-5, 2008.

REISSA, E.; LASKER, B. A.; IQBAL, N. J.; JAMES, M. J.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. Molecular epidemiology of *Candida parapsilosis* sepsis from outbreak investigations in neonatal intensive care units. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 2, p. 103-109, 2008.

RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, D.; ALMIRANTE, B.; PARK, B. J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A. M.; SANCHEZ, F.; GENE, A.; XERCAVINS, M.; FONTANALS, D.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; WARNOCK, D. W.; PAHISSA, A. Candidemia in neonatal intensive care units: Barcelona, Spain. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 25, n. 3, p. 224-229, 2006.

ROILIDES, E.; FARMAKI, E.; EVDORIDOU, J.; FRANCESCONI, A.; KASAI, M.; FILIOTI, J.; TSIVITANIDOU, M.; SOFIANOU, D.; KREMENOPOULOS, G.; WALSH, T. J. *Candida tropicalis* in a Neonatal Intensive Care Unit: Epidemiologic and Molecular Analysis of an Outbreak of Infection with an Uncommon Neonatal Pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2 p. 735-741, 2003.

ROILIDES, E. Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 10, p. 745-750, 2004.

ROILIDES, E. Invasive candidiasis in neonates and children. **Early Human Development**, v. 87, p. 75-76, 2011.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 17, p. 73-81, 2000.

SANSINFORIANO, M. E.; RABASCO, A.; MARTÍNEZ-TRANCÓN, M.; PAREJO, J. C.; DE MENDOZA, M. H.; PADILLA, J. Á. Optimización de las condiciones RAPD-PCR en *Candida* spp. Y *Cryptococcus* spp. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, p. 65-69, 2001.

SANTOS, M. S.; SOUZA, E. S.; JUNIOR, R. M. S.; TALHARI, S.; SOUZA, J. V. B. Identification of fungemia agents using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 712-716, 2010.

SHIM, G. H.; KIM, S. D.; KIM, H. S.; KIM, E. S.; LEE, H.; LEE, J.; CHOI, C. W.; KIM, E.; CHOI, E. H.; KIM, B.; LEE, H. J.; CHOI, J. H. Trends in Epidemiology of Neonatal Sepsis in a Tertiary Center in Korea: A 26-Year Longitudinal Analysis, 1980-2005. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, p. 284-289, 2011.

SHIN, J. H.; KOOK, H.; SHIN, D.H.; HWANG, T.J.; KIM, M.; SUH, S.P.; RYANG, D. W. Nosocomial cluster of *Candida lipolytica* fungemia in pediatric patients. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 344-349, 2000.

SHOKOHI, T.; SOTEH, M. B. H.; POURI, Z. S.; HEDAYATI, M. T.; MAYAHI, S. Identification of *Candida* species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 147-151, 2010.

SIMONA, E. S.; DIANA, P.; ROBERTINA, I.; IONELA, A.; ILEANA, S.; TATIANA. Molecular identification of some yeast strains involved in oral candidosis. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 14, n. 1, p. 4180-4186, 2009.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SMITH, P. B.; STEINBACH, W. J.; BENJAMIN, D. K. JR. Invasive *Candida* infections in the neonate. **Drug Resistance Updates**, v. 8, p. 147-162, 2005.

SOLL, D. R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 332-370, 2000.

STEINBACH, W. J. Epidemiology of invasive fungal infections in neonates and children. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 9, p. 1321-1327, 2010.

SUGAR, A. M.; STEVENS, D. A. *Candida rugosa* in Immunocompromised Infection: Case Reports, Drug Susceptibility, and Review of the Literature. **Cancer**, v. 56, p. 318-320, 1985.

ST-GERMAIN, G.; LAVERDIERE, M. *Torulopsis candida*, a New Opportunistic Pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 884-885, 1986.

SULLIVAN, D. J.; HENMANS, M. C. G.; MORAN, I.; O'NEILL, L. C.; BENNETT, D. E.; SHANLEY, D. B.; COLEMAN, D. C. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 44, p. 399-408, 1996.

SPILIOPOULOU, A.; DIMITRIOU, G.; JELASTOPULU, E.; GIANNAKOPOULOS, I.; ANASTASSIOU, A. D.; CHRISTOFIDOU, M. Neonatal Intensive Care Unit Candidemia: Epidemiology, Risk Factors, Outcome, and Critical Review of Published Case Series. **Mycopathologia**, v. 173, p. 219-228, 2012.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284-292, 2005.

TAVANTI, A.; HENSGENS, L. A. M.; MOGAVERO, S.; MAJOROS, L.; SENESI, S.; CAMPA, M. Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis* sensu

strictu strains isolated from different geographic regions and body sites. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 203, 2010,

TAY, S. T.; NA, S. L.; CHONG, J. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 185-191, 2009.

THANOS, M.; NIAN, G. S.; MEYER, W.; SCHWEYNOCH, C.; GRAßER, Y.; MITCHELL, T. G.; PRESBER, W.; TIETZ, H.-J. Rapid Identification of *Candida* Species by DNA Fingerprinting with PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 615-621, 1996.

TIRODKER, U. H.; NATARO, J. P.; SMITH, S.; LASCASAS, L.; FAIRCHILD, K. D. Detection of Fungemia by Polymerase Chain Reaction in Critically Ill Neonates and Children. **Journal of Perinatology**, v. 23, p. 117-122, 2003.

TOBUDIC, S.; KRATZER, C.; LASSNIGG, A.; GRANINGER, W.; PRESTERL, E. In vitro activity of antifungal combinations against *Candida albicans* Biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 271-274, 2010.

TORTORANO, A. M.; PAMAN, J.; BERNHARD, H.; KLINGSPOR, L.; KIBBLER, C. C.; FAURE, O.; BIRAGHI, E.; CANTON, E.; ZIMMERMANN, K.; SEATON, S.; GRILLOT, R. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 317-322, 2004.

TRICK, W. E.; FRIDKIN, S. K.; EDWARDS, J. R.; HAJJEH, R. A.; GAYNES, R. P. Secular trend of hospital-acquired candidaemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 627-630, 2002.

TROST, A.; GRAFA, B.; EUCKERB, J.; SEZERB, O.; POSSINGERB, K.; GOßBELA, U. B.; ADAMA, T. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 201-211, 2004.

VALLE, G. C.; RENDE J. C.; OKURA, M. H. Estudo da Incidência do Gênero *Candida* em Hospital Público Universitário. **NewsLab**, v. 101 p. 202-222, 2010.

VALÉRIO, H. M.; WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B.; RESENDE, M. A. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 174-178, 2006.

WALSH, T. J.; SALKIN, I. F.; DIXON, D. M.; HURD, N. J. Clinical, Microbiological, and Experimental Animal Studies of *Candida lipolytica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 927-931, 1989.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WEICHERT, S.; REINSHAGEN, K.; ZAHN, K.; GEGINAT, G.; DIETZ, A.; KILIAN, A. K.; SCHROTEN, H.; TENENBAUM, T. Candidiasis caused by *Candida kefyr* in a neonate: Case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 61, p. 1-4, 2012.

WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, D. W.; WILSON, M. J.; LEWIS, M. A. O.; POTTS, A. J. C. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2476 - 2479, 1995.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical infectious diseases**, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

XAVIER, P. C. N.; CHANG, M. R.; NUNES, M. O.; PALHARES, D. B.; SILVA, R. A.; BONFIM, G. F.; JÚNIOR, N. F. A. Candidemia neonatal, em hospital público do Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 459-463, 2008.

YANG, YUN-LIANG. Virulence factors of *Candida* species. **Journal de Microbiol Immunol Infect**, v. 36, p. 223-228, 2003.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; FRAMIL, V. M. de S. **Compêndio de Micologia Médica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

ZICKER, M.; COLOMBO, A. L.; FERRAZ-NETO, B.; CAMARGO, L. F. A. Epidemiology of fungal infections in liver transplant recipients: a six-year study of a large Brazilian liver transplantation centre. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 339-345, 2011.