



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E SITUAÇÕES
DE SAÚDE NA AMAZÔNIA**

CLARICE VIRGINIA SANTOS GOIABEIRA

**FATORES DE VIRULÊNCIA E SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE
ESPÉCIES DE LEVEDURAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS DA COMUNIDADE
RIBEIRINHA LAGO DO LIMÃO - IRANDUBA-AM**

Manaus - Am

2022

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E SITUAÇÕES DE
SAÚDE NA AMAZÔNIA

CLARICE VIRGINIA SANTOS GOIABEIRA

Fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos de espécies de leveduras
clínicas e ambientais da comunidade ribeirinha Lago do Limão - Iranduba-AM

Dissertação de Mestrado submetida
ao Programa de Pós-Graduação em
Condições de Vida e Situações de
Saúde na Amazônia, como requisito
obrigatório para a obtenção do título
de Mestre em Saúde Pública.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

Manaus – Am

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

G615f

Goiabeira, Clarice Virginia Santos

Fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos de espécies de leveduras clínicas e ambientais da comunidade ribeirinha Lago do Limão – Iranduba-AM. / Clarice Virginia Santos Goiabeira. - Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2022.

52 f.

Dissertação (Mestrado em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2022.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes.

1. Candida 2. Leveduras 3. Antifúngicos I. Título

CDU 616.992(811.3) (043.3)

CDD 616.969

22. ed.

Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos – Bibliotecário CRB-11 Nº 287

CLARICE VIRGINIA SANTOS GOIABEIRA

Fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos de espécies de leveduras clínicas e ambientais da comunidade ribeirinha Lago do Limão - Iranduba-AM

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública..

Aprovada em: 15/03/2022.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes
ILMD/FIOCRUZ

Prof^a. Dra. – Kátia Santana Cruz
Fundação de Medicina Tropical - FMT

Prof^o. Dr. – Ani Beatriz Jackisch Matsuura
ILMD/FIOCRUZ

Dedico este trabalho à minha mãe, que sempre me apoiou durante todo este caminho e em tudo que faço. Sem a senhora, eu nada faria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, por sempre iluminarem meu caminho e permitirem que eu concluísse este trabalho;

À minha mãe, pai e irmã, por todo o incentivo e amor. A presença de vocês nesta etapa da minha vida foi essencial;

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane pela maravilhosa oportunidade de realização do curso de Mestrado em Saúde Pública, bem como a disponibilidade dos laboratórios Geral e de Micologia, para a realização dos experimentos deste trabalho;

À FAPEAM, pela bolsa concedida durante este curso de Mestrado;

Ao Instituto de Pesquisas da Amazônia – INPA, em especial à Dra. Jacqueline e MSc. Alyne, pela enorme contribuição na etapa de sequenciamento das espécies de levedura citadas neste trabalho. A parceria com vocês foi fundamental;

À professora Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes pela orientação, gentileza, compreensão e apoio durante todo este período delicado, devido à pandemia. Agradeço muito o companheirismo, que muito me ajudou para que eu pudesse reconstruir este trabalho do zero;

À professora Dra. Ani Beatriz Jackish Matsuura, pelos conselhos e por conceder gentilmente as amostras ambientais utilizadas neste trabalho;

À Secretaria e Coordenação do Programa de Pós-Graduação, por todo o auxílio e serviços realizados durante o curso;

Ao bibliotecário Ycaro Verçosa dos Santos, pela grande ajuda na elaboração da ficha catalográfica;

À professora Dra. Maria Ivone Lopes, pela orientação e gentileza durante o período de estágio à docência;

Ao estatístico Antônio Balieiro, pela enorme ajuda na realização dos testes estatísticos;

À equipe do laboratório DMAIS: Carolina Maia, pela *enorme* ajuda nos experimentos. Muito obrigada por ter me ensinado tanto;

À Josy Caldas, por ter me ensinado a maior parte do que sei sobre fungos, desde que cheguei à Fiocruz;

À Marla Alves, Thaís Moreira, Maria Júlia Brandão, Dandara Maria, Cláudia Nayara, por todo o apoio, incentivo e momentos de descontração compartilhados durante esse curso;

Aos meus amigos da vida: Vivian Barbosa, Matheus Queiroz, Camilla Moraes e Tainah Valois. Obrigada por tanto.

“A vida não é uma corrida de cem metros contra seus amigos, mas uma maratona vitalícia contra si mesmo.”

Haemin Sunim

RESUMO

As leveduras do gênero *Candida* são fungos oportunistas que podem ser encontrados como comensais em diversos sítios do corpo humano e no ambiente. Quando há o desequilíbrio da microbiota humana, essas leveduras tornam-se patógenos e podem desenvolver candidíase, uma infecção fúngica que afeta tanto indivíduos saudáveis quanto imunocomprometidos. O presente estudo teve como objetivo verificar e comparar os fatores de virulência de 48 leveduras isoladas do ambiente aquático e da mucosa oral de idosos da comunidade rural Lago do Limão, Iranduba-Am, bem como avaliar sua susceptibilidade aos antifúngicos itraconazol, anfotericina B, cetoconazol e fluconazol. Foram realizados testes de produção de protease, hemolisina, fosfolipase e urease, com os meios de cultura Ágar Proteinase, Ágar Sabouraud acrescido de sangue de carneiro, Ágar Sabouraud suplementado com gema de ovo e Ágar Ureia de Christensen, respectivamente. Para o teste de sensibilidade a antifúngicos, foi utilizado o método Etest e a análise estatística foi realizada com os testes Exato de Fisher e Qui-quadrado. Observou-se a prevalência do gênero *Candida*, com destaque às espécies *não-albicans*. Foram identificadas 45 leveduras: *C. albicans* (6,6%), *C. glabrata* (33,3%), *C. parapsilosis* (24,4%), *C. tropicalis* (8,8%), *Meyerozyma guilliermondii* (13,3%), *Meyerozyma caribbica* (4,4%), *C. metapsilosis* (2,2%), *Saccharomyces cerevisiae* (2,2%), *Kodamaea ohmeri* (2,2%) e *Lodderomyces elongisporus* (2,2%). 68,7% das leveduras tiveram atividade hemolítica positiva, 47,9% produziram proteases, 16,6% produziram fosfolipases e todas foram urease negativas. Não houve diferença estatística significativa entre a virulência de leveduras de origem clínica e ambiental. Todas as leveduras foram sensíveis ao antifúngico anfotericina B; 37,5% foram sensíveis ou sensíveis dose dependentes (SDD) ao cetoconazol, 35,4% sensíveis ou SDD a fluconazol e 29,1% sensíveis ou SDD a itraconazol, com concentrações inibitórias mínimas (MICs) de 0,094 ~ 1 µg/ml; 0,094 ~ 16 µg/ml; 1,5 ~ 128 µg/ml e 0,125 ~ 8 µg/ml, respectivamente. Dessa forma, com o conhecimento dos processos infecciosos e de como as enzimas atuam, associado à constante busca pelo melhor medicamento, há contribuição para a criação de novas estratégias de prevenção e tratamento para candidíase, melhorando assim a qualidade de vida das populações mais vulneráveis na região - os ribeirinhos.

Palavras-chave: leveduras, *Candida*, virulência

ABSTRACT

Candida yeasts are opportunistic fungi that can be found as commensals in several places in the human body and in the environment. When human microbiota imbalance occurs, these yeasts become pathogens and can develop candidiasis, a fungal infection that affects both healthy and immunocompromised individuals. The present study aimed to verify and compare the virulence factors of 48 yeasts isolated from the aquatic environment and from the oral mucosa of elderly people from the rural community Lago do Limão, Iranduba-Am, as well as to evaluate their susceptibility to the antifungals itraconazole, amphotericin B, ketoconazole and fluconazole. Protease, hemolysin, phospholipase and urease production tests were carried out with the culture media Agar Proteinase, Sabouraud Agar plus sheep's blood, Sabouraud Agar supplemented with egg yolk and Christensen's Urea Agar, respectively. For the antifungal sensitivity test, the Etest method was used and the statistical analysis was performed using Fisher's Exact and Chi-square tests. A higher prevalence of the genus *Candida* was obtained, with emphasis on *non-albicans* species. Forty-five yeasts were identified: *C. albicans* (6.6%), *C. glabrata* (33.3%), *C. parapsilosis* (24.4%), *C. tropicalis* (8.8%), *M. guilliermondii* (13.3%), *M. caribbica* (4.4%), *C. metapsilosis* (2.2%), *S. cerevisiae* (2.2%), *K. ohmeri* (2.2%) and *L. elongisporus* (2.2%). 68.7% of the yeasts had positive hemolytic activity, 47.9% produced protease, 16.6% produced phospholipase and all yeasts were urease negative. There was no statistically significant difference between the virulence of yeasts of clinical and environmental origin. All yeasts were sensitive to the antifungal amphotericin B; 37.5% were sensitive or sensitive dose-dependent (SDD) to ketoconazole, 35.4% were sensitive or SDD to fluconazole, and 29.1% were sensitive or SDD to itraconazole, with minimum inhibitory concentrations (MICs) of 0.094 ~ 1 µg/ml ; 0.094 ~ 16 µg/ml; 1.5 ~ 128 µg/ml and 0.125 ~ 8 µg/ml, respectively. Thus, with the knowledge of infectious processes and how enzymes act, associated with the constant search for the best drug, there is a contribution to the creation of new prevention and treatment strategies for candidiasis, thus improving the quality of life of the most vulnerable populations in the region - the riverside people.

Keywords: yeasts, *Candida*, virulence

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM – Amazonas

ATCC - American Type Culture Collection (Coleção de Cultura-Tipo Americana)

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

C. albicans – *Candida albicans*

C. glabrata – *Candida glabrata*

C. guilliermondii – *Candida guilliermondii*

C. parapsilosis – *Candida parapsilosis*

C. tropicalis – *Candida tropicalis*

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais)

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

FAPEAM - Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas

ILMD - Instituto Leônidas e Maria Deane

ITS - Internal Transcribed Space (Espaço Interno Transcrito)
min – minutos

K. ohmeri – *Kodamaea ohmeri*

L. elongisporus – *Lodderomyces elongisporus*

M. caribbica – *Meyerozyma caribbica*

M. guilliermondii – *Meyerozyma guilliermondii*

mL – mililitros

pb - par de base (nucleotídeos)

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

pH - potencial Hidrogeniônico

primer - iniciador (oligonucleotídeo)

RNA – Ácido Ribonucleico

rpm – rotação por minuto

RPMI - Instituto Roswell Park Memorial (meio de cultura)

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

µg - microgramas

µl - microlitros

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Produção enzimática por espécie e origem. Valores da Zona de Precipitação (Pz) para as enzimas fosfolipase, hemolisina e protease.....	33
Tabela 2 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima (MIC) em µg/mL, por espécie.....	38
Quadro 1 – Resultados dos testes enzimáticos com leveduras clínicas e ambientais.....	35
Quadro 2 – Resultados da Concentração Inibitória Mínima (MIC) por grupo – leveduras clínicas e ambientais.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Crescimento de leveduras em meio Chromágar Candida.....	30
Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose. Amplificação das regiões ITS1 e ITS4.....	32
Figura 3 - Testes enzimáticos positivos.....	37
Figura 4 - Leitura da Concentração Inibitória Mínima (MIC) pelo método Etest.....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. <i>Leveduras</i>	17
2.2. <i>Leveduras de amostras clínicas: o gênero Candida</i>	17
2.3. <i>Leveduras ambientais</i>	19
2.4. <i>Fatores de virulência de Candida spp.</i>	21
2.5. <i>Antifúngicos utilizados no tratamento de Candida</i>	22
2.6. <i>Biologia Molecular</i>	24
2.7. <i>Importância para a Saúde Pública</i>	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 <i>Objetivo geral</i>	26
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 <i>Delineamento do Estudo</i>	26
4.2 <i>Aspectos Éticos</i>	26
4.3 <i>Procedimentos Metodológicos</i>	27
4.3.1. <i>Cultivo das Amostras</i>	27
4.3.2. <i>Identificação com Chromagar</i>	27
4.4. <i>Fatores de Virulência</i>	28
4.5. <i>Perfil de Sensibilidade a Antifúngicos</i>	29
4.6. <i>Identificação Molecular</i>	30
4.7. <i>Análise Estatística</i>	31
5. FINANCIAMENTO	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO	43
8. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Leveduras são fungos unicelulares comensais e oportunistas, com a capacidade de se estabelecerem em diversos sítios do corpo humano, sob condições ambientais diferentes. Normalmente, estão presentes como comensais desde o nascimento, encontradas na microbiota da pele, trato gastrointestinal e genitourinário na qual a infecção ocorre quando há o desequilíbrio desta microbiota. A espécie *C. albicans* possui maior interesse clínico, porém estudos demonstraram um aumento de infecções por outras espécies (AMORIM, 2014; ANDREOLA *et al.*, 2016; LEWIS; WILLIAMS, 2017; SILVA *et al.*, 2019).

Apesar de viver grande parte de seu desenvolvimento como comensais, as leveduras do gênero *Candida* possuem grande versatilidade, com a capacidade de transformação de comensal a potencial patógeno. Há diversos processos fisiológicos envolvidos em sua patogenicidade, dentre estes a capacidade de adesão, infecção, produção de enzimas hidrolíticas como fosfolipases e proteinases, toxinas, hemolisinas e produção de biofilmes, a qual confere à levedura maior defesa contra células do sistema imunológico do hospedeiro e também a medicamentos antifúngicos (CIUREA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2019; TAMURA *et al.*, 2007).

Além disso, há a presença de fatores predisponentes que auxiliam o desenvolvimento de candidíase, tais como o sistema imunológico debilitado (indivíduos realizando quimioterapia, ou que tenham passado por algum transplante de órgãos, entre outros), presença de diabetes, pessoas que tenham feito o uso de muitos antibióticos e a população idosa, devido a todos os componentes biofisiológicos que envolvem o processo de envelhecimento (ALENCAR, 2017; SILVA *et al.*, 2019).

Além dos seres humanos, o meio ambiente também abriga uma grande variedade de microrganismos, inclusive leveduras. Quando encontradas no ar, ambiente terrestre ou aquático, esses fungos recebem a classificação de ambientais. Estes também podem ser considerados um risco aos seres humanos, visto que estudos demonstraram associação entre leveduras encontradas em água doce e humanos (NAGAHAMA, 2006), presença de patógenos oportunistas como *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*

e *Candida guilliermondii*, também encontradas em água doce (MEDEIROS *et al.*, 2012) e frequente presença de resistência antifúngica em espécies de *Candida* isoladas de ambientes aquáticos, o que representa risco à saúde pública (MEDEIROS *et al.*, 2008).

O tratamento para as infecções fúngicas, inclusive as causadas por leveduras do gênero *Candida*, tem representado um grande desafio devido ao surgimento de resistência a antifúngicos, situação já reconhecida como um importante problema clínico (PFALLER; DIEKEMA, 2004). Esse fator é decorrente do seu uso inadequado e do diagnóstico realizado de maneira incorreta ou tardia, acarretando também atrasos na implementação terapêutica adequada. Além disso, há a questão do número limitado de agentes antifúngicos existentes, o que torna fundamental a realização de testes de susceptibilidade a antifúngicos e a identificação correta do agente etiológico, de maneira a buscar o tratamento mais efetivo, evitando a emergência de espécies resistentes (ALCAZAR-FUOLI; MELLADO, 2014; VIEIRA; NASCIMENTO, 2017).

Diante deste contexto, o presente estudo se propõe a avaliar e comparar os principais fatores de virulência e perfil de sensibilidade a antifúngicos de leveduras do gênero *Candida*, provenientes do ambiente aquático e da mucosa oral de idosos residentes na comunidade ribeirinha Lago do Limão, localizada no município de Iranduba, Amazonas. Com isso, busca-se identificar as enzimas e fatores envolvidos em seu processo de patogenicidade, bem como o melhor medicamento para tratar a candidíase, de modo a contribuir para a formação de novas medidas de prevenção e tratamento, levando à melhoria na qualidade de vida da população.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leveduras

Leveduras são microrganismos eucariontes e pertencentes ao reino Fungi, o qual possui aproximadamente 611.000 espécies, representando cerca de 7% de todas as espécies eucariontes (MORA *et al.*, 2011). As leveduras estão presentes na microbiota normal oral, genitourinária e gastrointestinal dos seres humanos, podendo estar presentes como comensais desde o nascimento (AMORIM, 2014). No entanto, quando há desequilíbrios nessa microbiota, esses fungos podem realizar sua transição de microrganismos comensais inofensivos para oportunistas, com a capacidade de causar infecções no organismo humano. O gênero *Candida*, por exemplo, é composto por aproximadamente 150 espécies, onde muitas são endossimbiontes em humanos, causando infecções predominantemente em indivíduos imunossuprimidos (BIANCHI *et al.*, 2016; CIUREA *et al.*, 2020).

2.2. Leveduras de amostras clínicas: o gênero *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* são de grande importância clínica, visto que a doença fúngica mais frequente afetando as populações é a candidíase, ocasionada por espécies desse gênero. Além disso, a candidíase é uma infecção que afeta tanto indivíduos saudáveis quanto imunocomprometidos e pode ocorrer de maneira superficial, no caso de candidíase oral, mucocutânea e onicomicose ou de maneira profunda, como miocardite e septicemia. Cerca de 80% dos casos dessa doença são ocasionados por *Candida albicans*, uma levedura patogênica onipresente e membro da flora comensal. Apesar da grande maioria dos casos terem essa espécie como agente etiológico e de maior interesse clínico, estudos têm demonstrado que casos ocasionados por *Candida não-albicans* têm se tornado mais frequentes (CIUREA *et al.*, 2020; DE OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2018; KWAMIN *et al.*, 2013; LEWIS; WILLIAMS, 2017).

No estudo de Magalhães e colaboradores (2015), os autores buscaram isolar leveduras do gênero *Candida* de 100 pacientes hospitalizados em três hospitais em São Luís, Maranhão. Como resultado, obtiveram um total de 108 cepas de leveduras provenientes de amostras clínicas, sendo a maioria das espécies isoladas de

pacientes do gênero feminino (56%) e a faixa etária mais acometida, acima de 60 anos (51%). As espécies identificadas foram *Candida albicans* (41.4%), *Candida tropicalis* (30.1%), *Candida glabrata* (7.4%), *Candida parapsilosis* (5.5%), *Candida krusei* (4.6%), *Cryptococcus neoformans* (4.6%), *Trichosporon* spp. (3.7%), *Candida norvegensis* (0.9%), *Rhodotorula glutinis* (0.9%) e *Pichia farinosa* (0.9%), sendo o gênero *Candida* o mais prevalente, representando 89,7% de todas as leveduras identificadas.

Taei e colaboradores (2019) investigaram a presença de espécies de *Candida* em 341 pacientes com suspeita de infecção fúngica em um hospital em Isfahan, Irã, de fevereiro de 2017 a maio de 2019. Do total de amostras, 202 pacientes apresentaram alguma infecção ocasionada por leveduras. Dos isolados obtidos, 121 espécies do gênero *Candida* foram identificadas como *Candida não-albicans* e 76 como *Candida albicans*, demonstrando assim uma crescente frequência de espécies *Candida não-albicans* em amostras clínicas.

O estudo de Seyoum e colaboradores (2020) também obteve predominância da espécie *Candida albicans* em seus resultados. Foram isoladas 209 leveduras de 776 amostras clínicas diferentes, de um hospital na Etiópia. Dentre estas, 49,8% pertenciam à espécie *C. albicans*, 43,1% se tratavam de *Candida não-albicans* e 7,2% eram leveduras não pertencentes ao gênero *Candida*.

Em uma pesquisa realizada em Cuiabá – MT, Bianchi et. al. (2016) selecionaram pacientes idosos e os dividiram em grupos, sendo estes usuários de próteses e não usuários. Dessa forma, foram coletadas amostras desses pacientes para verificar a presença de candidíase e leveduras pertencentes ao gênero *Candida*. Como resultado, obtiveram a presença deste gênero tanto em amostras de pacientes usuários de prótese (83,3%) quanto de não usuários (53,5%)

Leite e colaboradores (2015), buscaram identificar a presença de leveduras *Candida* em idosos usuários de próteses atendidos no Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Das amostras obtidas na mucosa palatina, a espécie mais frequente foi *C. albicans*, representando 36,67% das leveduras, seguida de *C. tropicalis* 13,33% e *C. krusei* 13,33%. Quanto às leveduras obtidas da região das próteses, *C. albicans* permaneceu como a levedura mais isolada (53,33%), corroborando com os demais estudos apresentados neste trabalho

(MAGALHÃES *et al.*, 2015; SEYOUM; BITEW; MIHRET, 2020).

2.3. Leveduras ambientais

As leveduras também podem ser encontradas no ar, no ambiente terrestre e aquático, sendo estas caracterizadas como leveduras ambientais. No ambiente aquático, especificamente, há uma grande variedade de microfungos e a sua presença é proporcional à taxa e intensidade de atividades antropogênicas presentes nesses ecossistemas, conseqüentemente podendo alterar algumas de suas características (BIEDUNKIEWICZ; GÓRALSKA, 2016; LEW *et al.*, 2013). Dessa forma, há fungos que têm preferência por águas ricas em substâncias orgânicas, provenientes de diversas origens (MAHGOUB *et al.*, 2015). Dentre estes, há fungos leveduriformes com grande capacidade de adaptação às mudanças qualitativas de ambientes diferentes, como água, solo e ar, o que os possibilita viver em todos estes habitats. Diversas espécies fúngicas isoladas de ambientes aquáticos são consideradas patogênicas aos humanos e são potenciais agentes etiológicos de infecções fúngicas superficiais e sistêmicas (KULESZA *et al.*, 2018).

Na Argentina, Brandão *et al.* (2011) realizaram um estudo para verificar a diversidade e frequência de espécies de levedura no Lago Nabuel Huapi, na Patagônia, e verificar a produção de enzimas extracelulares importantes na patogenicidade, como urease e protease. Ao todo, obtiveram 149 leveduras, distribuídas entre 13 gêneros e 34 espécies. A espécie *Cryptococcus victoriae* foi a mais frequente e diversa em todos os pontos de coleta, representando 34,8% do total de isolados. Em seguida, há a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, representando 26,7% do total. Quanto à produção enzimática extracelular, grande maioria das leveduras apresentou produção de ao menos uma enzima extracelular ativa.

O estudo de Kulesza *et al.* (2018) avaliou a diversidade e dinâmica de mudanças na composição de espécies de levedura do gênero *Candida* no rio Lyna, Polônia, durante um período de observação de 20 anos (1989-2010). Nesse período, identificaram um total de 23 espécies de fungo do gênero *Candida*. As espécies *Candida albicans* e *Candida guilliermondii* foram frequentemente isoladas durante todos os anos do estudo e são consideradas patogênicas e com propriedades bioindicativas.

Medeiros *et al.* (2012) buscou identificar a qualidade da água e a diversidade de leveduras presentes no ambiente aquático de lagos tropicais e rios pertencentes à bacia do Rio Doce em Minas Gerais, sudeste brasileiro, nos anos de 2000 e 2001. Em sua análise, obtiveram 317 isolados de leveduras pertencentes a 21 gêneros e 48 espécies dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Kloekera*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Aureobasidium*, *Kodamaea* e *Metschnikowia*, sendo o gênero *Candida* o mais prevalente, com 13 espécies diferentes identificadas (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, entre outras), consideradas patógenos oportunistas e um risco à saúde dos seres humanos.

Medeiros *et al.* (2008) também estudou a biodiversidade de leveduras em um ambiente aquático do sudeste brasileiro e verificou a presença de resistência a antifúngicos em leveduras oportunistas, em lagos de água doce. O gênero mais prevalente, novamente foi *Candida*. Cerca de 50% das leveduras encontradas eram resistentes a itraconazol e anfotericina B e 11% eram resistentes a fluconazol. A presença de leveduras resistentes a estes medicamentos antifúngicos pode representar um risco à saúde para os indivíduos utilizando esses lagos para atividades de lazer.

No estudo de Brandão *et al.* (2010), verificando a diversidade de leveduras em três lagos no sudeste brasileiro e sua susceptibilidade a antifúngicos, os isolados de leveduras também demonstraram o gênero *Candida* como o mais frequente (*C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*). Destes, 21,7% mostraram-se resistentes a anfotericina B, 20% resistentes a itraconazol e 2,8% a fluconazol.

Brilhante *et al.* (2016) investigou a presença de resistência antifúngica em leveduras isoladas do lago Catú, no Ceará, entre março de 2011 e fevereiro de 2012. Assim como no estudo de Medeiros *et al.* (2008), o gênero mais prevalente foi *Candida*. Dentre os 46 isolados de levedura obtidos, 37 eram pertencentes a este gênero. 13 isolados se mostraram resistentes aos azóis, o que demonstra que leveduras ambientais também possuem mecanismos de resistência.

Além disso, Brilhante *et al.* (2011) também identificou presença de leveduras do gênero *Candida* no camarão de água doce *Macrobrachium amazonicum*, coletado do rio Amazonas. Destes isolados, 33,3% eram resistentes a fluconazol e itraconazol

e apresentaram atividades de protease e fosfolipase, enzimas que são fatores de virulência com importância significativa na patogênese de *Candida* spp.

2.4. Fatores de virulência de *Candida* spp.

As leveduras do gênero *Candida* são os fungos patógenos mais comuns aos seres humanos. Sendo assim, esses microrganismos dispõem de diversas características no que se refere à sua patogenicidade, possibilitando assim a realização das etapas de adesão, invasão e dano às células do hospedeiro. Os fatores de virulência estão envolvidos diretamente no processo de fisiopatologia das leveduras e a realização de pesquisas e estudos explorando esses fatores pode trazer grandes benefícios à sociedade, possibilitando a criação de vacinas e novas estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas ocasionadas por estes microrganismos (LIONAKIS; NETEA, 2013).

Dentre os fatores de virulência presentes em leveduras do gênero *Candida*, há a capacidade de produzir e secretar enzimas hidrolíticas, como proteases e fosfolipases, vistas como essenciais para o processo de invasão às células do hospedeiro. As fosfolipases são um grupo de enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar as ligações de éster nos glicerofosfolipídios, quebrando-os em moléculas menores, o que conseqüentemente ocasiona a lise da célula. As leveduras *Candida* spp. produzem essas enzimas em diferentes proporções e estudos demonstraram que *Candida* spp. isoladas de amostras sanguíneas apresentaram uma taxa maior na produção dessa enzima. As proteases, por sua vez, são enzimas mais ativas em pH ácido e que clivam ligações peptídicas entre dois resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e são descritas como mediadoras imediatas de virulência (CIUREA *et al.*, 2020; LIONAKIS; NETEA, 2013; MOYES; RICHARDSON; NAGLIK, 2015; SINGH *et al.*, 2019).

Além destes, há a capacidade de adesão e invasão nas células epiteliais e endoteliais por meio de endocitose induzida. Esses dois fatores contribuem e facilitam a disseminação dessa levedura e a adesão também tem um papel importante para que esses fungos desenvolvam outro fator de virulência, denominado produção de biofilmes, que também é importante no processo de patogênese. Biofilmes são comunidades complexas de microrganismos, onde os

mesmos se aderem em uma superfície (abiótica ou superfície de mucosa) para posteriormente dar início a uma proliferação de suas células. No caso das leveduras, há indução de formação de hifas e a possibilidade de crescimento tanto em superfícies abióticas quanto bióticas. Por exemplo, na estomatite dentária, esses fungos fazem uma combinação entre superfícies bióticas (mucosa oral) e abióticas (dente). Outras espécies de *Candida*, como *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, produzem biofilme, porém não produzem hifas verdadeiras. No desenvolvimento dentro do biofilme, os microrganismos ali presentes se beneficiam dessa relação, pois possuem mais chances de sobreviver em conjunto, há maior disponibilidade de nutrientes, maior resistência a fatores ambientais, cooperação metabólica entre os microrganismos, mais chances de aquisição de novo material genético. Além disso, vale ressaltar que a formação de biofilmes pode evitar a penetração e difusão de vários agentes antimicrobianos na célula fúngica, tornando-as menos suscetíveis a medicamentos antifúngicos (CIUREA *et al.*, 2020; SAHAL; BILKAY, 2018; FANNING; MITCHELL, 2012).

Outro fator de virulência presente nessas leveduras é a atividade hemolítica, processo que permite o crescimento de microrganismos patogênicos nos tecidos do hospedeiro. Esse crescimento acontece por meio da utilização de proteínas de ligação de ferro como fonte de energia. Dessa forma, a hemoglobina presente no sangue é uma grande fonte desse mineral para esses microrganismos, sendo a atividade hemolítica e a utilização de hemoglobina já consideradas importantes fatores patogênicos (LINARES *et al.*, 2007).

Quanto às leveduras da espécie *Candida albicans*, além dos fatores de virulência citados anteriormente, há a capacidade de transformação de levedura unicelular em fungo filamentoso durante as infecções, o que é considerado crítico para a presença da patogênese. Para as demais espécies do gênero *Candida*, esse fator não é considerado um pré-requisito para presença de patogenicidade, visto que espécies de *Candida não-albicans*, como *Candida glabrata*, por exemplo, é um importante agente etiológico para candidíase invasiva em seres humanos, mesmo não possuindo a característica de formar hifas (LIONAKIS; NETEA, 2013).

2.5. Antifúngicos utilizados no tratamento de *Candida*

Os medicamentos antifúngicos utilizados atualmente no tratamento de micoses, inclusive na candidíase, estão divididos em três grupos: polienos, azóis e equinocandinas (LI *et al.*, 2018; ZAVREL; WHITE, 2015).

Na década de 1950, houve o grande início da geração de drogas antifúngicas sistêmicas, com a aprovação do polieno anfotericina B desoxicolato. A classe dos polienos age ligando-se ao ergosterol presente na membrana plasmática da célula fúngica, levando ao surgimento de canais na mesma, onde há perda de íons e consequente lise da célula. Por outro lado, esses antifúngicos também podem causar danos às células do hospedeiro, ligando-se ao colesterol presente na membrana de células animais. Apesar de seu potencial tóxico, os polienos permanecem como os fungicidas mais eficazes e com mais amplo espectro, dentre todos os antifúngicos utilizados clinicamente. Contudo, nos anos 1990 houve desenvolvimento de formulações lipídicas de anfotericina B, levando à diminuição de efeitos colaterais, como disfunção renal (ODDS; BROWN; GOW, 2003; PERFECT, 2017).

Os derivados azólicos sistêmicos foram introduzidos na década de 1970, primeiramente com o miconazol intravenoso e cetoconazol oral, a primeira geração dessa classe. Assim, iniciaram a sua ascensão como escolha de primeira linha para tratar infecções fúngicas invasivas. Posteriormente, com o aprimoramento de pesquisas, surgiram a segunda geração (fluconazol e itraconazol) e terceira geração de azóis (voriconazol, posaconazol e isavuconazol). Essa classe de antifúngicos possui o mecanismo de ação voltado para o bloqueio da síntese de ergosterol, tendo como alvo a enzima citocromo P450 lanosterol 14- α -desmetilase, que interfere no produto codificado pelo gene *Erg11* em leveduras. Sendo o ergosterol um componente fundamental da membrana celular, realizando nas células fúngicas papel similar ao que o colesterol realiza em membranas celulares animais, interromper sua síntese acarreta desregulação na fluidez e perda de integridade da membrana plasmática (PERFECT, 2017; REVIE *et al.*, 2018).

A classe das equinocandinas é a mais recente lançada na indústria, nos anos 2000. Estas possuem a vantagem de apresentar pouca toxicidade às células do hospedeiro, o que contribui bastante para seu uso contínuo em hospitais. Isso se deve ao fato de que as mesmas agem bloqueando a 1,3- β -glucano sintase, proteína essencial na formação da parede celular, região ausente nas células humanas. Sua baixa toxicidade, atividade antifúngica de amplo espectro e maior segurança na

utilização influenciou para que se tornassem a primeira linha de tratamento para ambas candidemias, nosocomial e invasiva. Antifúngicos presentes nessa classe são: caspofungina, micafungina e anidulafungina (PAPPAS *et al.*, 2016; PERFECT, 2017).

2.6. Identificação de leveduras por Biologia Molecular

Os métodos moleculares tornaram-se bastante úteis para a identificação de agentes patogênicos. A definição da espécie de levedura é de extrema importância, visto que com este conhecimento, delimita-se o medicamento antifúngico mais adequado para seu tratamento, levando em consideração que cada espécie pode exibir susceptibilidade antifúngica distinta, dentro de um mesmo gênero (CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2010; LEAW *et al.*, 2006).

A identificação rápida de leveduras provenientes de amostras clínicas é importante para que seja determinada sua medida terapêutica apropriada, bem como para seu diagnóstico imediato. No entanto, esta torna-se uma tarefa complicada devido ao fato de muitos métodos convencionais utilizados para esta finalidade serem, por muitas vezes, inconclusivos. Estudos já relataram a dificuldade em se obter uma identificação precisa de cepas de leveduras ao nível de espécie utilizando esses métodos, já que esses fungos dependem de variáveis como temperatura e meio de cultura. A falta de inclusão de espécies fúngicas emergentes no banco de dados de kits de identificação disponíveis comercialmente, pode resultar em uma identificação errônea dos agentes etiológicos, uma vez que eles são delineados para identificar cepas comuns em amostras clínicas, porém podem falhar na identificação de cepas menos frequentes. Conseqüentemente, podem ser adotados tratamentos inadequados, o que contribui para a resistência a antifúngicos (CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2010; CORNET *et al.*, 2011; HATA *et al.*, 2007; PAUL; KANNAN, 2019).

As técnicas de identificação com base molecular possuem grande vantagem, pois há uma facilitação na identificação precisa dessas espécies patogênicas e melhora na caracterização de cepas. A extração do DNA, amplificação de regiões do material genético com primers fúngicos universais e sequenciamento do amplicon permite que uma grande variedade de isolados fúngicos de amostras clínicas sejam identificados. Para o reino Fungi, a identificação molecular é realizada por meio do

sequenciamento de regiões ITS. Essas regiões são mais promissoras para a definição de espécies, devido sua maior variabilidade. Dessa forma, o sequenciamento da região ITS mostra-se uma alternativa confiável e precisa para os métodos convencionais de identificação, além de ser uma ferramenta eficaz para diferenciação de cepas não frequentes, que por muitas vezes podem ser confundidas com outras espécies (CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2010; IWEN; HINRICHS; RUPP, 2002; LEAW *et al.*, 2006; PAUL; KANNAN, 2019; TAVERNA *et al.*, 2013).

2.7. Infecções fúngicas e a importância para a Saúde Pública

Nas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas tem crescido significativamente. As chamadas IFI – infecções fúngicas invasivas, tornaram-se a maior causa de morbidade e mortalidade em indivíduos debilitados, como pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou pacientes realizando quimioterapia. As leveduras do gênero *Candida*, junto com os filamentosos do gênero *Aspergillus*, são as causas mais comuns dessas infecções. Mais de 90% das IFI tendo leveduras como agente etiológico são ocasionadas por apenas seis espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans*. No entanto, essa lista de espécies relatadas continua crescendo. Assim, faz-se necessário mais estudos acerca de sua identificação molecular e mecanismos de virulência, o que pode trazer grandes benefícios para a sociedade, como novas estratégias terapêuticas para tratar esse problema de saúde pública (CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2010; LATOUCHE *et al.*, 1997; LEAW *et al.*, 2006; LIONAKIS; NETEA, 2013).

Além disso, há o uso profilático de antifúngicos, antibióticos e esteroides de amplo espectro pela população, fatores que levaram ao surgimento de resistência a azóis, classe de primeira linha para tratamento de infecções fúngicas. A resistência antifúngica de fungos emergentes já é um problema clínico reconhecido mundialmente e dessa forma, há grande necessidade de pesquisas que realizem testes de susceptibilidade, para que haja o manejo clínico ideal, estudos epidemiológicos detalhados e prevenção e contenção de surtos de micoses (LATOUCHE *et al.*, 1997; PERFECT, 2017; PFALLER; DIEKEMA, 2004).

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar o perfil de virulência de espécies de leveduras clínicas e ambientais da comunidade ribeirinha do lago do Limão / Iranduba – Amazonas.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar molecularmente as amostras de leveduras em nível de espécie;
- Verificar o perfil de susceptibilidade das espécies de leveduras a antifúngicos de uso tópico e oral;
- Avaliar os fatores de virulência presentes nas espécies de leveduras;
- Comparar o perfil de virulência entre os isolados de leveduras ambientais e os clínicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo quantitativo, laboratorial, transversal e descritivo.

4.2 Aspectos Éticos

Este estudo foi conduzido em consonância com a Resolução 466/2012 do Ministério da Saúde, que trata sobre as recomendações Éticas e Legais com pesquisas envolvendo seres humanos. Este trabalho foi desenvolvido com os isolados de leveduras previamente obtidos no estudo de Alencar (2017) e Matias (2015). A pesquisa na qual foram coletados os isolados clínicos obteve a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde encontra-se aprovado desde 2017, sob o protocolo nº 61618016.0.0000.5020. Por este se tratar de um novo trabalho, o mesmo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), obtendo aprovação também do Comitê de Ética da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) sob o protocolo nº 50562521.1.0000.5020.

4.3 Procedimentos Metodológicos

4.3.1. Cultivo das Amostras

Foram utilizadas neste estudo 48 leveduras. Destas, 38 são de amostras clínicas da microbiota oral de idosos da comunidade Lago do Limão e 10 leveduras isoladas de água de consumo dos idosos residentes no lago. Estas culturas estavam conservadas sob-refrigeração a - 20 °C em Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) suplementado com glicerol e estão inseridas no acervo da Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/Fiocruz Amazônia. As atividades laboratoriais desse projeto foram desenvolvidas no laboratório multiusuário e de Micologia do ILMD – FIOCRUZ Amazônia. As amostras clínicas foram coletadas durante a realização da dissertação de mestrado da aluna Carol Falcão (Projeto Condições de saúde bucal da população idosa em uma comunidade rural do Amazonas; nº processo CEP 61618016.0.0000.5020) e cedidas pela mesma, à Coleção de Fungos da Amazônia do Instituto Leônidas e Maria Deane – CFAM – ILMD-FIOCRUZ- Amazônia. Quanto às amostras ambientais, foram coletadas durante a monografia de Rosiane Matias (Identificação de leveduras com potencial patogênico em água de consumo humano de comunidades rurais de Iranduba, Amazonas) e gentilmente cedidas pela Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura – Laboratório DMAIS – para compor este trabalho.

As amostras foram reativadas em caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD), com temperatura de 37°C durante 48 horas, sob agitação. Finalizado este processo, as leveduras foram repicadas para placas de Petri contendo meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) acrescido de 0,05% de cloranfenicol, para evitar crescimento bacteriano, sob as mesmas características de incubação citadas anteriormente.

4.3.2. Identificação com Chromagar

Após o cultivo em SDA, as amostras de *Candida* spp. foram submetidas a repiques em meio CHROMagar Candida, meio seletivo cromogênico. Determinadas espécies do gênero *Candida* produzem suas colônias com colorações distintas neste meio, o que torna possível não só a identificação presuntiva das espécies, como também a confirmação da ausência de possíveis contaminações, uma vez que seria possível identificá-las devido as colorações diferentes (BAUMGARTNER;

FREYDIERE; GILLE, 1996; KOEHLER *et al.*, 1999).

4.4. Fatores de Virulência

Para a determinação do perfil de virulência das leveduras, foi avaliada a presença de enzimas com participação importante na patogenicidade. As leveduras foram repicadas em meios específicos de acordo com a enzima a ser identificada. Foi avaliada a presença das enzimas protease, urease, fosfolipase e hemolisina.

Para verificação de produção da enzima protease, foi utilizada a metodologia de Ruchel e colaboradores (1982), onde culturas de levedura com crescimento de 24 horas a 25°C em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) foram inoculadas em 3 pontos equidistantes em placas de Petri contendo meio Ágar Proteinase (mistura de Yeast Carbon Base - 11,7g; Albumina bovina fração V - 2g; Água destilada esterilizada - 100ml). Após este processo, as placas foram incubadas a 37°C por até 48 horas e o teste é considerado positivo mediante formação de halos translúcidos ao redor das colônias, correspondendo à hidrólise de albumina sérica bovina (BSA) no meio (CARVALHO, 2017).

O teste de urease foi realizado através da semeadura das espécies de levedura no meio Ágar Ureia de Christensen, a 37°C e com observações de até sete dias. A atividade dessa enzima pode ser observada pela mudança de pH do meio, mudando a coloração amarela para rosada. Considera-se resultado negativo quando a cor do meio permanece amarela após o período de incubação (LACAZ, 2002; SIDRIM; MOREIRA, 1999; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A atividade hemolítica foi avaliada segundo Linares *et al.* (LINARES *et al.*, 2007) com adaptações. Sangue de carneiro desfibrinado (7 ml) foi centrifugado a 3200 rpms por 5 minutos e o sobrenadante descartado. As células vermelhas foram ressuspensas em 10 ml de PBS e lavadas por centrifugação, sendo este processo repetido três vezes. Por fim, as células vermelhas do sangue foram ressuspensas em 5 ml de PBS e adicionadas a 100 ml de SDA, acrescido de cloranfenicol e 3% de glicose. Em seguida, uma suspensão de leveduras foi padronizada com a escala 0,5 de MacFarland e desta solução foram retirados 10 µL, que foram colocados no meio Ágar Sabouraud Dextrose, acrescido de 3% glicose e 7% de sangue de carneiro

desfibrinado. Posteriormente, incubou-se a 37°C por 48 horas. A presença de halo translúcido indica atividade hemolítica positiva.

A produção de fosfolipase foi avaliada segundo o método em placa com gema de ovo (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982). O meio consiste de Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) acrescido de 17,19 g de cloreto de sódio, 0,16 g de cloreto de cálcio e 9 g de glicose. O meio foi autoclavado e posteriormente, 30% de emulsão de gema de ovo em solução salina foram adicionados de forma asséptica. Em seguida, 3 poços pequenos foram feitos no meio de cultura e 10 µL da solução de leveduras em água salina foram inseridos em cada poço. A incubação foi a 37°C por 48 horas e toma-se o resultado como positivo quando há presença de halos opacos ao redor da colônia.

Os testes enzimáticos foram realizados em triplicatas e o valor da zona de precipitação (Pz) foi dado como a média dos diâmetros avaliados (colônia / halo + colônia). A produção foi classificada de acordo com o valor do Pz em *muito forte* ++++ (Pz ≤ 0,69), *forte* +++ (Pz entre 0,70 – 0,79), *média* ++ (Pz entre 0,80 – 0,89) ou *fraca* + (Pz entre 0,90 – 0,99).

4.5. Perfil de Sensibilidade a Antifúngicos

A análise do perfil de sensibilidade a antifúngicos foi realizada de acordo com a técnica Etest (AB BIODISK, Salna, Suécia). As leveduras foram suspendidas em uma solução salina a 0,85% com sua turbidez ajustada na escala 0,5 de MacFarland. Após esse procedimento, 500 µl dessa suspensão foi semeada em três direções em placa de Petri (150 mm) contendo meio Ágar RPMI 1640 (1,5%) com 2% de glicose, com o auxílio de um swab esterilizado. Aguardou-se então o período de 15 minutos para evitar o excesso de líquido no meio e aplicaram-se as fitas Etest, colocando primeiramente na placa de Petri a região da fita com menor concentração de antifúngico. Por fim, incubou-se a 35°C por 24 a 48 horas. Os antifúngicos testados foram itraconazol (0,002 ~ 32 µg/ml), fluconazol (0,016 ~ 256 µg/ml), cetoconazol (0,002 ~ 32 µg/ml) e anfotericina B (0,002 ~ 32 µg/ml) frente às leveduras obtidas de amostras clínicas e ambientais. Foi considerado o valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM), o local de intersecção do halo de inibição (elipse) para cada

antifúngico. O perfil de sensibilidade a cada droga deve ser classificado como sensível (S), sensível dose-dependente (SDD) e resistente (R). As instruções para verificação de susceptibilidade *in vitro* de espécies de *Candida* foram adaptadas do documento M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

4.6. Identificação Molecular

Para a confirmação de espécies identificadas por método presuntivo (CHROMagar *Candida*), foi realizada a identificação molecular das leveduras cultivadas. A extração do DNA genômico se iniciou com uma pré-fase de maceração mecânica com esferas de vidro (*beads*), seguido do kit DNEasy Blood and Tissue da Qiagen, conforme recomendações do fabricante. O material genético foi amplificado por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciadores flanqueando alvos desde a região 3' do gene 18S rRNA até a região 5' do gene 28S rRNA, que corresponde ao espaçador interno transcrito (ITS) ITS1 – 5,8S – ITS2. Esta região foi escolhida por ser o marcador oficial para o DNA Barcode de Fungos.

O perfil de termociclagem utilizado para a região ITS foi realizado segundo Alves *et. al.* (ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010), o qual consiste em uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 63°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, finalizando com uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. Os *primers* utilizados foram ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3').

As amplificações da região ITS de cada cultura foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose, corado com GelRed. Os fragmentos amplificados correspondentes à toda região ITS1 – 5,8S – ITS2 foram purificados para remoção de reagentes não incorporados durante o processo de amplificação e posteriormente, submetidos à reação de sequenciamento nucleotídico pela técnica de Sanger na plataforma de genômica do Laboratório Temático de Biologia Molecular – LTBM, localizado no Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia – INPA. Após esta etapa, os eletroferogramas foram utilizados para construção de *contigs* e montagem final de cada sequência, com auxílio de *softwares* de bioinformática, sendo por fim revisados

manualmente. As sequências obtidas foram submetidas à identificação a nível de espécie por meio de comparação destas com sequências depositadas no banco de dados GenBank.

4.7. Análise Estatística

Os dados foram avaliados pelo programa R 4.1.2 e RStudio 1.1.4 (<https://www.r-project.org/>) com vários pacotes (tidyverse, epiDisplay, gridExtra e sjPlot). Os dados foram tabulados em Microsoft Excel 2007 e a análise estatística consistiu na apresentação dos resultados em números absolutos, percentuais e médias. A análise da relação entre o perfil de patogenicidade (produção enzimática) dos grupos de leveduras clínicas e ambientais foi verificada através do Teste Exato de Fisher e Qui-quadrado de independência (χ^2). O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%, ou seja, considera-se estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

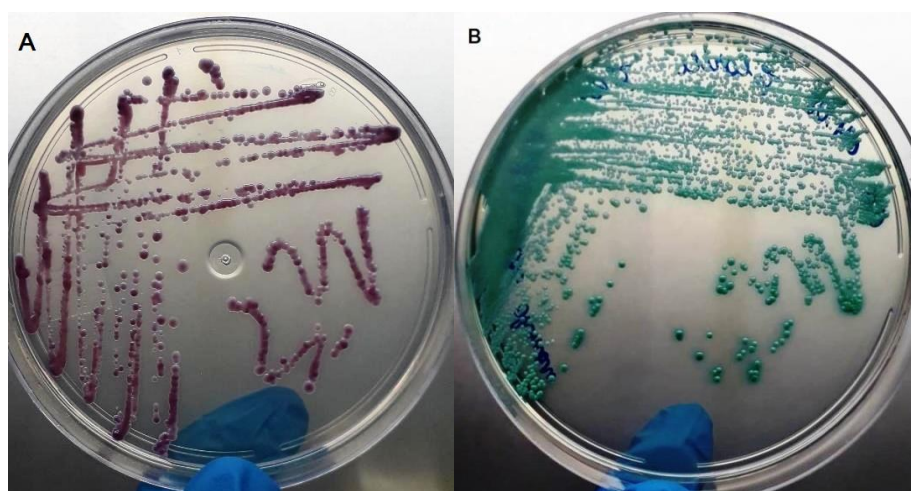
5. FINANCIAMENTO

A pesquisa foi coordenada pelo Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia), com apoio financeiro do governo do Estado, através da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Identificação presuntiva com Chromágar Candida

Todas as 48 leveduras, ambientais e clínicas, obtiveram crescimento no meio Chromágar Candida. Após 48 horas foi realizada a leitura das placas, onde foi obtida uma variedade de colorações, sendo algumas destas consideradas espécie-específicas. Em alguns casos onde a coloração se encontrava fraca, a leitura foi feita após 72 horas do repique. Dessa forma, através do cultivo em meio Chromágar Candida, foi possível identificar presuntivamente 29 isolados, sendo a maioria *Candida não-albicans*: 11 leveduras apresentaram crescimento com coloração que vai do rosa ao lilás, com o centro mais escuro que as bordas e com o aspecto brilhante. Estas foram identificadas como *Candida glabrata* (23%). 11 isolados cresceram em tonalidade rosa claro/pálido, com colônias opacas, identificadas como *Candida parapsilosis* (23%), 4 tiveram o crescimento em tom azul acinzentado, centro mais escuro e halos em tom roxo, sendo estas classificadas como *Candida tropicalis* (8%) e 3 cresceram em tom verde maçã, identificadas como *Candida albicans* (6%). Os demais isolados foram encaminhados para serem identificados diretamente através de Biologia Molecular, tendo em vista que cresceram em tonalidade creme e / ou branca, não sendo possível sua identificação presuntiva em Chromágar Candida.



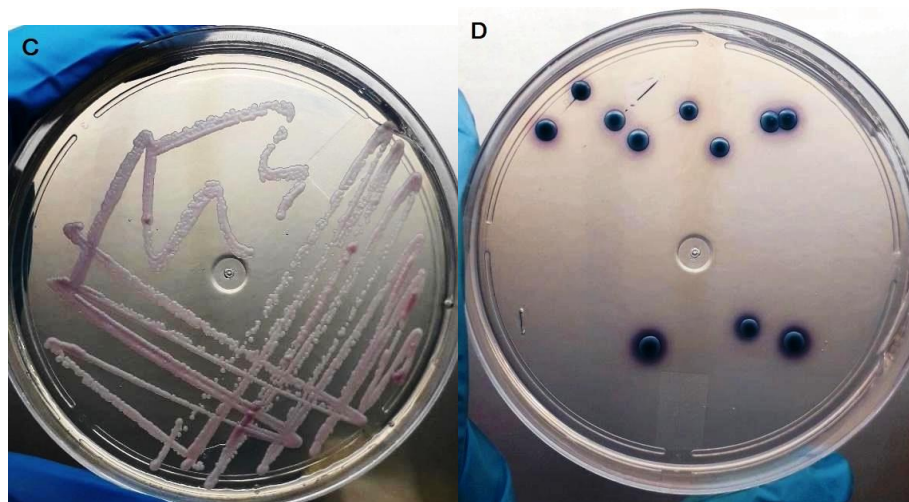


Figura 1 - Crescimento de leveduras em meio Chromágar Candida. **A)** *Candida glabrata* com 72 horas de cultivo, tonalidade rosa/ lilás. **B)** *Candida albicans* com 48 horas de cultivo, tonalidade verde maçã. **C)** *Candida parapsilosis* com 48 horas de cultivo, coloração rosa claro / pálido. **D)** *Candida tropicalis* com 72 horas de cultivo, tonalidade azul acinzentada.

6.2. Identificação por Biologia Molecular

Neste trabalho, foram identificadas 45 leveduras a nível de espécie, sendo 41 destas identificadas através de biologia molecular e 4 identificadas presuntivamente através do meio Chromagar Candida e por meio do comprimento de banda de DNA visualizado em eletroforese em gel de agarose, com cerca de 630 pb. Até o momento em que esta dissertação foi desenvolvida, não foi possível a identificação molecular de 3 leveduras, devido ao novo aumento de casos de Covid-19 na cidade de Manaus- Amazonas.

Ao todo, foram identificadas 3 *Candida albicans* (6,6%), 15 *Candida glabrata* (33,3%), 11 *Candida parapsilosis* (24,4%), 4 *Candida tropicalis* (8,8%), 6 *Meyerozyma guilliermondii* (13,3%), 2 *Meyerozyma caribbica* (4,4%), 1 *Candida metapsilosis* (2,2%), 1 *Saccharomyces cerevisiae* (2,2%), 1 *Kodamaea ohmeri* (2,2%) e 1 *Lodderomyces elongisporus* (2,2%). Alguns isolados aqui citados foram identificados na plataforma NCBI-Blast com o seu nome teleomorfo. Segundo o novo padrão M64 – Implementação de mudanças taxonômicas, desenvolvido pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), será recomendado a adição de uma nota informando o nome anamorfo / teleomorfo da levedura, quando mais conhecido por clínicos. Dessa forma, *Meyerozyma guilliermondii* também pode ser identificada por seu nome anamorfo, *Candida guilliermondii*; *Meyerozyma caribbica* possui nomenclatura anamorfa *Candida fermentati*; *Kodamaea ohmeri* pode ser identificada pelo nome

anamorfo *Candida guilliermondii* var *membranifaciens*. Quanto à espécie *Lodderomyces elongisporus*, esta costumava ser considerada a forma teleomorfa (sexual) de *Candida parapsilosis*. No entanto, sequenciamentos do gene RNA ribossomal revelaram que na verdade, trata-se de uma espécie distinta (AL-OBAID *et al.*, 2018; JAMES; COLLINS; ROBERTS, 1994).

Neste trabalho, espécies *Candida não-albicans* foram mais predominantes em relação à *C. albicans*, corroborando com estudos anteriores (MOHANDAS; BALLAL, 2011; NEGRI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2019; TAEI; CHADEGANIPOUR; MOHAMMADI, 2019). Até recentemente, *Candida albicans* era reconhecida como a mais comum espécie causadora de candidíase. Entretanto, nas últimas décadas foi possível verificar uma troca progressiva desta espécie com as de *Candida não-albicans*, especialmente *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (LATHA *et al.*, 2011; SEYOUUM; BITEW; MIHRET, 2020).

Além disso, *C. glabrata* foi a levedura mais prevalente entre as espécies de *Candida não-albicans*. Este dado corrobora com o estudo de Negri *et al.* (2009) no qual um total de 70 isolados do gênero *Candida* foram obtidos de um hospital universitário em Maringá – Paraná, com espécies *Candida não-albicans* representando mais da metade dos isolados identificados. Resultados semelhantes também foram reportados no estudo de Tai *et al.* (2019) no Irã, onde *C. glabrata* foi a levedura de espécie *não-albicans* mais frequente. Em contrapartida, Mohandas e Ballal (MOHANDAS; BALLAL, 2011) obtiveram uma maior frequência de *C. krusei* entre os isolados *Candida não-albicans* obtidos de amostras clínicas de um hospital na Índia.

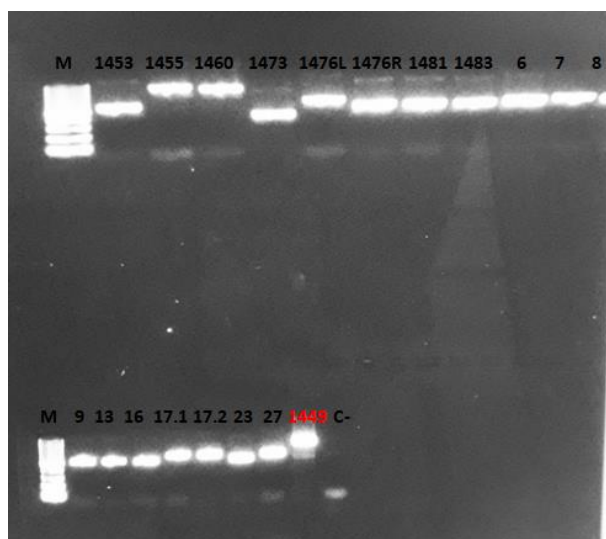


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose. Amplificação das regiões ITS1 e

ITS4. Em vermelho, a levedura 1449 da espécie *Candida glabrata*.

6.3. Fatores de Virulência - Produção enzimática

Todas as leveduras, ambientais e clínicas, foram avaliadas quanto à sua capacidade de produção de enzimas relacionadas aos fatores de virulência, sendo estas: ureases, fosfolipases, proteases e hemolisinas. Do total de 48 leveduras, 37 (77%) demonstraram capacidade de produzir ao menos uma enzima hidrolítica, enzimas consideradas fatores determinantes na patogenicidade. De modo geral, mais da metade das leveduras testadas tiveram resultado positivo para produção de hemolisinas (68,7%), 47,9% produziram proteases, 16,6% foram capazes de produzir fosfolipases e todas obtiveram resultado negativo no teste de ureases. Os resultados por espécie para cada respectivo teste estão expostos na tabela 1; A análise dos resultados por grupo distinto (isolados clínicos e ambientais) estão inseridos no quadro 1.

Tabela 1 – Produção enzimática por espécie e origem (clínica ou ambiental). Valores da Zona de Precipitação (Pz) para as enzimas fosfolipase, hemolisina e protease.

Código	Espécie	Fosfolipase	Hemolisina	Protease
CFAM 1449	<i>C. glabrata</i>	0,13	0,5	0,625
CFAM 1450	<i>C. tropicalis</i>	-	0,625	0,6
CFAM 1451	<i>C. glabrata</i>	-	0,55	0,4
CFAM 1452	<i>C. tropicalis</i>	-	0,53	-
CFAM 1453	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-
CFAM 1454	<i>C. glabrata</i>	-	0,63	0,33
CFAM 1455	<i>C. glabrata</i>	-	0,6	-
CFAM 1456	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-
CFAM 1457	<i>C. tropicalis</i>	-	0,5	-
CFAM 1458	<i>C. albicans</i>	-	0,5	0,28
CFAM 1459	<i>C. tropicalis</i>	-	0,72	0,66
CFAM 1460	<i>S. cerevisiae</i>	0,36	0,5	0,6
CFAM 1461	<i>C. glabrata</i>	-	0,625	0,6
CFAM 1463	<i>C. glabrata</i>	-	-	0,72
CFAM 1464	<i>C. glabrata</i>	0,78	0,45	-
CFAM 1465	<i>C. glabrata</i>	-	0,5	0,71
CFAM 1466	<i>C. glabrata</i>	-	0,61	0,5
CFAM 1467	-	-	0,71	-
CFAM 1468	<i>C. albicans</i>	0,5	0,5	-
CFAM 1469	-	-	0,69	0,33
CFAM 1470	<i>C. metapsilosis</i>	-	-	-

CFAM 1471	<i>C. albicans</i>	-	0,428	0,4
CFAM 1473	<i>K. ohmeri</i> (anamorfa <i>Candida guilliermondii</i> var <i>membranifaciens</i>)	-	0,57	-
CFAM 1476.L	<i>M. caribbica</i> (anamorfa <i>C. fermentati</i>)	0,28	-	-
CFAM 1476.R	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	0,4
CFAM 1477	<i>M. guilliermondii</i> (anamorfa <i>C. guilliermondii</i>)	-	0,5	-
CFAM 1478	<i>C. glabrata</i>	0,6	0,5	0,5
CFAM 1479	<i>C. glabrata</i>	-	0,53	0,4
CFAM 1480	<i>C. glabrata</i>	-	0,54	0,25
CFAM 1481	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-
CFAM 1482	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	0,42
CFAM 1483	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-
CFAM 1484	<i>C. glabrata</i>	-	0,66	-
CFAM 1485	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-
CFAM 1486	<i>C. glabrata</i>	-	0,55	-
CFAM 1487	<i>C. glabrata</i>	-	0,6	0,25
CFAM 1488	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-
CFAM 1489	<i>M. guilliermondii</i> (anamorfa <i>C. guilliermondii</i>)	-	-	-
C6	<i>L. elongisporus</i>	0,7	0,625	0,5
C7	<i>M. caribbica</i> (anamorfa <i>C. fermentati</i>)	-	0,5	-
C8	<i>M. guilliermondii</i> (anamorfa <i>C. guilliermondii</i>)	-	0,53	-
C9	<i>C. parapsilosis</i>	0,7	0,5	0,4
C13	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-
C16	<i>C. parapsilosis</i>	-	0,5	0,5
C17	<i>M. guilliermondii</i> (anamorfa <i>C. guilliermondii</i>)	-	0,5	-
C18	<i>M. guilliermondii</i> (anamorfa <i>C. guilliermondii</i>)	-	0,5	0,44
C23	-	-	-	-
C27	<i>M. guilliermondii</i> (anamorfa <i>C. guilliermondii</i>)	-	-	-

Legenda – CFAM 1449 a 1489: leveduras provenientes de amostras clínicas; C6 a C27: leveduras de amostras ambientais; (-) = leveduras negativas para o respectivo teste.

Quadro 1 – Resultados dos testes enzimáticos com leveduras clínicas e ambientais

Variáveis	Local de coleta		p-valor
	Leveduras Clínicas n = 38 (%)	Leveduras Ambientais n = 10 (%)	
PROTEASE	19 (50.0)	4 (40.0)	0.8
Muito Forte	5 (13.1)	4 (40.0)	
Forte	14 (36.8)	-	
NEG	19 (50.0)	6 (60.0)	
FOSFOLIPASE	6 (15.7)	2 (20.0)	0.4
Muito forte	5 (13.1)	-	
Forte	1 (2.6)	2 (20.0)	
NEG	32 (84.2)	8 (80.0)	
HEMOLISINA	26 (68.4)	7 (70.0)	> 0.9
Muito Forte	23 (60.5)	7 (70.0)	
Forte	3 (7.8)	-	
NEG	12 (31.5)	3 (30.0)	

Legenda – NEG: negativo. p-valor do teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher.

Nível de significância = < 0,05.

Ressalta-se que a região amazônica é bem extensa e com diversas características tanto em seu clima quanto em corpos d'água e solo. Por ser tão vasta, há lacunas de conhecimento quanto aos microrganismos presentes nesses ambientes e sua real capacidade de virulência, envolvida nos processos infecciosos. Neste estudo, os valores obtidos no teste Exato de Fisher e Qui-quadrado mostram que não houve diferença estatística significativa entre a produção de fatores de virulência (enzimas hidrolíticas e atividade hemolítica) de leveduras com origem clínica e ambiental, com p valores > 0,05, ultrapassando o nível de significância. Dessa forma, entende-se que as leveduras ambientais também possuem capacidade de produzir enzimas importantes na patogenicidade, assim como leveduras de origem clínica.

A presença de produção enzimática em leveduras ambientais tem sido reportada em estudos anteriores. Brandão e colaboradores (2011), realizaram testes para verificar a produção de urease, protease e amilase de leveduras ambientais isoladas do lago Nahuel Huapi, na Argentina. De 148 isolados, 82% foi capaz de produzir ao menos uma das enzimas testadas. Já no estudo de Carrasco et. al. (2012), onde foram isoladas leveduras ambientais do solo e de um lago em uma ilha na Antártida, todas as culturas produziram ao menos uma das enzimas hidrolíticas nos testes. No Brasil, Gomes e colaboradores (2015) isolaram leveduras de um tanque de

água onde eram cultivadas bromélias da espécie *Vriesea minarum* em Minas Gerais. Do total de 352 isolados, 282 mostraram pelo menos uma atividade enzimática positiva, sendo a atividade proteolítica a de maior destaque.

33 leveduras (69%) testadas neste trabalho obtiveram produção de hemolisinas, com destaque para *Candida albicans* e *Candida glabrata* (valores Pz de 0,42 e 0,45 respectivamente - atividade muito forte), tendo estas leveduras uma probabilidade maior de ocasionar infecções fúngicas. Ao separarmos as leveduras em seus respectivos grupos, 68,4% dos isolados clínicos e 70% das leveduras ambientais foram capazes de produzir esta enzima, respectivamente. Destas, 94% obtiveram atividade hemolítica classificada como muito forte ($Pz \leq 0,69$) e 6% tiveram atividade considerada forte (Pz entre 0,70 – 0,79). A maior parte das cepas de *Candida parapsilosis* e 2 cepas de *Meyerozyma guilliermondii* (anamorfa *Candida guilliermondii*) não foram capazes de desenvolver atividade hemolítica positiva, corroborando com outros estudos (ROSSONI *et al.*, 2013), o qual comparou a atividade hemolítica entre espécies *Candida albicans* e *Candida não-albicans*.

Quanto à produção de protease, 23 leveduras (48%) foram consideradas positivas, sendo 91,3% destas com atividade fortemente positiva ($Pz \leq 0,69$) e 8,7% com atividade considerada forte (Pz entre 0,70 – 0,79). A respeito dos valores de cada grupo, 50% das leveduras clínicas produziram proteases e os isolados ambientais, 40%. Novamente, as leveduras *Candida albicans* e *Candida glabrata* destacaram-se (Pz 0,28 e 0,25, respectivamente - atividade muito forte), conseqüentemente, possuem mais probabilidade de ocasionar infecções. Nossos resultados foram similares ao de Silva e colaboradores (2019), os quais tiveram 57,1% de suas leveduras testadas positivas para proteases e *C. glabrata* com maior produção desta enzima. Entretanto, Andreola *et. al.* (2016) verificou 97% de cepas produtoras de protease em seu estudo com leveduras *Candida* de origem clínica.

Neste trabalho, a grande maioria das leveduras testadas mostraram-se incapazes de produzir fosfolipases (83,3%), enquanto 16,6% obtiveram resultado positivo no teste, sendo que 62,5% destas foram avaliadas como atividade muito forte ($Pz \leq 0,69$) e 37,5% foram avaliadas como atividade forte (Pz entre 0,70 – 0,79). Quando analisamos os grupos de maneira distinta, 20% de leveduras ambientais e 15,7% das leveduras clínicas foram positivas neste teste. Quanto às espécies que mais se destacaram, estão *Candida glabrata* e *Meyerozyma caribbica* (Pz 0,13 e 0,28,

respectivamente – atividade muito forte). No estudo de Silva et. al. (2019), foram obtidos resultados similares, com prevalência de 71,4% de resultados negativos para fosfolipases. Já no estudo de Andreola e colaboradores (2016), onde buscavam comparar a produção de fosfolipases e proteases entre leveduras *Candida*, foi constatado 33% de cepas produtoras de fosfolipases.

Quanto à enzima urease, não houve leveduras capazes de produzi-la neste trabalho, obtendo assim resultado negativo para todas as amostras de ambos os grupos. Dados semelhantes foram encontrados em estudos realizados recentemente (BESSA et. al., 2020; SILVA et. al., 2019), onde ambos verificaram a produção de enzimas hidrolíticas em leveduras *Candida* provenientes da cavidade oral de idosos. Além disso, estudos também relataram que a maior parte de leveduras responsáveis por causar doenças no homem são negativas para esta enzima (RUTHERFORD, 2014; SILVA et al., 2019).

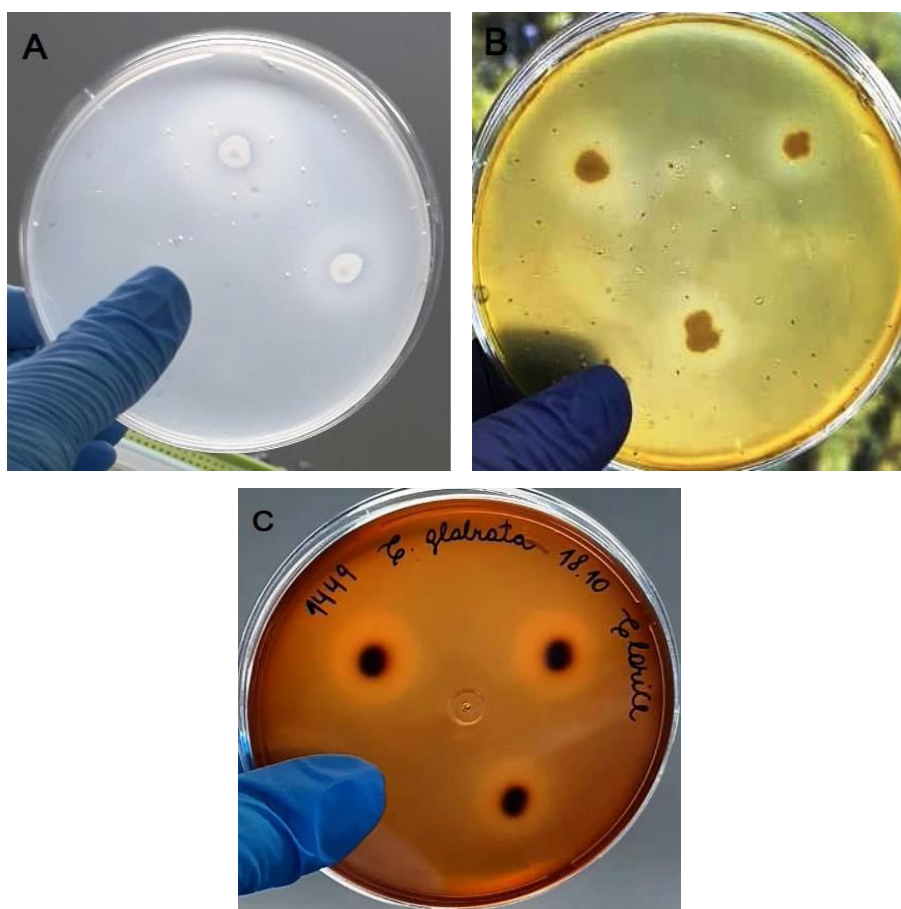


Figura 3 - Testes enzimáticos positivos. **A)** Produção de protease em meio Ágar protease, teste positivo. Presença de halos translúcidos ao redor das colônias. **B)** Teste positivo para produção de fosfolipase, em meio Ágar Gema de Ovo. Presença de halos opacos ao redor das colônias. **C)** Produção de hemolisina em meio Ágar Sabouraud suplementado com 7% de

sangue de carneiro, levedura com atividade hemolítica positiva. Há presença de halos ao redor das colônias, característicos de hemólise.

6.4. Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Foram realizados testes de sensibilidade a antifúngicos (E-TEST) com o total de 48 leveduras. Os antifúngicos testados foram dos seguintes grupos: Azóis (itraconazol, cetoconazol e fluconazol) e polienos (anfotericina B). De 48 leveduras, 30 (72,9%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antifúngicos testados, representando mais da metade dos microrganismos.

Todas as leveduras demonstraram sensibilidade à anfotericina B, sendo este o antifúngico que apresentou maior eficácia, obtendo-se espectro de inibição de 0,094µg/mL a 1µg/mL. Para cetoconazol, 30 se mostraram resistentes a este antifúngico (62,5%), enquanto 4 leveduras (8,3%) foram sensíveis e 14 (29,2%) foram sensíveis dose-dependentes, com a concentração inibitória mínima (MIC) obtendo variação de 0,094µg/mL a 16µg/mL. Quanto ao itraconazol, 34 leveduras mostraram resistência (70,8%), sendo este o antifúngico menos eficaz dentre os testados. 2 se mostraram sensíveis (4,1%) e 12 foram sensíveis dose-dependentes (25%), com a concentração inibitória mínima (MIC) variando de 0,125µg/mL a 8 µg/mL. Para fluconazol, 31 leveduras testadas demonstraram resistência (64,6%), 11 leveduras (22,9%) foram sensíveis a este antifúngico e 6 foram sensíveis dose-dependentes (12,5%), com a concentração inibitória mínima (MIC) variando de 1,5µg/mL a 128µg/mL.

Tabela 2 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima (MIC) em µg/mL, por espécie

Espécie (número de cepas)	Agente antifúngico	MICs (µg/mL)	S	SDD	R
<i>C. albicans</i> (3)	Itraconazol	1,5 ~ 4	-	-	3
	Fluconazol	64 ~ 96	-	-	3
	Cetoconazol	8 ~ 12	-	-	3
	Anfotericina B	0,19 ~ 0,25	3	-	-
<i>C. glabrata</i> (15)	Itraconazol	2 ~ 8	-	-	15
	Fluconazol	64 ~ 128	-	-	15
	Cetoconazol	8 ~ 16	-	-	15
	Anfotericina B	0,25 ~ 0,75	15	-	-
<i>C. parapsilosis</i> (11)	Itraconazol	0,38 ~ 0,75	-	9	2
	Fluconazol	4 ~ 16	6	3	2

	Cetoconazol	0,25 ~ 0,5	-	11	-
	Anfotericina B	0,75 ~ 1	11	-	-
<i>C. tropicalis</i> (4)	Itraconazol	1 ~ 2	-	-	4
	Fluconazol	64 ~ 96	-	-	4
	Cetoconazol	8 ~ 16	-	-	4
	Anfotericina B	0,75 ~ 1	4	-	-
<i>M. guilliermondii</i> (6)	Itraconazol	0,75 ~ 3	-	1	5
	Fluconazol	6 ~ 24	2	1	3
	Cetoconazol	0,094 ~ 1,5	2	3	1
	Anfotericina B	0,5 ~ 1	6	-	-
<i>M. caribbica</i> (2)	Itraconazol	1 ~ 2	-	-	2
	Fluconazol	64	-	-	2
	Cetoconazol	2	-	-	2
	Anfotericina B	1	2	-	-
<i>C. metapsilosis</i> (1)	Itraconazol	0,19	1	-	-
	Fluconazol	8	1	-	-
	Cetoconazol	0,19	1	-	-
	Anfotericina B	0,5	1	-	-
<i>S. cerevisiae</i> (1)	Itraconazol	1,5	-	-	1
	Fluconazol	64	-	-	1
	Cetoconazol	1	-	-	1
	Anfotericina B	1	1	-	-
<i>K. ohmeri</i> (1)	Itraconazol	0,5	-	1	-
	Fluconazol	24	-	1	-
	Cetoconazol	1	-	-	1
	Anfotericina B	0,25	1	-	-
<i>L. elongisporus</i> (1)	Itraconazol	0,38	-	1	-
	Fluconazol	1,5	1	-	-
	Cetoconazol	0,19	1	-	-
	Anfotericina B	0,094	1	-	-
CFAM 1467	Itraconazol	1,5	-	-	1
	Fluconazol	24	-	-	-
	Cetoconazol	0,50	-	1	-
	Anfotericina B	0,25	1	1	-
CFAM 1469	Itraconazol	1	-	-	1
	Fluconazol	96	-	-	1
	Cetoconazol	1	-	-	1
	Anfotericina B	0,094	1	-	-
C 23	Itraconazol	0,125	1	-	-
	Fluconazol	8	1	-	-
	Cetoconazol	0,125	1	-	-
	Anfotericina B	1	1	-	-

Legenda: S = sensível; SDD = sensível dose-dependente; R = resistente.

Ao analisarmos a tabela 2, verificamos que três espécies do gênero *Candida* demonstraram resistência a três dos antifúngicos testados, com exceção apenas de anfotericina B. Foram estas: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Dentre estas, todas as cepas testadas foram resistentes ao itraconazol, cetoconazol e fluconazol, demonstrando assim resistência a todos os antifúngicos do grupo azóis. Resultados

similares foram obtidos no estudo de Song et. al. (SONG *et al.*, 2015), onde todas as espécies *C. glabrata* foram resistentes ao itraconazol. Além disso, a variação da concentração inibitória mínima (MIC) de *C. glabrata* foi maior que a de *C. albicans*, acontecimento já relatado em outros estudos (SANITÁ *et al.*, 2013). Trabalhos têm reportado a baixa sensibilidade desta espécie aos antifúngicos azóis, especialmente ao fluconazol. Há, ainda, a possibilidade de desenvolver resistência antifúngica rapidamente em resposta à sua exposição aos azóis (BYUN *et al.*, 2018; JENSEN *et al.*, 2015; PFALLER *et al.*, 2003).

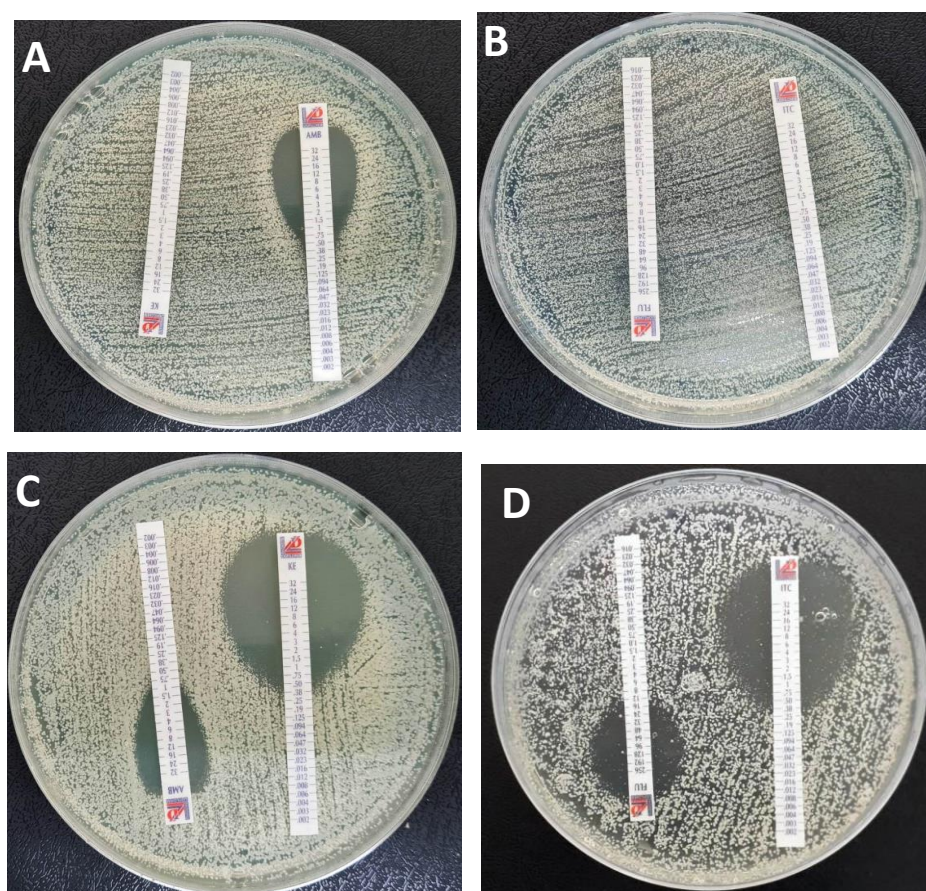


Figura 4 - Leitura da Concentração Inibitória Mínima (MIC) pelo método Etest. **A)** Etest com os antifúngicos anfotericina B (MIC de 0,50µg/mL) e resistência ao cetoconazol. **B)** presença de resistência aos antifúngicos itraconazol e fluconazol. **C)** concentrações inibitórias mínimas de 1 µg/mL e 0,50µg/mL aos antifúngicos anfotericina B e cetoconazol, respectivamente. **D)** valores MIC respectivos de 24 µg/mL e 0,50 µg/mL aos antifúngicos fluconazol e itraconazol.

Quadro 2 – Resultados da Concentração Inibitória Mínima (MIC) por grupo

Variáveis	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	Leveduras Clínicas n = 38 (%)	Leveduras Ambientais n = 10 (%)
Cetoconazol	0,094 - 16	0,19 - 2
S	2 (5.2)	2 (20.0)
SDD	9 (23.6)	5 (50.0)
R	27 (71.0)	3 (30.0)
Fluconazol	8 - 128	1,5 - 16
S	5 (13.1)	6 (60.0)
SDD	5 (13.1)	1 (10.0)
R	28 (73.7)	3 (30.0)
Itraconazol	0,125 - 8	0,19 - 0,75
S	1 (2.6)	1 (10.0)
SDD	8 (21.0)	4 (40.0)
R	29 (76.3)	5 (50.0)
Anfotericina B	0,094 - 1	0,094 - 1
S	38 (100.0)	10 (100.0)
R	-	-

Legenda: S = sensível; SDD = sensível dose-dependente; R = Resistente.

Ao analisarmos os resultados da Concentração Inibitória Mínima (MIC) por grupos distintos, de modo geral, o grupo de leveduras ambientais teve um perfil de susceptibilidade maior a todos os antifúngicos utilizados no Etest, quando comparadas às leveduras isoladas de amostras clínicas. Mais da metade dos isolados ambientais demonstraram sensibilidade: 70% foram sensíveis ou sensíveis dose-dependentes ao cetoconazol e fluconazol, com MIC variando de 0,19 a 2 $\mu\text{g/mL}$ e 1,5 a 16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; 50% demonstraram sensibilidade ou foram sensíveis dose-dependentes ao itraconazol, com concentração inibitória mínima variando de 0,19 a 0,75 $\mu\text{g/mL}$ e todas foram sensíveis a anfotericina B, com MIC de 0,094 a 1 $\mu\text{g/mL}$.

Quanto ao grupo de leveduras clínicas, todas estas também foram sensíveis ao antifúngico anfotericina B (100%), com variação da concentração inibitória mínima de 0,094 a 1 $\mu\text{g/mL}$, semelhante ao resultado obtido no grupo de amostras ambientais. Entretanto, para os outros antifúngicos, a quantidade de isolados sensíveis ou sensíveis dose-dependentes foi relativamente menor, diferenciando-as do grupo de leveduras ambientais. O itraconazol foi o antifúngico que menos inibiu o crescimento dentre os testados, com 76,3% de leveduras clínicas apresentando resistência. Para leveduras sensíveis ou sensíveis dose-dependentes a porcentagem foi 23,6% e o MIC obteve variação de 0,125 a 8 $\mu\text{g/mL}$. Para fluconazol, 73,7% dos isolados clínicos

foram resistentes e 26,3% demonstraram sensibilidade ou foram sensíveis dose-dependentes, com variação MIC de 8 a 128 µg/mL. Em seguida, está o antifúngico cetoconazol, com mais da metade das culturas clínicas apresentando resistência (71%), 29% apresentando sensibilidade ou sensível dose-dependente e variação da concentração inibitória mínima de 0,094 a 16 µg/mL.

Verificando o quadro 2, é possível perceber que as leveduras de origem ambiental sensíveis aos antifúngicos testados possuem uma variação da concentração inibitória mínima (MIC) menor, em relação ao grupo de leveduras clínicas (exceto para anfotericina B, onde o resultado foi igual para ambos os grupos). Pode-se perceber que, para essas leveduras especificamente, é necessária uma concentração menor de antifúngico para que ele funcione e iniba o crescimento desses microrganismos. Para os isolados clínicos, o MIC tem variação mais ampla, sendo necessária uma concentração maior do antifúngico para que o mesmo funcione. Tal situação pode ocorrer devido ao fato de que as pessoas acometidas com infecções ocasionadas por leveduras iniciam o tratamento com o antifúngico determinado para tal doença, entretanto o abandonam antes do período prescrito (PFALLER; DIEKEMA, 2004; ROBBINS et al., 2017). Isso pode levar os microrganismos a adquirirem maior resistência aos medicamentos, o que pode explicar também a porcentagem maior de leveduras clínicas resistentes nos testes realizados neste trabalho.

Dos antifúngicos estudados, fluconazol e itraconazol são os de uso clínico mais comum para tratamento de infecções, muitas vezes devido ao seu custo relativamente menor quando comparado aos outros grupos. Ambos são da classe dos azóis, antifúngicos que atuam inibindo a enzima lanosterol 14- α -esterol demetilase, fundamental na síntese de ergosterol, um componente fundamental da membrana plasmática fúngica. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho indicam que o antifúngico mais eficaz para tratamento de infecções que tenham leveduras como agentes etiológicos é anfotericina B, o qual inibiu o crescimento de 100% dos fungos testados, sendo este portanto um medicamento com bom custo-benefício e eficácia.

7. CONCLUSÃO

Nosso estudo confirmou através de identificação molecular que as leveduras *Candida não-albicans* foram predominantes em relação às *Candida albicans*, sendo a espécie *Candida glabrata* a mais frequente.

A grande maioria das leveduras testadas foi capaz de produzir ao menos uma enzima envolvida no processo de patogenicidade. Destacamos que mais da metade das leveduras de ambos os grupos, clínico e ambiental, obtiveram atividade hemolítica considerada muito forte. Essa característica também foi verificada para as proteases, onde a maior parte de leveduras proteases positivas tiveram atividade muito forte.

Candida glabrata e *Candida albicans* tiveram destaque nos resultados de produção enzimática, com resultados Pz muito fortes. Esses resultados podem inferir que essas espécies possuem maior probabilidade de causar infecções fúngicas no homem.

Dentre os antifúngicos testados, anfotericina B foi o mais eficaz, enquanto itraconazol foi o antifúngico com menor eficácia e maior porcentagem de resistência entre os isolados. Além disso, todos os azóis (fluconazol, itraconazol, cetoconazol) tiveram uma grande porcentagem de resistência por parte das leveduras.

As leveduras provenientes de amostras ambientais mostraram uma variação de concentração inibitória mínima menor em relação aos isolados clínicos. Também obtiveram perfil de susceptibilidade maior aos antifúngicos.

Candida albicans, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* mostraram resistência a todos os antifúngicos do grupo azóis.

Não houve diferença estatística significativa entre a produção de fatores de virulência de leveduras clínicas e ambientais. Portanto, ressalta-se a necessidade de que mais estudos acerca da produção enzimática e perfil de sensibilidade a antifúngicos de microrganismos ambientais sejam realizados, de maneira a conhecer seu perfil de virulência e capacidade de causar doenças no homem.

8. REFERÊNCIAS

ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. **British Journal of Haematology**, v. 166, n. 4, p. 471–484, ago. 2014. <https://doi.org/10.1111/bjh.12896>.

ALENCAR, C. **Condições de saúde bucal de uma população idosa em uma comunidade rural do Amazonas**. 2017. 2017.

AL-OBAID, K.; AHMAD, S.; JOSEPH, L.; KHAN, Z. Lodderomyces elongisporus: a bloodstream pathogen of greater clinical significance. **New Microbes and New Infections**, v. 26, p. 20–24, nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.07.004>.

ALVES, I. A.; CAMARGO, F. P. de; GOULART, L. S. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de Candida sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 575–579, out. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000500021>.

AMORIM, E. L. D. **Fatores de virulência de Candida spp. isoladas da cavidade bucal de crianças infectadas pelo HIV**. 2014. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

ANDREOLA, P.; DEMATHÉ, A.; GALAFASSI, D.; ELSEMANN, E. B.; ELSEMANN, R. B.; GAZZONI, A. F. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero Candida isoladas a partir de infecções de cavidade oral. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 45, n. 4, p. 219–226, 1 set. 2016. <https://doi.org/10.1590/1807-2577.26115>.

BAUMGARTNER, C.; FREYDIERE, A. M.; GILLE, Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using albicans ID and CHROMagar Candida plates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 454–456, fev. 1996. .

BIANCHI, C. M. P. de C.; BIANCHI, H. A.; TADANO, T.; PAULA, C. R. de; HOFFMANN-SANTOS, H. D.; LEITE, D. P.; HAHN, R. C. FACTORS RELATED TO ORAL CANDIDIASIS IN ELDERLY USERS AND NON-USERS OF REMOVABLE DENTAL PROSTHESES. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 58, p. 17, 2016. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658017>.

BIEDUNKIEWICZ, A.; GÓRALSKA, K. Microfungi Potentially Pathogenic for Humans Reported in Surface Waters Utilized for Recreation: Water. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 44, n. 6, p. 599–609, jun. 2016. <https://doi.org/10.1002/clen.201500696>.

BRANDÃO, L. R.; LIBKIND, D.; VAZ, A. B. M.; ESPÍRITO SANTO, L. C.; MOLINÉ, M.; DE GARCÍA, V.; VAN BROOCK, M.; ROSA, C. A. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. **FEMS microbiology ecology**, v. 76, n. 1, p. 1–13, abr. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01030.x>.

BRANDÃO, L. R.; MEDEIROS, A. O.; DUARTE, M. C.; BARBOSA, A. C.; ROSA, C. A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts isolated by multiple-tube

fermentation from three freshwater lakes in Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 8, n. 2, p. 279–289, jun. 2010. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.170>.

BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; SAMPAIO, C. M. S.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; TEIXEIRA, C. E. C.; ALENCAR, L. P. de; BANDEIRA, T. J. P. G.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; PEREIRA-NETO, W. A.; SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B.; ROCHA, M. F. G.; BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; SAMPAIO, C. M. S.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; TEIXEIRA, C. E. C.; ALENCAR, L. P. de; ... ROCHA, M. F. G. Azole resistance in *Candida* spp. isolated from Catú Lake, Ceará, Brazil: an efflux-pump-mediated mechanism. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 33–38, mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.008>.

BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; SAMPAIO, C. M. S.; TEIXEIRA, C. E. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; LEITE, J. J. G.; MOREIRA, C. A.; SILVA, L. P.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Yeasts from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp.: Yeasts from wild and captive *M. amazonicum*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 2, p. 268–277, maio 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01050.x>.

BYUN, S. A.; WON, E. J.; KIM, M.-N.; LEE, W. G.; LEE, K.; LEE, H. S.; UH, Y.; HEALEY, K. R.; PERLIN, D. S.; CHOI, M. J.; KIM, S. H.; SHIN, J. H. Multilocus Sequence Typing (MLST) Genotypes of *Candida glabrata* Bloodstream Isolates in Korea: Association With Antifungal Resistance, Mutations in Mismatch Repair Gene (*Msh2*), and Clinical Outcomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1523, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01523>.

CENDEJAS-BUENO, E.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Identification of Pathogenic Rare Yeast Species in Clinical Samples: Comparison between Phenotypical and Molecular Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1895–1899, 1 maio 2010. <https://doi.org/10.1128/JCM.00336-10>.

CIUREA, C. N.; KOSOVSKI, I.-B.; MARE, A. D.; TOMA, F.; PINTEA-SIMON, I. A.; MAN, A. *Candida* and Candidiasis-Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, 6 jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060857>.

CORNET, M.; SENDID, B.; FRADIN, C.; GAILLARDIN, C.; POULAIN, D.; NGUYEN, H.-V. Molecular Identification of Closely Related *Candida* Species Using Two Ribosomal Intergenic Spacer Fingerprinting Methods. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 13, n. 1, p. 12–22, jan. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.11.014>.

DE OLIVEIRA SANTOS, G. C.; VASCONCELOS, C. C.; LOPES, A. J. O.; DE SOUSA CARTÁGENES, M. do S.; FILHO, A. K. D. B.; DO NASCIMENTO, F. R. F.; RAMOS, R. M.; PIRES, E. R. R. B.; DE ANDRADE, M. S.; ROCHA, F. M. G.; DE ANDRADE MONTEIRO, C. *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1351, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01351>.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal Biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 5 abr. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>.

HATA, D. J.; HALL, L.; FOTHERGILL, A. W.; LARONE, D. H.; WENGENACK, N. L. Multicenter Evaluation of the New VITEK 2 Advanced Colorimetric Yeast Identification Card. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1087–1092, 1 abr. 2007. <https://doi.org/10.1128/JCM.01754-06>.

IWEN, P. C.; HINRICHS, S. H.; RUPP, M. E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. **Medical Mycology**, v. 40, n. 1, p. 87–109, jan. 2002. <https://doi.org/10.1080/mmy.40.1.87.109>.

JAMES, S. A.; COLLINS, M. D.; ROBERTS, I. N. The genetic relationship of *Lodderomyces elongisporus* to other ascomycete yeast species as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 308–311, nov. 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1994.tb00462.x>.

JENSEN, R. H.; JOHANSEN, H. K.; SØES, L. M.; LEMMING, L. E.; ROSENVINGE, F. S.; NIELSEN, L.; OLESEN, B.; KRISTENSEN, L.; DZAJIC, E.; ASTVAD, K. M. T.; ARENDRUP, M. C. Posttreatment Antifungal Resistance among Colonizing *Candida* Isolates in Candidemia Patients: Results from a Systematic Multicenter Study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1500–1508, 28 dez. 2015. <https://doi.org/10.1128/AAC.01763-15>.

KOEHLER, A. P.; CHU, K. C.; HOUANG, E. T.; CHENG, A. F. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 422–426, fev. 1999. .

KULESZA, K.; BIEDUNKIEWICZ, A.; NOWACKA, K.; GLINKA, P. Potentially pathogenic fungi of the *Candida* genus isolated from the Łyna River – a 20-year study. **Annals of Parasitology**, v. 64, n. 3, p. 217–223, 2018. <https://doi.org/10.17420/ap6403.155>.

KWAMIN, F.; NARTEY, N. O.; CODJOE, F. S.; NEWMAN, M. J. Distribution of *Candida* species among HIV-positive patients with oropharyngeal candidiasis in Accra, Ghana. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, n. 01, p. 041–045, 15 jan. 2013. <https://doi.org/10.3855/jidc.2442>.

LACAZ, Carlos da Silva; PORTO, Edward; MARTINS, José Eduardo Costa; HEINS-VACCARI, Elisabeth Maria; MELO, Natalina Takahashi de. Tratado de micologia médica Lacaz. [S.l.: s.n.], 2002.

LATOUCHE, G. N.; DANIEL, H. M.; LEE, O. C.; MITCHELL, T. G.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 12, p. 3171–3180, dez. 1997. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.12.3171-3180.1997>.

LEAW, S. N.; CHANG, H. C.; SUN, H. F.; BARTON, R.; BOUCHARA, J.-P.; CHANG, T. C. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the

internal transcribed spacer regions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 693–699, mar. 2006. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.693-699.2006>.

LEITE, D. P.; PIVA, M. R.; MARTINS-FILHO, P. R. S. Identificação das espécies de *Candida* em portadores de estomatite protética e avaliação da susceptibilidade ao miconazol e à terapia fotodinâmica. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 44, p. 12–17, fev. 2015. <https://doi.org/10.1590/1807-2577.1027>.

LEW, S.; LEW, M.; BIEDUNKIEWICZ, A.; SZAREK, J. Impact of Pesticide Contamination on Aquatic Microorganism Populations in the Littoral Zone. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, n. 3, p. 399–409, abr. 2013. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9852-6>.

LEWIS, M. a. O.; WILLIAMS, D. W. Diagnosis and management of oral candidosis. **British Dental Journal**, v. 223, n. 9, p. 675–681, 10 nov. 2017. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.886>.

LI, Y.; SUN, L.; LU, C.; GONG, Y.; LI, M.; SUN, S. Promising Antifungal Targets Against *Candida albicans* Based on Ion Homeostasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 286, 2018. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00286>.

LINARES, C. E. B.; LORETO, É. S. de; SILVEIRA, C. P.; POZZATTI, P.; SCHEID, L. A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 203–206, ago. 2007. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652007000400001>.

LIONAKIS, M. S.; NETEA, M. G. *Candida* and Host Determinants of Susceptibility to Invasive Candidiasis. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003079, 3 jan. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003079>.

MAGALHÃES, Y. C.; BOMFIM, M. R. Q.; MELÔNIO, L. C.; RIBEIRO, P. C. S.; COSME, L. M.; RHODEN, C. R.; MARQUES, S. G. Clinical significance of the isolation of *Candida* species from hospitalized patients. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 46, n. 1, p. 117–123, mar. 2015. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120120296>.

MAHGOUB, S.; ABDELBASIT, H.; ABDELFATTAH, H.; HAMED, S. Monitoring phenol degrading *Candida* and bacterial pathogens in sewage treatment plant. **Desalination and Water Treatment**, v. 54, n. 8, p. 2059–2066, 22 maio 2015. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.933627>.

MEDEIROS, A. O.; KOHLER, L. M.; HAMDAN, J. S.; MISSAGIA, B. S.; BARBOSA, F. A. R.; ROSA, C. A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. **Water Research**, v. 42, n. 14, p. 3921–3929, ago. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.05.026>.

MEDEIROS, A. O.; MISSAGIA, B. S.; BRANDÃO, L. R.; CALLISTO, M.; BARBOSA, F. A. R.; ROSA, C. A. Water quality and diversity of yeasts from tropical lakes and rivers from the Rio Doce basin in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 43, n. 4,

p. 1582–1594, out. 2012. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120004000043>.

MOHANDAS, V.; BALLAL, M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 4–8, jan. 2011. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.77288>.

MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B.; WORM, B. How many species are there on Earth and in the ocean? **PLoS biology**, v. 9, n. 8, p. e1001127, ago. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>.

MOYES, D. L.; RICHARDSON, J. P.; NAGLIK, J. R. *Candida albicans*- epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 338–346, 19 maio 2015. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1012981>.

NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T. I. E.; PAULA, C. R.; OLIVEIRA, R. Correlation between Etest, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of *Candida* species from infection and colonization. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, n. 5, p. 324–330, 2009. <https://doi.org/10.1002/jcla.20337>.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, jun. 2003. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(03\)00117-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00117-3).

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; SCHUSTER, M. G.; VAZQUEZ, J. A.; WALSH, T. J.; ZAOUTIS, T. E.; SOBEL, J. D. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 62, n. 4, p. e1-50, 15 fev. 2016. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>.

PAUL, S.; KANNAN, I. Molecular identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species isolated from HIV infected Patients with candidiasis. **Current Medical Mycology**, v. 5, n. 1, p. 21–26, mar. 2019. <https://doi.org/10.18502/cmm.5.1.533>.

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, set. 2017. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.46>.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2176–2179, maio 2003. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2176-2179.2003>.

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, out. 2004.

<https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4419-4431.2004>.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7–14, mar. 1982. <https://doi.org/10.1080/00362178285380031>.

REVIE, N. M.; IYER, K. R.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70–76, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.005>.

ROSSONI, R. D.; BARBOSA, J. O.; VILELA, S. F. G.; JORGE, A. O. C.; JUNQUEIRA, J. C. Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-*albicans* *Candida* species. **Brazilian Oral Research**, v. 27, n. 6, p. 484–489, dez. 2013. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242013000600007>.

RUTHERFORD, J. C. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004062, 15 maio 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004062>.

SAHAL, G.; BILKAY, I. S. Distribution of clinical isolates of *Candida* spp. and antifungal susceptibility of high biofilm-forming *Candida* isolates. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 51, n. 5, p. 644–650, out. 2018. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0136-2018>.

SANITÁ, P. V.; MIMA, E. G. de O.; PAVARINA, A. C.; JORGE, J. H.; MACHADO, A. L.; VERGANI, C. E. Susceptibility profile of a Brazilian yeast stock collection of *Candida* species isolated from subjects with *Candida*-associated denture stomatitis with or without diabetes. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 116, n. 5, p. 562–569, nov. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2013.07.002>.

SEYOUM, E.; BITEW, A.; MIHRET, A. Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species isolated in different clinical samples and their in vitro antifungal susceptibility profile in Ethiopia. **BMC infectious diseases**, v. 20, n. 1, p. 231, 19 mar. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4883-5>.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

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

SILVA, D. M. da; SOUZA, T. C. de; ALENCAR, C. F. de C.; SOUZA, I. da S. de; BANDEIRA, M. F. C. L.; FERNANDES, O. C. C.; SILVA, D. M. da; SOUZA, T. C. de; ALENCAR, C. F. de C.; SOUZA, I. da S. de; BANDEIRA, M. F. C. L.; FERNANDES, O. C. C. Virulence factors of *Candida* species from the oral mucosa and prostheses of elderly people from a riverside community in the Amazon state, Brazil. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 48, 2019. DOI 10.1590/1807-2577.09419. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1807-25772019000100442&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 19 jun. 2020.

SINGH, D. K.; NÉMETH, T.; PAPP, A.; TÓTH, R.; LUKÁCSI, S.; HEIDINGSFELD, O.; DOSTAL, J.; VÁGVÖLGYI, C.; BAJTAY, Z.; JÓZSI, M.; GÁCSEK, A. Functional Characterization of Secreted Aspartyl Proteases in *Candida parapsilosis*. **mSphere**, v. 4, n. 4, 21 2019. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00484-19>.

SONG, Y. B.; SUH, M. K.; HA, G. Y.; KIM, H. Antifungal Susceptibility Testing with Etest for *Candida* Species Isolated from Patients with Oral Candidiasis. **Annals of Dermatology**, v. 27, n. 6, p. 715, 2015. <https://doi.org/10.5021/ad.2015.27.6.715>.

TAEI, M.; CHADEGANIPOUR, M.; MOHAMMADI, R. An alarming rise of non-albicans *Candida* species and uncommon yeasts in the clinical samples; a combination of various molecular techniques for identification of etiologic agents. **BMC research notes**, v. 12, n. 1, p. 779, 29 nov. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4811-1>.

TAMURA, N. K.; NEGRI, M. F. N.; BONASSOLI, L. A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91–93, fev. 2007. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000100021>.

TAVERNA, C. G.; BOSCO-BORGEAT, M. E.; MURISENGO, O. A.; DAVEL, G.; BOITÉ, M. C.; CUPOLILLO, E.; CANTEROS, C. E. Comparative analyses of classical phenotypic method and ribosomal RNA gene sequencing for identification of medically relevant *Candida* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 2, p. 178–185, abr. 2013. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108022013009>.

VIEIRA, F.; NASCIMENTO, T. Resistência a Fármacos Antifúngicos por *Candida* e Abordagem Terapêutica. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, , p. 8, 2017. .

ZAVREL, M.; WHITE, T. C. Medically important fungi respond to azole drugs: an update. **Future Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1355–1373, ago. 2015. <https://doi.org/10.2217/FMB.15.47>.