

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA
EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA
EM DOENÇAS INFECCIOSAS

LEONARDO SILVA BARBEDO

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES
APLICADOS AO COMPLEXO *Candida parapsilosis***

Rio de Janeiro

2015

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS AO COMPLEXO *Candida parapsilosis*

LEONARDO SILVA BARBEDO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Dr.^a Rosely M.^a Zancopé Oliveira.
Dr. Mauro de Medeiros Muniz

Rio de Janeiro

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B233 Barbedo, Leonardo Silva

Comparação de métodos moleculares aplicados ao complexo
Candida parapsilosis / Leonardo Silva Barbedo. – Rio de Janeiro, 2015.

xix, 181 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro
Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas,
2015.

Bibliografia: f. 91-116

1. Complexo Candida parapsilosis. 2. C. parapsilosis stricto sensu. 3.
C. orthopsilosis. 4. C. metapsilosis. 5. Candidemia. 6. Métodos
moleculares. I. Título

CDD 616.969

LEONARDO SILVA BARBEDO

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES
APLICADOS AO COMPLEXO *Candida parapsilosis***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Dr.^a Rosely Maria Zancopé Oliveira
Dr. Mauro de Medeiros Muniz

Aprovada em 16/01/2015

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rodrigo de Almeida Paes (Presidente)
INI-Fiocruz

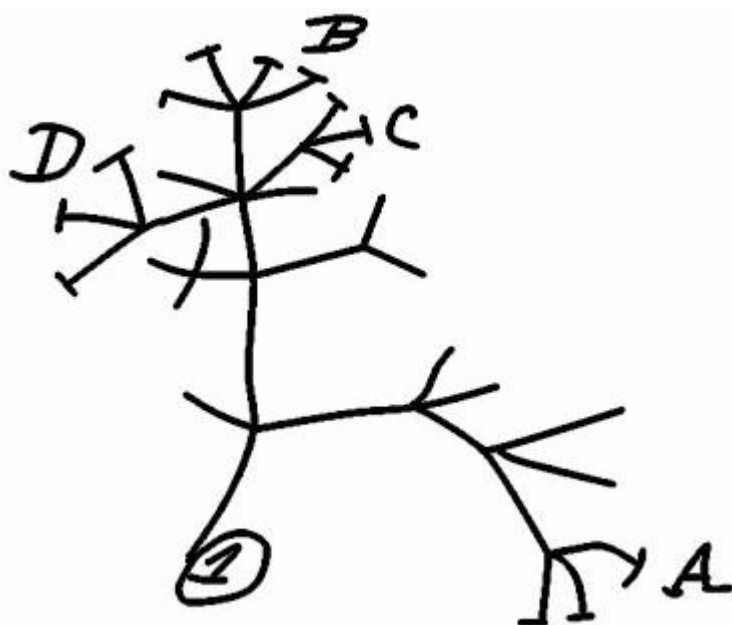
Dr.^a Diana Bridon da Graça Sgarbi
UFF

Dr. André Luis Souza dos Santos
UFRJ

Dr.^a Maria Clara Gutierrez Galhardo
INI-Fiocruz

Dr.^a Luciana Trilles
INI-Fiocruz

Dedico este trabalho a minha mãe, que esteve, está, e sei que sempre estará ao meu lado, pois tudo o que sou devo a ela.



Árvore da vida (1837).
“Princípio da divergência”.
Charles Darwin.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Dr.^a Rosely Maria Zancopé Oliveira, pela oportunidade e confiança depositada, que mesmo sem conhecer-me, proporcionou a realização deste trabalho.

Ao meu estimado co-orientador Dr. Mauro de Medeiros Muniz, pela atenção e constante apoio.

Às professoras Dr.^a Célia Pais e Dr.^a Paula Sampaio, pelas orientações na colaboração internacional quando na Universidade do Minho, Braga, Portugal.

À Dr.^a Lucimar Ferreira Kneipp, que acompanhou a evolução deste trabalho nos seminários e qualificação. Obrigado pelas críticas e sugestões.

Ao meu revisor Dr. Rodrigo de Almeida Paes, pelas inúmeras dicas e correções.

À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fomento empregado.

À plataforma de sequenciamento de DNA – RPT01A, PDTIS/Fiocruz, pela execução dos sequenciamentos envolvidos neste trabalho.

À minha amiga Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho, pela colaboração direta neste trabalho. Obrigado por sua disponibilidade e ajuda.

À Dr.^a Raquel de Vasconcellos Carvalhães de Oliveira, pelo auxílio na análise estatística.

Aos colaboradores do Laboratório de Micologia, Setor de Imunodiagnóstico (INI-Fiocruz), Dr.^a Cláudia Vera Pizzini, Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira, Marcos de Abreu Almeida, Fernando Almeida da Silva, Carolina Nascimento de Sousa, Luã Cardoso de Oliveira e Victor Fernandes Tatagiba, todos sempre prestativos e atenciosos.

As colaboradoras do Laboratório de Microbiologia 2, do Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA), Departamento de Biologia, Escola de Ciências da Universidade do Minho, Braga, Portugal, Catarina Vaz, Joana Pereira, Catarina Carneiro e Filipa Valle, pelo auxílio e disponibilidade.

À Ana Paula Pereira dos Santos, por estar sempre a meu lado durante todo o período do curso.

Aos professores e colegas das turmas de Mestrado/Doutorado do curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, pelos momentos compartilhados.

E a todos que de algum modo contribuíram para a realização desse trabalho.

Barbedo, L. S. **Comparação de métodos moleculares aplicados ao complexo *Candida parapsilosis***. Rio de Janeiro, 2015. 181 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

Dentre as espécies de *Candida não-albicans*, *Candida parapsilosis* emergiu nas últimas décadas em todo o globo como relevante patógeno nosocomial em infecções fúngicas invasivas com disseminação hematogênica. Em alguns hospitais, *C. parapsilosis* tem se tornado a espécie predominante em candidemias, e a mais frequente em fungemias em adultos e recém-nascidos com o uso frequente de cateteres e nutrição parenteral. Desde 2005, baseado na técnica de tipagem por sequenciamento de *multilocus* (MLST), *C. parapsilosis* é considerado um complexo de leveduras formado por três diferentes espécies, onde *C. parapsilosis lato sensu* inclui as espécies *Candida parapsilosis stricto sensu*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*. Até o presente, só é possível distinguir essas três espécies por técnicas de biologia molecular. Com isso, o objetivo deste trabalho foi comparar o sequenciamento da região D1/D2 da sub-unidade maior 28S do gene do DNA ribossomal (rDNA), com a PCR utilizando *primers* espécie-específicos, a PCR-RFLP da região ITS1-5.8S-ITS2 e a análise de microsatélites (CP1, CP4a, CP6 e B), com a finalidade de se estabelecer uma identificação correta dos isolados de *C. parapsilosis lato sensu*. Um total de 100 isolados, oriundos de amostras de sangue e cateter, obtidos de pacientes de três hospitais no município do Rio de Janeiro, entre 1998 e 2006, associados a episódios de fungemia, foram analisados. O sequenciamento da região D1/D2 revelou 61 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu*, 37 de *C. orthopsilosis* e 2 de *C. metapsilosis*. A PCR espécie-específica e a PCR-RFLP mostraram 59 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu*, 39 de *C. orthopsilosis* e 2 de *C. metapsilosis*. A técnica de tipagem pelos microsatélites revelou 58 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* que amplificaram para os quatro marcadores, enquanto que três isolados não amplificaram apenas para o marcador CP4a, mas foram considerados como *C. parapsilosis stricto sensu* por amplificarem para os marcadores CP1, CP6 e B. Assim, o coeficiente Kappa entre a PCR espécie-específica ou a PCR-RFLP com o sequenciamento da região D1/D2 foi de 0,96; enquanto que o coeficiente para a metodologia dos microsatélites com o sequenciamento da região D1/D2, para os isolados de *C. parapsilosis stricto sensu*, encontramos Kappa = 1. Em dois pacientes identificamos *C. parapsilosis stricto sensu* oriunda do cateter e *C. orthopsilosis* oriunda do sangue, porém ambas coletadas no mesmo dia, assim, revelando infecção polifúngica. A metodologia dos microsatélites identificou 39 genótipos em *multilocus*, mostrando que nos 61 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* havia estirpes idênticas, diferentes e casos de microvariação. Nos casos de estirpes idênticas, encontramos duas situações: (i) isolados provenientes do mesmo paciente coletados com menos de três meses de diferença, sugerindo uma manutenção da estirpe e; (ii) isolados coletados tanto da amostra de sangue quanto de cateter do mesmo paciente, na mesma data, demonstrando que o cateter poderia ser a provável origem da infecção sistêmica. Já nos casos de presença de estirpes distintas, isoladas de um mesmo paciente, coletadas com mais de três meses de diferença, sugere uma substituição da estirpe. Por fim, nos casos de microvariação, encontramos em isolados do mesmo paciente coletados no mesmo momento, em ambas amostras (sangue e cateter) pontuando de maneira contundente, pela robustez da metodologia empregada (microsatélites), microevolução em tais isolados. Este estudo reforça a importância da correta identificação de espécies, dos cuidados na manipulação do cateter, e da constante vigilância e monitoramento do ambiente hospitalar para identificar possíveis permanências de estirpes e suas rotas de transmissão.

Palavras-chave: 1. Complexo *Candida parapsilosis*. 2. *C. parapsilosis stricto sensu*. 3. *C. orthopsilosis*. 4. *C. metapsilosis*. 5. Candidemia. 6. Métodos moleculares.

Barbedo, L. S. **Comparison of molecular methods applied to *Candida parapsilosis* complex**. Rio de Janeiro, 2015. 181 f. Thesis [PhD in Clinic Research in Infectious Diseases] – Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases.

ABSTRACT

Among non-*albicans* *Candida* species, *Candida parapsilosis* have emerged in recent decades across the globe as an important nosocomial pathogen in invasive fungal infections with hematogenous dissemination. In some hospitals, *C. parapsilosis* has become the predominant species in candidemias, and the most frequent agent of fungemia in adults and newborns in use of catheters and parenteral nutrition. Since 2005, based on the *multilocus* sequence typing (MLST), *C. parapsilosis* is considered a complex consisting of three different yeast species, where *C. parapsilosis* sensu lato includes the species *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. So far, it is only possible to distinguish these three species by molecular techniques. Thus, the aim of this study was to compare the sequencing of the D1/D2 region of the large subunit of the 28S ribosomal DNA (rDNA) gene, with the PCR using species-specific primers, the PCR-RFLP of the region ITS1-5.8S-ITS2 and the microsatellites (CP1, CP4a, CP6 and B) analysis, in order to establish a correct identification of *C. parapsilosis* sensu lato isolates. A total of 100 isolates, from catheter and blood samples, obtained from patients in three hospitals in the city of Rio de Janeiro between 1998 and 2006, associated with episodes of fungemia, were analyzed. The sequencing revealed 61 *C. parapsilosis* sensu stricto isolates, 37 *C. orthopsilosis* and 2 *C. metapsilosis*. The species-specific PCR and the PCR-RFLP showed 59 *C. parapsilosis* sensu stricto isolates, 39 *C. orthopsilosis* and 2 *C. metapsilosis*. The microsatellite typing technique revealed 58 *C. parapsilosis* sensu stricto isolates that amplified for all markers, while three isolates did not amplify for CP4a marker, but were considered *C. parapsilosis* sensu stricto by amplifying for CP1, CP6 and B markers. Thus, the Kappa coefficient between species-specific PCR or PCR-RFLP with the sequencing of the D1/D2 region was 0,96; while the coefficient for microsatellites with the sequencing of the D1/D2 region, to *C. parapsilosis* sensu stricto isolates, was Kappa = 1. In two patients we identified *C. parapsilosis* sensu stricto from catheter and *C. orthopsilosis* from blood, both collected on the same day, revealing polyfungal infections. Microsatellite markers identified 39 *multilocus* genotypes, showing that the 61 *C. parapsilosis* sensu stricto isolates were identical, different and microvariations strains. In cases of identical strains, we found two situations: (i) isolates from the same patient collected at least three months apart, suggesting maintenance of the strain; (ii) isolates collected on the same day for the blood and catheter samples from the same patient, demonstrating that the catheter could be the likely source of systemic infection. On the other hand, in cases of distinct strains, isolates from the same patient, collected with more than three months apart, suggesting replacement of the strain. Finally, in the microvariations cases, we found isolates from the same patient collected on the same time, in both samples (blood and catheter) pointing a blow to, the robustness of the methodology employed (microsatellites), microevolution in such isolates. This study reinforces the importance of correct species identification, care in catheter manipulation, and constant surveillance and hospital environment monitoring to identify possible permanence of strains and their transmission routes.

Keywords: 1. *Candida parapsilosis* complex. 2. *C. parapsilosis* sensu stricto. 3. *C. orthopsilosis*. 4. *C. metapsilosis*. 5. Candidemia. 6. Microsatellites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Esquema em quatro estágios no processo colonização/infecção das espécies de <i>Candida</i> .	21
Figura 2-	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019.	25
Figura 3-	Esquema geral de metodologia.	44
Figura 4-	Macromorfologia do cultivo em agar Sabouraud dextrose por 72 horas a 35°C. Representativo com dois diferentes isolados.	54
Figura 5-	Chromagar [®] <i>Candida</i> de 72 horas a 35°C. Cepas ATCCs: <i>C. parapsilosis</i> 22019, <i>C. orthopsilosis</i> 96141 e <i>C. metapsilosis</i> 96143; e três diferentes isolados: 24775HSE, 25381HSE e 25011112911SAM	54
Figura 6-	Dendrograma baseado na análise da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal de 104 táxons (100 isolados, três cepas ATCCs e uma sequência oriunda do GenBank, <i>C. albicans</i> ATCC 18804).	57
Figura 7-	Alinhamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal das cepas ATCCs <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> e <i>C. metapsilosis</i> .	58
Figura 8-	Eletroforese dos produtos da PCR com os <i>primers</i> espécies-específicos após amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA em gel de agarose.	59
Figura 9-	Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR com os <i>primers</i> ITS1 e ITS4 (ITS1-5.8S-ITS2) após ação enzimática das enzimas de restrição <i>Sau96I</i> e <i>HhaI</i> .	60
Figura 10-	Representativo de diferentes perfis gerados pelo programa GeneScan versão 3.7 na análise em <i>multilocus</i> dos microsátélites nos isolados de <i>C. parapsilosis stricto sensu</i> .	61

- Figura 11- Comparativo entre perfis de dois isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* gerados pelo programa GeneScan versão 3.7 na análise em *multilocus* dos microsátélites oriundos de mesmo paciente. 62
- Figura 12- Dendrograma baseado na análise dos genótipos em *multilocus* para os microsátélites dos 61 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* mais a cepa de referência ATCC 22019. 65
- Figura 13- Dendrograma baseado na análise da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do DNA ribossomal de 6 táxons (isolados 28352HSE e 28287HSE mais quatro sequências de cepas ATCCs oriundas do GenBank). 67
- Figura 14- Alinhamento da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do DNA ribossomal dos isolados 28352HSE e 28287HSE e da cepa ATCC 22019 oriunda do GenBank. 68

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1- *Primers* espécie-específicos utilizados para discriminação molecular do complexo *psilosis* tendo como alvo a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. 49
- Quadro 2- *Primers* utilizados nos isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* na tipagem pelos microsátélites. 51
- Tabela 1- Caracterização bioquímica dos 100 isolados de *C. parapsilosis* oriundos de amostras de sangue e cateter de pacientes com fungemia internados em três hospitais no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006. 55
- Tabela 2- Características dos Microsátélites obtidas dos 61 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu*. 63
- Tabela 3- Resultados dos microsátélites em relação aos diferentes isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* quando do mesmo paciente. 66
- Tabela 4- Distribuição quanto aos três diferentes hospitais do município do Rio de Janeiro e o número de isolados do complexo *C. parapsilosis* de acordo com os resultados do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal. 69
- Tabela 5- Distribuição quanto à origem e o número de isolados do complexo *C. parapsilosis* de acordo com os resultados do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal. 70

Tabela 6-	Distribuição quanto ao sexo dos pacientes do HSE (41 pacientes) e SAM (3 pacientes) e os resultados do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal.	70
Tabela 7-	Comparativo entre os resultados do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal e os resultados da PCR espécie-específica.	71
Tabela 8-	Comparativo entre os resultados do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal e os resultados da PCR-RFLP.	72
Tabela 9-	Comparativo entre os resultados do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal e os resultados dos microsátélites.	73
Tabela 10-	Relação entre os diferentes isolados de um mesmo paciente quando diferentes espécies são encontradas utilizando os resultados combinados do sequenciamento da região D1/D2 do rDNA e os resultados dos microsátélites.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18S rDNA	<i>Small-subunit (SSU) rDNA</i> (Subunidade menor do DNA ribossomal)
28S rDNA	<i>Large-subunit (LSU) rDNA</i> (Subunidade maior do DNA ribossomal)
ACPL	<i>Pro-acid Protease</i> (sinônimo de SAPP1) (Aspártico-proteinase secretada tipo 1)
ACPR	<i>Pro-acid Protease</i> (sinônimo de SAPP2) (Aspártico-proteinase secretada tipo 2)
ACT1	<i>Actin</i> (Actina)
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphisms</i> (Polimorfismo de comprimento nos fragmentos amplificados)
ALS	<i>Agglutinin-Like Sequence</i> (Adesinas)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de culturas tipo americana)
B	Marcador para o microsatélite dinucleotídeo “CA” de <i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de cérebro e coração)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBMA	Centro de Biologia Molecular e Ambiental
COX3	<i>Cytochrome Oxidase Subunit 3</i> (Citocromo oxidase subunidade 3)
CP1	Marcador para o microsatélite trinucleotídeo “AAG” de <i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
CP4a	Marcador para o microsatélite trinucleotídeo “AAC” de <i>C. parapsilosis stricto sensu</i>

CP6	Marcador para o microsatélite trinucleotídeo “AAC” para <i>C. parapsilosis stricto sensu</i>
D1/D2	<i>Divergent domains 1 and 2</i> (Domínios divergentes 1 e 2)
dATP	<i>Deoxyadenosine triphosphate</i> (Deoxi-adenosina trifosfato)
dCTP	<i>Deoxycytidine triphosphate</i> (Deoxi-citosina trifosfato)
dGTP	<i>Deoxyguanosine triphosphate</i> (Deoxi-guanidina trifosfato)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i> (Deoxi-nucleotídeo trifosfato)
dTTP	<i>Deoxythymidine triphosphate</i> (Deoxi-timidina trifosfato)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetraacético)
EF2	<i>Elongation factor 2</i> (Fator de alongamento 2)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
FAM	<i>6-carboxyfluorescein</i> (6-carboxifluoresceína)
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FKS1	<i>FK506 Sensitivity</i> (sinônimo de GSC1, <i>Glucan Synthase Catalitic 1</i>) (Subunidade catalítica 1 glucana sintase)
GAL1	<i>Galactokinase</i> (Galactoquinase)
Genepop	<i>Population genetics software package</i> (Programa de Genética de Populações)
HEX	<i>6-carboxyhexafluorescein</i> (6-carboxihexafluoresceína)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
HSE	Hospital Servidores do Estado
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IC	Intervalo de confiança

IFF/HYR	<i>IPF (Individual Protein File) Family F / Hyphally Upregulated Protein</i> (Proteína reguladora hifálica)
IgG	Imunoglobulina G
IGS1	<i>Intergenic Spacer 1</i> (Espaço intergênico 1)
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espaço transcrito interno)
JEN	“Família de genes transportadores monocarboxílicos”
L1A1	<i>Lanosterol-alpha-demethylase</i> (Lanosterol alfa-demetilase)
LAMP	<i>Loop-mediated Isothermal Amplification</i> (Amplificação isothermal mediada por <i>loop</i>)
LIP2	<i>Lipase 2</i> (Lipase tipo 2)
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight mass spectrometry</i> (Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz)
MAT	<i>Mating-type</i> (Tipo conjugante sexuado)
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> (Análise genética molecular evolutiva)
MG	<i>Multilocus Genotype</i> (Genótipo em multilócus)
MnSOD	<i>Manganese Superoxide Dismutase</i> (Manganês-SOD)
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i> (Tipagem por múltiplas sequências)
MTL	<i>Mating-type-like</i> (Tipo conjugante sexuado)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)
NTSYSpc	<i>Numerical Taxonomy System for personal computer</i> (Sistema de taxonomia numérica para o computador pessoal)
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)

PD	poder discriminatório
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> (Agar batata dextrose)
PDSE	Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (DNA polimórfico amplificado ao acaso)
rDNA	<i>Ribosomal Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico ribossomal)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de comprimento nos fragmentos de restrição)
RNAse	Ribonuclease
RPB1	<i>RNA polymerase B subunit 1</i> (RNA polimerase B subunidade 1)
RPB2	<i>RNA polymerase B subunit 2</i> (RNA polimerase B subunidade 2)
SADH	<i>Secondary Alcohol Dehydrogenase</i> (Álcool desidrogenase secundária)
SAPP3	<i>Secreted Aspartic Protease 3</i> (Aspártico-proteinase secretada tipo 3)
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> (Pacote Estatístico para as Ciências Sociais)
SYA1	<i>Putative Alanyl-tRNA Synthetase</i> (Alanil-tRNA sintetase)
TAMRA	<i>6-carboxytetramethylrhodamine</i> (6-carboxitetrametilrodamina)
TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i> (Tris hidroximetil aminometano, Ácido bórico e Ácido etilenodiamino tetra-acético)
TET	<i>Tetrachloro-6-carboxyfluorescein</i> (Tetracloro-6-carboxifluoresceína)

TOP2	<i>Type II DNA Topoisomerase</i> (DNA Topoisomerase tipo 2)
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic</i> (“Método hierárquico para análise de agrupamento”)
URA3	<i>Orotidine-5'-Phosphate Decarboxylase</i> (Orotidina-5'-fosfato descarboxilase)
USA	<i>United States of América</i> (Estados Unidos da América)
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
UV	Ultravioleta
VMA	<i>Vacuolar Membrane ATPase</i> (membrana vacuolar ATPase)
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> (extrato de levedura, peptona e dextrose)
YST	<i>Yeast</i> (Levedura)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	CANDIDÍASE	20
1.2	<i>Candida parapsilosis</i>	24
1.2.1	1.2.1 <i>Lodderomyces elongisporus</i>	26
1.3	O COMPLEXO <i>psilosis</i>	27
1.4	FUNGEMIA E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	29
1.5	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	35
1.6	ANTIFÚNGICOS	37
2	JUSTIFICATIVA	41
3	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVO GERAL	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	ISOLADOS CLÍNICOS	43
4.2	CEPAS DE REFERÊNCIA	43
4.3	CONFIRMAÇÃO FENOTÍPICA	45
4.3.1	Re-isolamento e identificação por meio cromogênico	45
4.3.2	Identificação bioquímica	45
4.3.2.1	Sistema API [®] 20 C AUX	45
4.3.2.2	Sistema Vitex 2 para identificação de leveduras (<i>YST Card</i>)	46
4.4	PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS	46
4.5	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	47
4.5.1	Extração do DNA genômico	47
4.5.2	Amplificação e Sequenciamento da região D1/D2 do rDNA	47
4.5.3	PCR com <i>primers</i> espécie-específicos	48

4.5.4	PCR-RFLP	49
4.5.5	Microsatélites	50
4.5.6	Amplificação e Sequenciamento da região ITS do rDNA	52
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5	RESULTADOS	53
5.1	AMOSTRAGEM E DADOS	53
5.2	CONFIRMAÇÃO FENOTÍPICA	53
5.2.1	Macromorfologia	53
5.2.2	Identificação bioquímica	55
5.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	55
5.3.1	Sequenciamento da região D1/D2 do rDNA	55
5.3.2	PCR com <i>primers</i> espécie-específicos	59
5.3.3	PCR-RFLP	59
5.3.4	Microsatélites	60
5.3.5	Sequenciamento da região ITS do rDNA	67
5.4	CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E O SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO D1/D2 DO rDNA	69
5.5	COMPARAÇÃO ENTRE O SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO D1/D2 DO rDNA E OS OUTROS MÉTODOS EMPREGADOS	71
5.6	ANÁLISE EM CONJUNTO ENTRE O SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO D1/D2 DO rDNA E A TÉCNICA DOS MICROSATÉLITES	72
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICES	117

APÊNDICE A – Dados dos pacientes, testes bioquímicos e métodos moleculares (ordenado pelo código da amostra).	118
APÊNDICE B – Testes bioquímicos e sequenciamento da região D1/D2 do gene <i>28S</i> do rDNA (ordenado pelo código da amostra).	122
APÊNDICE C – Dados dos pacientes, sequenciamento e microsátélites (ordenado pelo n.º do paciente).	126
ANEXOS	130
ANEXO A – Composição das galerias API [®] 20 C AUX.	131
ANEXO B – Conteúdo dos poços do YST <i>Card</i> para o Vitek [®] 2.	132
ANEXO C – Interpretação dos valores de Kappa.	133
ANEXO D – Produção científica no período do doutorado (autoria e coautoria).	134

1 INTRODUÇÃO

A microbiota anfibiótica humana é composta por microrganismos com distribuição permitida nas diversas áreas do corpo. No domínio dos eucariotos, temos as espécies de *Candida* como o principal representante fúngico, sendo estas leveduras as mais habitualmente isoladas de materiais biológicos nos laboratórios clínicos de rotina. Desde 1980 tem ocorrido um aumento na frequência das infecções fúngicas oportunistas, sendo as espécies de *Candida* o agente comumente encontrado nas infecções hospitalares devido à suscetibilidade dos pacientes internados (SALAVERT; JARQUE; PEMÁN, 2006; WARNOCK, 2007; ALANGADEN 2011).

1.1 CANDIDÍASE

Candidíase ou candidose é uma micose causada por leveduras do gênero *Candida*, onde as lesões podem variar de superficiais a profundas, se comportando como doença aguda ou crônica, com espectro clínico bem variável. O principal agente etiológico da candidíase, e o mais estudado, é *Candida albicans*. A maioria dos estudos mostra que esta espécie constitui 60% dos isolados de amostras clínicas. Uma vez que esta levedura faz parte da microbiota humana, a candidíase é considerada uma micose oportunista primária ou secundária (CHAVES; CAVALCANTI; PORTO, 2003; MENEZES et al., 2004; MORACE; BORGHI 2010).

As espécies do gênero *Candida*, segundo a taxonomia, localizam-se em: Domínio Eukarya, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999; KURTZMAN; FELL; BOEWHOUT, 2011).

Espécies de *Candida* residem como comensais fazendo comumente parte da microbiota da pele, trato digestivo e reprodutivo de indivíduos saudáveis. Todavia, quando há uma ruptura no balanço da microbiota ou uma debilidade no sistema imune do hospedeiro, as espécies do gênero *Candida* tendem a causar manifestações clínicas. Quanto à origem, estas leveduras podem ser endógenas, quando oriundas da microbiota, ou exógenas como, por exemplo, quando adquiridas no ato sexual (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; MONGE et al., 2006; BARBEDO; SGARBI, 2010).

O estabelecimento da candidíase depende da predisposição do hospedeiro, carga parasitária e virulência fúngica, uma vez que estes três fatores atuam em conjunto contribuindo para as espécies do gênero *Candida* tornarem-se patogênicas (**Figura 1**). Os fatores predisponentes dependem de indivíduo para indivíduo assim como do sítio da lesão, destacando-se o uso prolongado de antibióticos; quimioterapia; pacientes transplantados; pacientes com câncer; portadores do HIV; desnutridos; imunodeprimidos; recém-nascidos; idosos, entre outros (PFALLER; DIEKEMA, 2007; GARCIA-VIDAL; VIASSUS; CARRATALÀ, 2013).

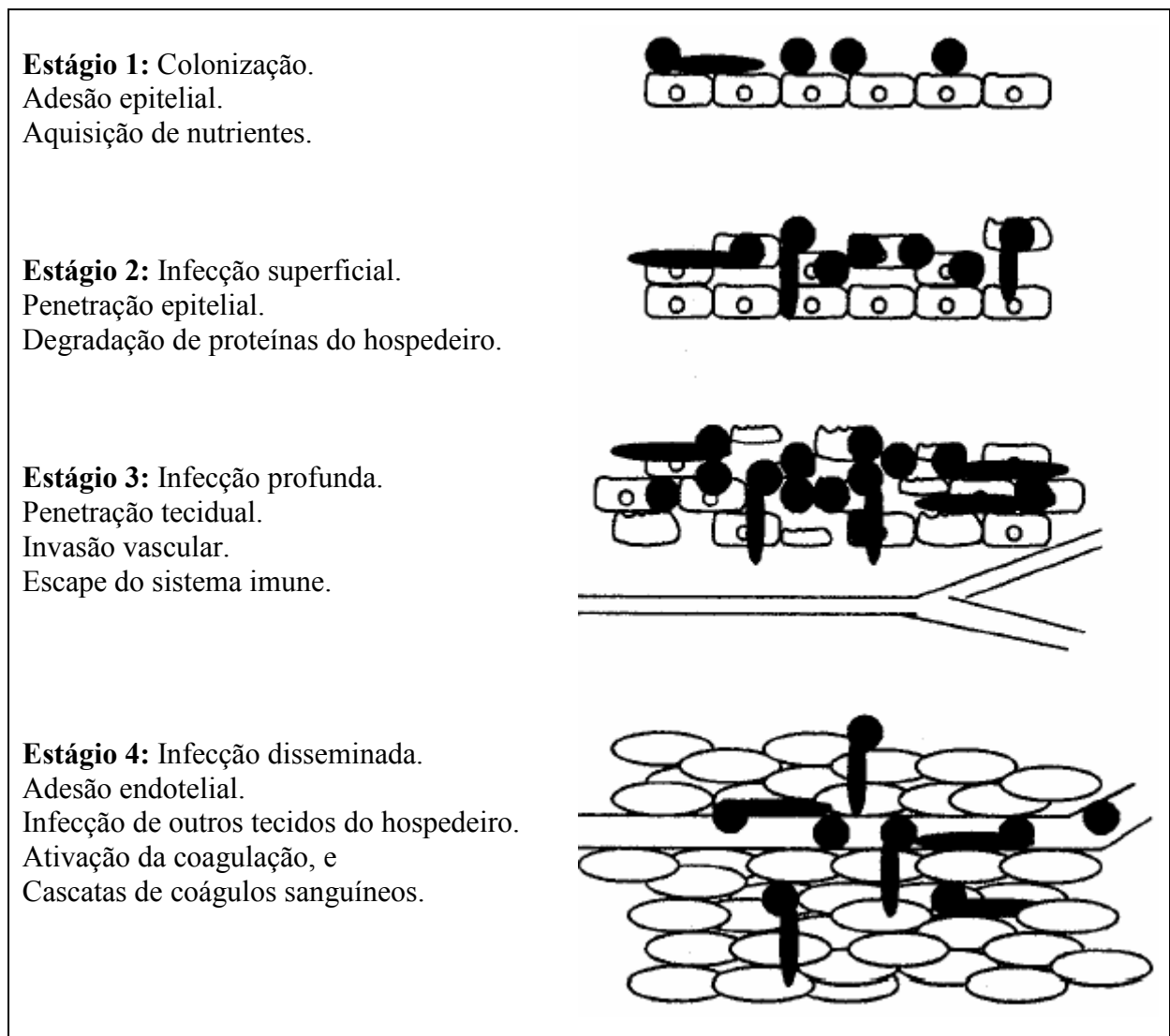


Figura 1: Esquema em quatro estágios no processo colonização/infecção, exemplo *Candida albicans*. Comumente coloniza a superfície epitelial (**estágio 1**) e causa infecções superficiais (**estágio 2**), mas sob condições onde o hospedeiro se encontra comprometido, o fungo estabelece infecções profundas (**estágio 3**), avançando para o interior do tecido epitelial onde ocasionalmente causa infecções disseminadas (**estágio 4**), na qual o fungo coloniza e infecta outros tecidos do hospedeiro. Fonte: adaptado de NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003.

A patogênese da candidíase é facilitada por vários fatores de virulência envolvidos em funções, tais como: (1) aderência às células do hospedeiro pelas adesinas, como, por exemplo, a família do gene *ALS* (*agglutinin-like sequence*) em *C. albicans*, que codifica diferentes glicoproteínas de superfície celular implicadas no processo de adesão em superfícies do hospedeiro; (2) morfogênese e polimorfismo fúngico, levedura, pseudohifa, hifa verdadeira e clamidoconídios; (3) variação fenotípica (tipo conjugante sexuado, fenômeno de *switching*); (4) sobrevivência dentro de fagócitos; (5) modulação do sistema imune, por mananas e manoproteínas que são capazes de regular (ativar e desativar) a ação das defesas do hospedeiro; (6) adaptação ao ambiente oxidativo, determinada pelo genoma selvagem de *C. albicans*, em que genes são temporariamente induzidos ou reprimidos em função das espécies reativas de oxigênio; (7) sequestro de ferro, principalmente na candidíase hematogênica, em que *C. albicans* é capaz de adquirir o ferro a partir da transferrina; (8) variação de temperatura e do pH, componentes cruciais para adaptação a diferentes sítios no hospedeiro; (9) toxinas (candida-toxina); e (10) enzimas hidrolíticas, sendo as principais enzimas produzidas as peptidases, que hidrolisam ligações peptídicas, e as fosfolipases, que hidrolisam os fosfoglicerídeos (CHENG et al., 2005; BISWAS; DIJCK; DATTA, 2007; GÁCSEK et al., 2007b; BARBEDO; SGARBI, 2010).

Outro fator de virulência é a produção de biofilmes por algumas espécies de *Candida*, conferindo maior resistência à terapia antifúngica, por limitar a penetração dos agentes antifúngicos através da matriz extracelular polisacarídica, e protegendo as células fúngicas da resposta imune do hospedeiro. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* são algumas espécies produtoras de biofilme. A formação de biofilme é precedida pela aderência do fungo aos tecidos ou aos dispositivos médicos. *C. parapsilosis* pode formar biofilme em cateter venoso central e periférico, cateter de hemodiálise e de diálise peritoneal, dispositivos protéticos para lesões intracardíacas e articulações protéticas. A colonização inicial do cateter, muitas vezes é decorrente da manipulação do mesmo pelos próprios profissionais de saúde, já que *C. parapsilosis* é um microrganismo comensal da pele humana (KUMAR; MENON, 2006; RAMAGE; MARTINEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; TUMBARELLO et al., 2007; HOLLAND et al., 2014).

As formas clínicas da candidíase podem ser divididas em cutâneo-mucosa, sistêmicas e alérgicas. Na candidíase cutâneo-mucosa, os tecidos mais atingidos são os do trato digestivo, genito-urinário (candidíase vulvovaginal e balanite) e tecido cutâneo (áreas intertriginosas da pele como virilhas, axilas, dobras supra púbicas e sub-mamárias, regiões interdigitais das

mãos e pés, e unhas). Geralmente as lesões, quando em mucosas, são úmidas e recobertas por uma pseudomembrana esbranquiçada, que ao ser removida apresenta fundo eritematoso, e quando na pele as lesões geralmente são eritematosas e de aspecto descamativo. Na infecção sistêmica podem ser atingidos diversos órgãos. A candidíase alérgica (candidides) caracteriza-se por apresentar lesões cutâneas do tipo vesiculosas, papulosas e/ou eczematóides estéreis, encontradas principalmente nos espaços interdigitais das mãos ou em outras partes do corpo fora do foco inicial da lesão (LACAZ et al., 2002; MENEZES et al., 2004).

O diagnóstico laboratorial clássico da candidíase baseia-se essencialmente na presença de leveduras, hifas ou pseudohifas no exame direto; isolamento primário em agar batata dextrose (PDA), agar Sabouraud e agar Mycosel para observação da macromorfologia de aspecto homogêneo, com colônias pastosas de cor creme; micromorfologia com pseudohifas hialinas e ramificadas (sugestivas do gênero *Candida*), exceto para *C. glabrata*. Estas características morfológicas associadas à produção de clamidosporos (estruturas de resistência) em agar *Corn Meal* acrescido de Tween 80 e formação de tubo germinativo em soro estéril humano (pode-se usar também soro estéril de bovino, de cavalo ou coelho) a 37°C entre 2 e 3 horas *in vitro*, é sugestivo de *C. albicans*. As demais espécies necessitam pelo menos de provas bioquímicas de assimilação (auxanograma) e fermentação (zimograma) para a identificação (ANVISA, 2004; BARBEDO et al., 2013).

A retirada dos fatores predisponentes e o restabelecimento da imunidade, combinada comumente com derivados azólicos, poliênicos ou equinocandinas, são as principais formas de tratamentos da candidíase (SIDRIM; ROCHA, 2004; CORTÉS; RUSSI, 2011).

Nos últimos anos, vem aumentando o número de micoses causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*. Em 1963, eram conhecidas apenas cinco espécies de *Candida* como causadoras de doenças em humanos, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* e *C. guilliermondii*. Em 2003, Colombo e Guimarães relataram que até aquele momento eram conhecidas 17 espécies de *Candida* (gênero com quase 200 espécies conhecidas, até aquele momento) causadoras de micoses superficiais ou invasivas em seres humanos. As principais espécies de interesse clínico são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. Entretanto, tem sido progressivo o relato de casos de doenças superficiais e invasivas relacionadas a espécies emergentes de *Candida*, envolvendo isolamentos de *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua*, dentre outras (ZIARRUSTA, 2002; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; BARBEDO et al., 2010).

1.2 *Candida parapsilosis*

Candida parapsilosis é uma levedura ubíqua no meio ambiente, podendo ser isolada não só de solo, ambientes marinhos e plantas, mas também de superfícies de mucosas de seres humanos e demais mamíferos (LUPETTI et al., 2002). Isolada pela primeira vez em 1928 por Ashford, a partir de fezes de um paciente com diarreia em Porto Rico, foi classificada como uma espécie de *Monilia* que era incapaz de fermentar a maltose (ASHFORD, 1928). A espécie foi nomeada *Monilia parapsilosis* para diferenciar de outra espécie *Monilia psilosis*, hoje conhecida como *C. albicans*. Embora inicialmente considerada não-patogênica, em 1940 *C. parapsilosis* foi identificada como o agente responsável num caso fatal de endocardite em um paciente usuário de droga intravenosa (JOACHIM; POLAYES, 1940).

C. parapsilosis possui a capacidade de colonizar a pele humana, proliferar em soluções ou emulsões contendo carboidratos, aminoácidos, lipídios e vitaminas; e de aderir a superfícies plásticas. Pode se tornar patogênica caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas da pele secundariamente à queimadura ou procedimentos médicos invasivos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; ALMIRANTE et al., 2006; KUMAR; MENON, 2006; TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008).

C. parapsilosis caracteriza-se morfológicamente em cultivo por leveduras ovais (3-4 x 5-8 μm), arredondadas ou cilíndricas, não forma hifas verdadeiras, mas se apresenta na forma leveduriforme ou de pseudohifas. Em agar Sabouraud dextrose, suas colônias são brancas, cremosas, brilhantes, lisas ou enrugadas; já em CHROMAgar *Candida* as leveduras apresentam coloração do branco à rosa (**Figura 2**). Os fenótipos das colônias dependem da morfologia de *C. parapsilosis*, assim células leveduriformes exibem fenótipos lisos ou em forma de cratera, enquanto que colônias com pseudohifas apresentam fenótipos concêntricos ou de aspecto rendado (KIM; EL BISSATI; MAMOUN, 2006; LAFFEY; BUTLER, 2006).

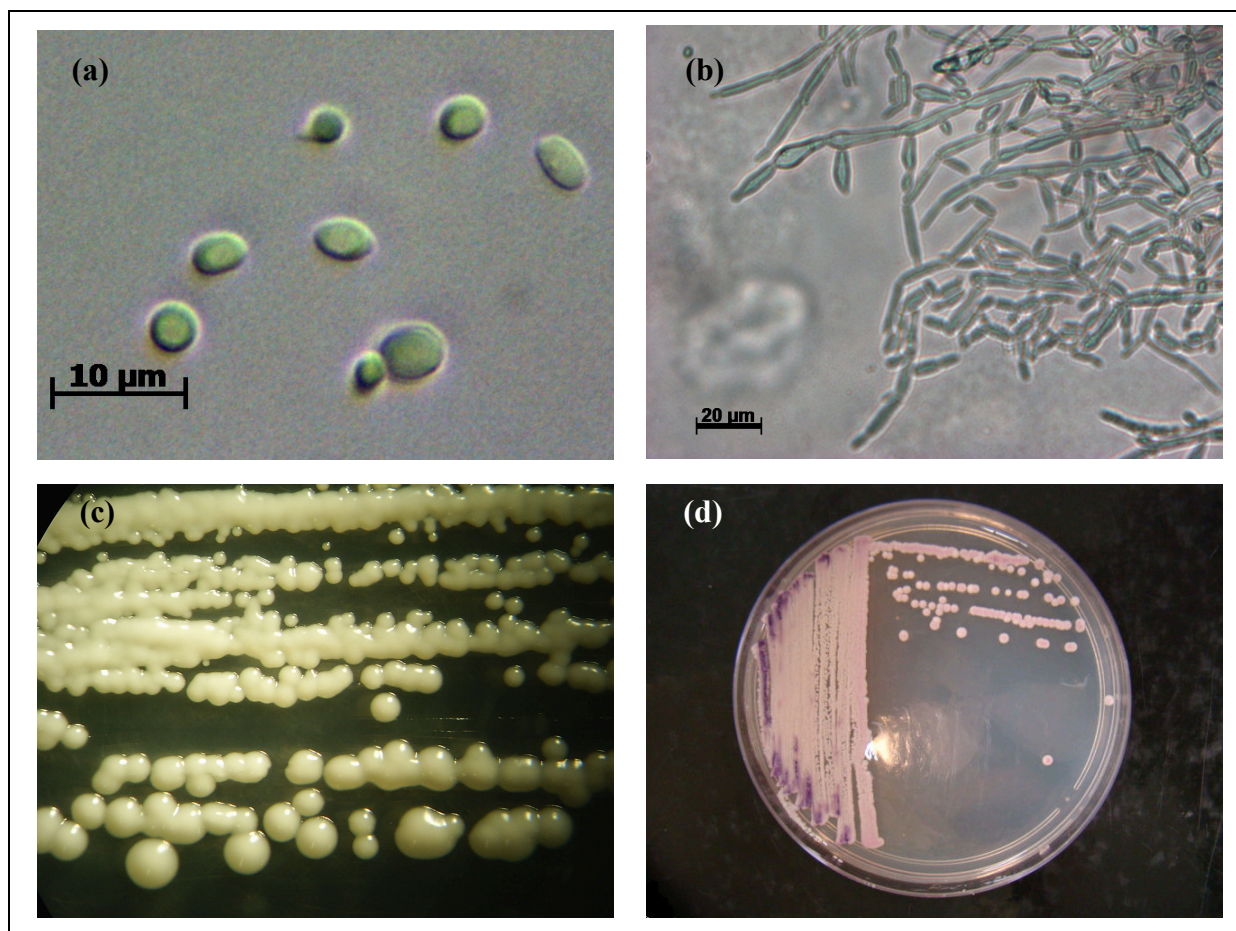


Figura 2: *Candida parapsilosis* ATCC 22019. **(a)** Células leveduriformes oriundas de cultivo em agar Sabouraud Dextrose, 72h a 35°C. **(b)** Pseudohifas em microcultivo em agar *Corn Meal Tween 80*, 48h a 35°C. **(c)** Macromorfologia em agar Sabouraud Dextrose, 72h a 35°C. **(d)** Pigmentação em CHROMagar *Candida*, 48h a 37°C. Fonte: elaborado pelo autor com auxílio do microscópio AxioVision LE (ZEISS) em (a) e (b); a foto em (c) foi obtida apoiando-se a objetiva da câmera fotográfica digital Sony DSC-H10 na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X; e a foto em (d) obtida pela câmera digital Sony DSC-H10.

C. parapsilosis é uma espécie de fungo oportunista que tem emergido como um patógeno nosocomial causando infecções com manifestações clínicas que incluem fungemia, endocardite, endoftalmite, artrite, peritonite, meningite, otomicoses, onicomioses, vulvovaginites e infecções de trato urinário. Todas ocorrem normalmente em associações a procedimentos médicos invasivos ou a dispositivos protéticos e devido à prévia terapia antifúngica (TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008; van ASBECK; CLEMONS; STEVENS, 2009).

A incidência de *C. parapsilosis* tem aumentado, significativamente, nas últimas décadas, sendo a segunda espécie mais isolada de infecções fúngicas hematogênicas principalmente na Europa e na América Latina. Em alguns hospitais infantis, *C. parapsilosis*

tem se tornado a espécie mais frequente em candidemias de recém-nascidos (GODOY et al., 2003; ALMIRANTE et al., 2006; COLOMBO et al., 2006; PFALLER et al., 2008).

A infecção fúngica invasiva causada por *C. parapsilosis* pode ocorrer sem colonização prévia e é frequentemente transmitida horizontalmente, via fontes externas contaminadas tais como dispositivos médicos, fluidos ou soluções, mãos dos profissionais de saúde, dispositivos protéticos e cateteres (TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008).

Diferentes estudos indicam que o uso prolongado de cateter venoso em posição central e a nutrição parenteral aumentam os riscos para infecções invasivas por *C. parapsilosis*, além disso, o tempo prolongado de internação e o fato desses pacientes serem manuseados por um grande número de profissionais de saúde aumentam a probabilidade de infecção. Outra característica marcante dessa espécie de levedura, como já mencionado, é a capacidade de formar biofilme em dispositivos médico-cirúrgicos, facilitando a manutenção desta espécie no hospedeiro, e posterior influência na disseminação hospitalar (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; KUHN et al., 2004; CHEN et al., 2006; TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008; CONDE-ROSA et al., 2010).

1.2.1 *Lodderomyces elongisporus*

Anteriormente acreditava-se que *Lodderomyces elongisporus* era o teleomorfo de *C. parapsilosis* (HAMAJIMA et al., 1987), mas o sequenciamento da região 18S do DNA ribossomal confirmou ser uma espécie distinta (JAMES; COLLINS; ROBERTS, 1994).

Diezmann et al. (2004), em um estudo multigênico contendo 38 patógenos humanos e espécies relacionadas da ordem Saccharomycetales, incluindo patógenos humanos oportunistas, patógenos de plantas e leveduras cosmopolitas associadas à água e a vegetação em decomposição, sequenciaram seis genes (*ACT1*, *EF2*, *RPB1*, *RPB2*, *18S* rDNA e *28S* rDNA), na qual *L. elongisporus* agrupou-se como grupo irmão de *C. parapsilosis* dentro do clado de espécies patogênicas contendo ainda *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. dubliniensis*. *L. elongisporus* é a única do agrupamento que forma ascósporos.

O primeiro relato de *L. elongisporus* como agente causador de doença humana foi descrito por Lockhart et al. (2008b), onde os isolados de 10 pacientes (oito mexicanos e dois asiáticos) com fungemia foram identificados como *C. parapsilosis* por métodos convencionais (Vitek e API 20 C AUX), porém com colônias azul-turquesa em meio cromogênico. Como o

padrão de pigmentação branca-rosácea das colônias não foi observado, o posterior sequenciamento da região D1/D2 do rDNA destes isolados mostrou que estes se tratavam de *L. elongisporus*. Os autores ainda relataram que em agar *Corn Meal* os isolados formaram abundantes pseudohifas curtas indistinguíveis de *C. parapsilosis*. No entanto, quando os isolados foram cultivados em meio que estimula a esporulação, ascósporos foram produzidos entre 12 e 14 dias.

1.3 O COMPLEXO *psilosis*

Estudos iniciais demonstraram que os isolados de *C. parapsilosis lato sensu* poderiam ser divididos em três grupos (I, II, III), sendo estes distinguidos por diversos critérios, incluindo análise da amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) (LEHMANN; LIN; LASKER, 1992), eletroforese de cariótipos (LOTT et al., 1993), eletroforese de isoenzimas e sequenciamento da região intergênica (ITS) do DNA ribossomal (LIN et al., 1995), na morfotipagem (CASSONE et al., 1995), parentesco ao nível de DNA e padrão de polimorfismo nos fragmentos de restrição (RFLP) (ROY; MEYER, 1998), sequenciamento do gene da DNA topoisomerase II (KATO et al., 2001), hibridação com sonda oligonucleotídica Cp3-13 (ENGER et al., 2001), sequências de DNA de telômeros mitocondriais (NOSEK et al., 2002), polimorfismo de nucleotídeo único pelo sequenciamento de cinco *loci* independentes (FUNDYGA et al., 2004), e diferença na produção de biofilmes (SONG et al., 2005).

Tavanti et al. (2005) baseados na tipagem por sequenciamento em *multilocus* (MLST) (11 genes: *ACPL*, *ACPR*, *COX3*, *GAL1*, *LIA1*, *LIP2*, *SADH*, *SAPP3*, *SYA1*, *TOP2* e *URA3*) sugeriram que os grupos II e III de *C. parapsilosis* constituíssem novas espécies, sendo nomeadas *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*, respectivamente, mantendo o grupo I como *C. parapsilosis stricto sensu*. Assim, o complexo *C. parapsilosis* ou *psilosis* passou a ser formado por *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Até o momento, a distinção entre as três espécies só é possível por meio de análises moleculares. Outro estudo realizado por Tavanti et al. (2007) numa coleção de *C. parapsilosis* isoladas em diferentes hospitais na Itália, demonstrou que 4,5% das infecções/colonizações atribuídas a *C. parapsilosis*, na verdade eram causadas por *C. orthopsilosis*.

Um dos primeiros relatos da descrição global da prevalência das três espécies do complexo *psilosis*, onde os isolados estudados eram provenientes de 89 centros de estudos em 29 países de seis continentes, mostrou que entre 2001 e 2006 de 1.929 isolados de *C. parapsilosis*, na verdade continham um predomínio de *C. parapsilosis stricto sensu* (91,3%) seguido de *C. orthopsilosis* (6,1%), *C. metapsilosis* (1,8%) e *Lodderomyces elongisporus* (0,8%). Este estudo multicêntrico ainda demonstrou que em diferentes países ou regiões, a prevalência de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* varia geograficamente, podendo ter uma frequência de 10,9% de *C. orthopsilosis* na América do Sul, 8,0% na Europa, 5,0% na América do Norte e 0,7% na África (LOCKHART et al., 2008a).

Hensgens et al. (2009) descreveram pelo método do polimorfismo de comprimento nos fragmentos amplificados (AFLP) que em uma coleção de 395 isolados de *C. parapsilosis* de diferentes sítios anatômicos, provenientes da Itália e Nova Zelândia, 20 (5%) eram *C. metapsilosis*.

Um estudo realizado na Espanha envolvendo 345 casos de infecções hematogênicas por *Candida* spp. revelou 87 isolados do complexo *psilosis*. Destes, 87,4% foram *C. parapsilosis stricto sensu*, 5,7% foram caracterizados como *C. orthopsilosis* e 6,9% como *C. metapsilosis*. De todos os casos de candidemia registrados neste estudo, as taxas de prevalência de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* representaram 1,4% (5/345) e 1,7% (6/345), respectivamente, representando entre a quinta e sexta espécie mais isolada neste estudo (GOMEZ-LOPEZ et al., 2008a). Outro estudo desenvolvido na Espanha, incluindo 44 hospitais e 364 isolados do complexo *psilosis*, demonstrou a presença de *C. parapsilosis stricto sensu* (90,7%), *C. orthopsilosis* (8,2%) e *C. metapsilosis* (1,1%). *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* não foram isoladas de pacientes neonatos. *C. metapsilosis* foi isolada de pacientes adultos e idosos (CANTÓN et al., 2011).

Em Portugal, *C. parapsilosis stricto sensu* foi a espécie mais isolada (91,4%), seguida de *C. metapsilosis* (2,9%) e *C. orthopsilosis* (2,3%). Outras espécies de *Candida* corresponderam a 3,4%. Fato interessante, todos os isolados do sangue corresponderam a *C. parapsilosis stricto sensu*, enquanto que *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foram isoladas de outras amostras biológicas como urina, mucosas superficiais e trato respiratório (SILVA et al., 2009).

No Brasil, foi realizado um estudo multicêntrico envolvendo 141 isolados de hemocultura obtidos entre 2003-2004 sendo identificados como *C. parapsilosis lato sensu*. De acordo com a caracterização molecular do complexo *psilosis*, a prevalência das espécies foi de 88% para *C. parapsilosis*, 9% para *C. orthopsilosis* e 3% para *C. metapsilosis*

(GONÇALVES et al., 2010). Outro estudo brasileiro, em São Paulo, envolvendo 152 isolados de hemocultura obtidos durante 1997-2011, demonstrou que *C. parapsilosis stricto sensu* (90,8%) foi a espécie mais isolada, seguida de *C. orthopsilosis* (8,6%) e *C. metapsilosis* (0,6%) (BONFIETTI et al., 2012).

Também no Brasil, encontramos relatos do complexo *psilosis* em situações que não são de amostras provenientes de sangue. Pires et al. (2011) em estudo envolvendo 100 isolados de *C. parapsilosis lato sensu* oriundos de amostras de água coletadas entre março de 2006 a março de 2007, de uma unidade de hemodiálise em São Paulo, revelaram ser 53 *C. parapsilosis stricto sensu* e 47 *C. orthopsilosis*. Moris et al. (2012), identificaram 15 (4,7%) isolados do complexo *C. parapsilosis* em 318 isolados de *Candida* oriundos da cavidade oral de 214 pacientes HIV positivos, no período de junho de 2002 a julho de 2006 em Botucatu, São Paulo. Destes 15 isolados, oito foram identificados como *C. metapsilosis* e sete como *C. parapsilosis stricto sensu*. Neste estudo, *C. albicans* (84%) foi a espécie predominante encontrada.

1.4 FUNGEMIA E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A candidemia é a presença de leveduras do gênero *Candida* no sangue e é definida como positiva quando ocorre a associação da hemocultura com sintomas clínicos da infecção da corrente sanguínea como febre, hipotensão, choque séptico e por vezes falha renal. Atualmente a suspeita da candidemia é diagnosticada pela hemocultura, coloração pelo Gram, e diferentes práticas de diagnóstico no que tange à identificação de leveduras, como por exemplo, morfologia e bioquímica (COLOMBO et al., 2006; VIGOUROUX et al., 2006; AITTAKORPI et al., 2012).

Existem evidências e trabalhos científicos que sugerem que a disseminação das espécies de *Candida* por via sanguínea é um grande problema na maioria dos hospitais em todo o mundo (BERDAL et al., 2014; COLOMBO et al., 2014; LORTHOLARY et al., 2014). A candidemia é observada particularmente entre pacientes hospitalizados por longos períodos que são expostos a antibióticos, terapias imunodepressivas, nutrição parenteral e a procedimentos invasivos múltiplos. A fungemia por *Candida* é geralmente de difícil diagnóstico e o tratamento é de alto custo e apresenta uma alta taxa de mortalidade. Tratamentos com antibióticos de amplo espectro, quimioterapia, formação de biofilmes,

transplantados, uso de cateteres, alimentação parenteral, colonização do trato digestivo, neutropenia, HIV, dentre outros, são alguns dos fatores predisponentes à fungemia por espécies do gênero *Candida* (VIGOURUX et al., 2006; TUMBARELLO et al., 2007, BERDAL et al., 2014).

Sandven et al. (2006) em um estudo de 1.415 casos de candidemia realizado entre 1991 e 2003, na Noruega, verificaram que *C. albicans* foi responsável por 69,8% dos casos; seguida por *C. glabrata* (13,2%); *C. tropicalis* (6,7%); *C. parapsilosis* (5,8%); *C. krusei* (1,6%); *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e *C. norvegensis* com 0,6% cada; *C. kefyr* (0,5%) e outras espécies (*C. blankii*; *C. inconspicua*; *C. lusitaniae*; *C. sake* e *C. sphaerica*) foram causadoras de 0,5% dos casos. O estudo ainda mostrou que os pacientes mais acometidos se encontravam nos extremos de idade, ou seja, aqueles com menos de um ano de vida e com mais de 60 anos.

Recentemente, um estudo prospectivo realizado com 705 isolados de *Candida*, provenientes de pacientes admitidos em 26 hospitais da Espanha entre junho de 2001 e junho de 2012 diagnosticados com candidemia, relatou que *C. albicans* foi a responsável por 50,1% dos casos, seguida por *C. parapsilosis* (22,7%), *C. glabrata* (13,3%), *C. tropicalis* (6,2%), *C. krusei* (2,3%) e outras espécies com 5,4% (*C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* e *C. kefyr*). Dentre os casos, 63% ocorreram em homens e 37% em mulheres, sendo a média de idade de 65 anos para os adultos e 3 anos para as crianças. O estudo ainda revelou que 41% dos pacientes foram destinados à UTI e que 86% possuíam doença de base, por exemplo, câncer (39,7%) e diabetes (18,3%). Presença de cateter venoso central (58,7%), terapia imunossupressora ou neutropenia (50,6%), cirurgia anterior ao diagnóstico de candidemia (49,8%), terapia prévia com corticoide (49,0%) e ventilação mecânica (31,0%), foram alguns dos fatores predisponentes relatados (NIETO; TELLERÍA; CISTERNA, 2015).

A etiologia das infecções invasivas por *Candida* spp. variam com as regiões geográficas mundiais, muito bem demonstradas em diferentes países. Na América do Norte nota-se o predomínio de *C. glabrata* entre as espécies não-*albicans*, já na América do Sul, observa-se predomínio de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; NUCCI et al. 2010).

Enquanto que *C. albicans* é ainda considerada a espécie mais comum causadora de candidemias, o aumento das taxas de fungemia por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* são mencionadas em todo o mundo. A razão para a emergência de espécies de *Candida* não-*albicans* não está ainda completamente entendida, mas algumas intervenções médicas podem possuir impacto no risco de se desenvolver a candidemia por estas espécies.

Enquanto que *C. parapsilosis* é responsável por candidemias não-*albicans* mais frequentes em indivíduos em uso de cateteres e nutrição parenteral, *C. tropicalis* está mais associada com câncer e pacientes neutropênicos, e *C. krusei* e *C. glabrata* estão mais associadas com prévia exposição a azólicos (COLOMBO et al., 2006).

Dizbay et al. (2008) investigaram quatro episódios de fungemia relacionada com *C. parapsilosis* em uma unidade de terapia intensiva neurológica durante duas semanas, onde os pacientes infectados receberam nutrição parenteral. De acordo com a análise baseada em RAPD os isolados pertenciam à mesma estirpe e, embora não se tenha recuperado *C. parapsilosis* do ambiente hospitalar, este fato sugeriu que esta espécie pode ser transmitida e gerar epidemias.

Colombo et al. (2014) descreveram as tendências temporais na epidemiologia, gestão clínica e a evolução da candidemia em pacientes de UTI, e mostraram que a proporção de pacientes que desenvolveram candidemia na UTI aumentou de 44% para 50,9% quando comparados os períodos de 2003 a 2007 e de 2008 a 2012. O estudo abrangeu 1.392 episódios de candidemia em 64 pacientes adultos de 22 hospitais brasileiros, sendo as espécies encontradas: *C. albicans* 42%, *C. tropicalis* 20%, *C. parapsilosis* 19%, *C. glabrata* 9% e demais espécies de *Candida* 10%.

Infecções invasivas por *Candida* spp. são importantes causas de morbidade e mortalidade, portanto, um diagnóstico precoce e rápido é fundamental para a introdução de terapêutica antifúngica adequada (EGGIMANN; BILLE; MARCHETTI, 2011). O diagnóstico laboratorial de candidíase invasiva tem sido problemático, pois a hemocultura foi negativa em aproximadamente 50% dos casos confirmados por autópsias nos estudos de Berenguer et al. (1993). Além disso, os sinais e sintomas são inespecíficos, o que dificulta o diagnóstico clínico (ELLEPOLA; MORRISON, 2005).

Classicamente, o diagnóstico definitivo das candidemias é feito com base no isolamento do fungo em cultura. Este método é considerado padrão ouro para o diagnóstico de uma infecção fúngica, embora apresente baixa sensibilidade em relação às infecções hematogênicas pelo gênero *Candida* (BERENGUER et al., 1993; BARNES; MARR, 2007; PEMÁN; ALMIRANTE, 2008; GUERY et al., 2009).

Mesmo após a implementação de sistemas automatizados de hemocultura (BD Bactec™ e BacT/ALERT®) (HORVATH et al., 2004), o diagnóstico das infecções fúngicas invasivas permanece um desafio. As leveduras são colonizadoras comuns da mucosa humana, sendo difícil distinguir um fungo patogênico de um comensal. Apenas o isolamento do fungo no espécime clínico não estéril não indica um estado infeccioso (LARONE, 2002; ANAÏSSE;

McGINNIS, PFALLER, 2003). Além disso, a presença de bactérias pode mascarar a presença de fungos no espécime clínico. Estima-se que 27% das infecções hematogênicas nosocomiais sejam polimicrobianas; onde bactérias possam ser isoladas também com *C. albicans* (KLOTZ et al., 2007). Outro fator importante que pode influenciar nos métodos de cultivo é o tratamento prévio ou empírico de pacientes de alto risco com fármacos antifúngicos que podem inibir o crescimento do fungo (BARNES; MARR, 2007).

Desde meados de 1950, existem diferentes meios de cultivo capazes de gerar o crescimento de colônias com cores distintas dependendo das espécies de leveduras. Nos últimos anos, distintos meios de cultura com adição de cromógenos têm sido comercializados, possibilitando diferenciar *C. albicans* de outras leveduras de interesse clínico. Esses meios têm como fundamento a alteração na cor desenvolvida pelas colônias através de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromogênicos. Na década de 90 surgiu o CHROMagar, que tem sido utilizado para isolar e identificar presuntivamente *C. albicans* (verde), *C. tropicalis* (azul) e *C. krusei* (rosa rugosa), como também identificar infecções mistas. Este meio se baseia na utilização do substrato β -glicosaminidase que diferencia as leveduras de acordo com a pigmentação das colônias (ARAÚJO et al., 2005). Atualmente, vários meios cromogênicos como CHROMagar[®] *Candida* (BD Difco), *Candida*[®] ID2 (bioMérieux), Hicrome[®] *Candida* (HiMedia) entre outros são eficazes na detecção e identificação de algumas leveduras do gênero *Candida* como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, sendo estes disponibilizados comercialmente (ERASO et al., 2006; SIVAKUMAR et al., 2009).

Métodos de identificação fenotípica de *Candida* spp. isoladas em cultura são baseados nas suas características macro e micromorfológicas, bem como no seu perfil bioquímico através da assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e fermentação de açúcares (ELLEPOLA; MORRISON, 2005). Macromorfolologicamente, apresentam colônias brancas a cremes, aspecto cremoso ou membranoso, superfície lisa ou enrugada, brilhante ou opaca. Microscopicamente, observam-se hifas verdadeiras e/ou pseudo-hifas, sendo que o arranjo e a disposição dos blastoconídios auxiliam na identificação das espécies (DIGNANI; SOLOMKIN; ANAISSE, 2003). Sistemas comerciais de fácil execução e interpretação desenvolvidos através da capacidade assimilativa de substratos bioquímicos e enzimáticos como API[®] 20 C AUX, Vitek[®] 2, RapID Yeast[®] Plus, entre outros, podem ser utilizados nos laboratórios microbiológicos clínicos para a identificação rápida de *Candida* spp. (FREYDIERE et al., 2001; ELLEPOLA; MORRISON, 2005).

As galerias API[®] 20 C AUX (bioMérieux) possuem 20 cúpulas que contêm substratos desidratados para efetuar 19 testes de assimilação (**ANEXO A**). As cúpulas são inoculadas com meio mínimo semi-geloso e as leveduras se desenvolvem apenas se forem capazes de utilizar o substrato correspondente. A leitura é feita em 48 e/ou 72 horas (30°C) por comparação com os controles de crescimento e a identificação por consulta ao catálogo analítico ou pela plataforma apiweb[™] no website da bioMérieux (<https://apiweb.biomerieux.com/servlet>) (API[®] 20 C AUX, bioMérieux, França).

O sistema Vitek[®] 2 (bioMérieux) é um método bioquímico automatizado para identificação de microrganismos. Os cartões para identificação de leveduras (Vitek[®] 2 YST Card) baseiam-se em métodos bioquímicos estabelecidos e em substratos recentemente desenvolvidos, distribuídos em 46 testes (**ANEXO B**) colorimétricos que medem: assimilação de 20 carboidratos; assimilação de 6 ácidos orgânicos; 8 substratos para detecção de oxidases; 9 substratos para a detecção de arilamidases; e mais testes que detectam fosfatase, urease e assimilação de nitrato. Os cartões são incubados no interior do aparelho a 35,5°C e durante 18 horas uma leitura é feita a cada 15 minutos, o que leva a um perfil de identificação, estabelecido de acordo com algoritmo específico. O resultado final é comparado com um banco de dados que gera a identificação ou não do microrganismo de acordo com o nível de confiança (HATA et al., 2007).

O sistema RapID Yeast[®] Plus é um método qualitativo que utiliza 18 substratos, entre convencionais e cromogênicos, para a identificação de mais de 40 leveduras de importância médica e organismos similares isolados de espécimes clínicos. Após 4 e 5 horas a 30°C a leitura é feita gerando um código de 6 dígitos que ao ser comparado com o banco de dados identifica a espécie (KITCH et al., 1996; SMITH et al., 1999).

Após a introdução de técnicas de ionização, a espectrometria de massas também tem sido adotada como método padrão para a caracterização de biomoléculas, sendo assim usada para diferenciar espécies de uma variedade de microrganismos cuja identificação bioquímica é problemática. O MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight mass spectrometry*) tem sido amplamente utilizado na análise de misturas complexas de proteínas (por exemplo, proteínas ribossomais), incluindo células microbianas intactas e lisadas. Recentemente, MALDI-TOF-MS tornou-se uma ferramenta analítica para a classificação e identificação de espécies de bactérias e fungos. Nesta técnica, a identificação do microrganismo é baseada na relação massa/carga de peptídeos e proteínas, componentes com características individuais de cada espécie. Os espectros obtidos são comparados com os padrões de referência armazenados em banco de dados do equipamento. A principal vantagem

desta técnica se baseia no número de microrganismos, requerendo uma pequena quantidade do cultivo, tornando o processo rápido e completo em poucos minutos. Ainda tem sido sugerido que esta metodologia pode ser usada para tipagem intraespecífica (KUBESOVÁ et al., 2012; QUILES-MELERO et al., 2012; DE CAROLIS et al., 2014).

Testes sorológicos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico precoce da candidíase invasiva com base na detecção de diversos componentes fúngicos liberados durante a infecção e na resposta de anticorpos produzidos contra eles (PONTÓN; PALACIO, 2007). A manana e a enolase são provavelmente os antígenos mais imunogênicos de *Candida* spp. A detecção do antígeno manana pode ser realizada com um kit comercial conhecido como Platelia *Candida* Ag (Bio-Rad). Porém esse antígeno se apresenta em baixa concentração sérica em pacientes com candidemia dificultando assim a sua detecção. Esta prova se baseia num ensaio imunoenzimático (ELISA) que detecta resíduos de manose unidas por enlaces α (α -Man) com uma baixa sensibilidade (69%), porém com uma alta especificidade de 98%. A combinação desta prova com um ELISA que detecta manoses unidos por enlaces β (β -Man), demonstrou uma sensibilidade diagnóstica maior (85%) e uma especificidade de 95% (SENDID et al., 2004). A detecção de anticorpos anti-enolase pode ser realizada com o kit comercial ELISA *Candida* enolase IgG (laboratório Vircell, Granada, Espanha) com uma sensibilidade de 81% e uma especificidade de 83,9% para diagnosticar candidíase invasiva (LAÍN et al., 2007).

As β -(1-3)-D-glucanas são componentes da parede celular da maioria dos fungos, incluindo *Candida*. A ausência da β -(1-3)-D-glucana nos tecidos dos mamíferos e a ausência de glucanases que a eliminem fazem desta molécula um bom marcador de infecção fúngica. Por se tratar de um marcador polifúngico, a identificação a nível de gênero deve ser feita combinando a detecção da β -(1-3)-D-glucana com outras técnicas com por exemplo de anticorpos para a candidíase sistêmica. A detecção da β -(1-3)-D-glucana tem sido utilizada com êxito no diagnóstico da candidemia. Ostrosky-Zeichner et al. (2005), observaram que 87 de 107 pacientes com candidíase sistêmica apresentavam concentrações séricas de β -(1-3)-D-glucana de 60 pg/mL (sensibilidade de 81,3%), enquanto que 83 pacientes apresentaram concentrações séricas de β -(1-3)-D-glucana de 80 pg/mL (sensibilidade de 77,6%). A detecção da β -(1-3)-D-glucana também pode ser de interesse para o diagnóstico das candidemias associadas aos biofilmes em cateteres, já que Nett et al. (2007) observou que biofilmes produzidos por *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* liberam quantidades de β -(1-3)-D-glucana que podem ser detectadas pelo kit comercial Fungitest[®] (Sanofi). A confirmação desta observação pode ter implicações diagnósticas e terapêuticas já que infecções associadas a cateteres são difíceis de se diagnosticar e tratar.

1.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Métodos moleculares podem ser utilizados como instrumentos de diagnóstico laboratorial das candidíases invasivas com resultados promissores quanto aos valores de sensibilidade e especificidade em relação aos métodos convencionais, além de acurada capacidade de identificação de *Candida* spp. em amostras clínicas (ATKINS; CLARK, 2004; MOREIRA-OLIVEIRA et al., 2005).

Tem-se demonstrado que a diferença baseada nas características fenotípicas de algumas leveduras tais como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. africana* e *C. stellatoidea*; *C. lusitaniae* e *C. pulcherrima*; *C. famata* e *C. guilliermondii*; e *C. parapsilosis* e *C. famata* apresentam restrições, e técnicas moleculares são ferramentas úteis para esta caracterização (ROMEIO; CRISEO, 2009). De mesma forma, metodologias moleculares também têm sido usadas na identificação de complexos, por exemplo: (i) *C. glabrata*, *C. bracarensis* e *C. nivariensis*; (ii) *C. haemulonii*, *C. haemulonii* var. *vulnera* e *C. duobushaemuloniii*; (iii) *C. guilliermondii*, *C. fermentati* e *C. carpophila*; (iv) *C. rugosa stricto sensu*, *C. pseudorugosa*, *C. neorugosa* e *C. mesorugosa*; e o (v) complexo *psilosis* alvo de nosso estudo (TAVANTI et al., 2005; MEDEIROS et al., 2007; ENACHE-ANGOULVANT et al., 2011; CENDEJAS-BUENO et al., 2012; PADOVAN; MELO; COLOMBO, 2013).

Genes ribossomais fúngicos são alvos comuns de DNA utilizados em procedimentos para a identificação desses microrganismos a nível de espécie por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A grande variabilidade das sequências ITS1 e ITS2 associadas com as regiões conservadas 18S, 5,8S e 28S do DNA ribossômico (rDNA) têm sido utilizadas na PCR em diferentes formatos para a discriminação e identificação de leveduras (CHEN et al., 2000; 2001), assim como a região D1/D2 da subunidade 28S do rDNA (LINTON et al., 2007).

Buchman et al. (1990) foram os primeiros a demonstrar que a detecção de *C. albicans* em amostras clínicas era possível através da técnica da PCR de uma sequência do gene que codifica a enzima lanosterol- α -demetilase (*LIAI*). A partir daí, diferentes métodos de PCR têm sido aplicados para o diagnóstico e identificação de fungos patogênicos invasivos. Esses métodos incluem PCR panfungal (van BURIK et al., 1998); nested PCR (BOUGNOUX et al., 1999); PCR multiplex (CHANG et al., 2001); PCR em tempo real (MAAROUFI et al., 2004); PCR transcriptase reversa (LUO et al., 2004) entre outros.

A variabilidade das regiões ITS1 e ITS2, também nas diferentes espécies de *Candida*, associada à PCR multiplex, levou um grupo de estudo português a desenvolver uma

combinação de *primers* universais e *primers* espécie-específicos em uma única reação, assim capaz de identificar oito espécies de *Candida* de relevância clínica: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis* (CARVALHO et al., 2007).

Taira et al. (2014) desenvolveram uma *nested* PCR em *multiplex* capaz de identificar espécies de *Candida* em amostras de sangue onde aplicaram em pacientes pediátricos em estado crítico. O método consistiu em duas etapas, sendo que a segunda etapa foi dividida em dois ensaios. Primeiro foi realizado uma PCR da região ITS com os *primers* ITS1 e ITS4 a partir de amostras de sangue. A segunda etapa foi destinada aos *primers* específicos, utilizando como alvo o amplificado da primeira etapa, logo a primeira PCR foi destinada à detecção de *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. glabrata*; e a segunda PCR destinada a detectar *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. peliculosa*. O estudo prospectivo envolveu 54 pacientes pediátricos (32 meninos e 22 meninas), dentre os quais 24 recém-nascidos, com suspeita de candidemia, internados na unidade de tratamento intensivo (UTI) de dois hospitais de referência pediátrica no estado de São Paulo. Todos os pacientes utilizavam cateter venoso central e receberam antibióticos de amplo espectro por mais de 96 horas no momento da coleta de sangue. O grupo controle incluiu 28 crianças, do instituto da criança/HCFMUSP, sem evidência de qualquer tipo de infecção na corrente sanguínea e que tinham sofrido procedimentos cirúrgicos mínimos. Dos 54 pacientes pediátricos, o sangue de oito produziram hemocultura positiva (14,8%) com posterior identificação pelo sistema Vitek[®] 2, enquanto que a técnica *nested* PCR em *multiplex* detectou o DNA de *Candida* em 13 pacientes (24,0%), incluindo os oito com culturas positivas e identificação bioquímica. Dentre apenas os cinco pacientes na qual a *nested* PCR em *multiplex* foi capaz de detectar o DNA de *Candida* (confirmados por sequenciamento de região ITS), três deles, esta metodologia molecular foi capaz de identificar dupla candidemia (*C. parapsilosis stricto sensu* e *C. tropicalis*). Por fim as espécies encontradas nos 13 pacientes foram *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* cinco de cada e uma *C. krusei*.

Leveduras de importância clínica mostram diferenças espécie-específicas em relação à susceptibilidade aos fármacos antifúngicos, portanto uma identificação rápida e acurada do patógeno é essencial (BORMAN et al., 2010). A identificação molecular, empregando a amplificação por PCR e o sequenciamento de regiões genômicas altamente conservadas, representam uma alternativa rápida e sensível para a identificação correta de leveduras, dessa forma também sendo útil no estabelecimento de relações filogenéticas (CHEN et al., 2000; 2001; LINTON et al., 2007; BORMAN et al., 2010).

A correlação clínica e a epidemiologia molecular podem ser atribuídas dependendo de cada método de genotipagem, complementado assim com similaridades e análise de agrupamentos. Portanto, o uso de sistemas de genotipagem que dão resultados que oferecem mínima disparidade, ou a combinação dos resultados de diferentes sistemas, pode proporcionar maior segurança e coerência na determinação das relações genéticas (BORIOLLO et al., 2010).

1.6 ANTIFÚNGICOS

Os fármacos antifúngicos conhecidos para o tratamento das micoses sistêmicas são: anfotericina B (e sua forma liposomal), 5-fluorocitosina, itraconazol, fluconazol, derivados triazólicos de segunda geração (voriconazol, posaconazol, ravuconazol) e, dentre as equinocandinas, a caspofungina, a anidulafungina e a micafungina (ANAISSE, 2008; MENSA; PITART; MARCO, 2008; CORNELLY et al., 2009). Nos hospitais públicos brasileiros são considerados medicamentos essenciais para tratamento das infecções fúngicas invasivas apenas anfotericina B, fluconazol e itraconazol (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A anfotericina B pertence à classe dos poliênicos e possui atividade fungicida, pois a interação com o ergosterol da membrana fúngica, resulta na formação de poros, causando alteração de permeabilidade celular e consequente morte celular. Seu amplo espectro de ação, que inclui a maior parte das espécies patogênicas para o homem, fizeram dela a principal, senão única, alternativa no tratamento das micoses profundas até os anos 90. No entanto, a administração deste fármaco ao paciente pode ser complicada devido à sua nefrotoxicidade, podendo ser necessária a redução da dose (WALSH et al., 2002) ou até mesmo o término da terapia (MOUDGAL et al., 2005). O risco potencial de toxicidade, especialmente em pacientes com função renal comprometida, levou ao desenvolvimento de formulações lipídicas da anfotericina B com eficácia similar à anfotericina tradicional, porém com nefrotoxicidade reduzida (ADLER-SHOHET; WASKIN; LIEBERMAN, 2001; LINDER et al., 2003).

O fluconazol e o itraconazol foram os primeiros fármacos da família dos triazólicos que começaram a ser utilizados no tratamento das candidíases invasivas e de outras infecções fúngicas. Os triazólicos, assim como os imidazólicos (cetoconazol e miconazol), pertencem ao grupo dos azólicos, agindo através da inibição da biossíntese do ergosterol, inibindo a

enzima 14- α -demetilase, que atua na etapa de demetilação do C-14 do lanosterol, resultando em acúmulo intracelular de produtos tóxicos, alteração de permeabilidade na membrana e resultando em morte celular. Os azólicos constituem um dos principais avanços terapêuticos da micologia. O fluconazol foi o primeiro antifúngico sistêmico com toxicidade reduzida e com um excelente perfil farmacocinético, com formulações oral e intravenosa, bem toleradas pelos pacientes (GÓMEZ-LOPEZ et al., 2008b; RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELLA, 2009; CUENCA-ESTRELLA, 2010). O itraconazol apresenta um espectro de ação mais amplo que o fluconazol, sendo ativo contra leveduras e aos fungos filamentosos. Entretanto, a maioria das leveduras resistentes ao fluconazol acaba desenvolvendo resistência cruzada ao itraconazol (SABATELLI et al., 2006).

Métodos para investigar a susceptibilidade *in vitro* aos fármacos antifúngicos também foram desenvolvidos a partir do aparecimento de espécies resistentes, da disponibilidade de novos fármacos, do aumento do consumo de antifúngicos disponíveis para tratamento e prevenção das infecções fúngicas invasivas e da ocorrência de falhas terapêuticas no tratamento destas infecções (SANGLARD; ODDS, 2002; HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004; ARIKAM, 2007).

O parâmetro mais tradicional para avaliar a susceptibilidade aos fármacos antifúngicos é baseado na concentração inibitória mínima (CIM). Esta é definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento fúngico no teste de susceptibilidade aos antifúngicos por diluição em ágar ou caldo (CLSI, 2002a; CUENCA-ESTRELLA; RODRIGUEZ-TUDELA, 2002).

Em 1997, foi publicado um método de referência (M27-A) para testes de diluição em caldo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para determinação da susceptibilidade aos fármacos antifúngicos de *Candida* spp. (incluindo *C. glabrata*) e *Cryptococcus neoformans* (CLSI, 1997). Em 2002, foram publicados os documentos M27-A2 e M27-S2 que tratam da seleção e preparação dos agentes antifúngicos, da implementação e interpretação dos testes, e dos controles de qualidade (CLSI, 2002a; 2002b). Em 2008, foram publicados os documentos M27-A3 e o M27-S3 que incluem os pontos de corte para as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) e para o voriconazol (CLSI, 2008a; 2008b). A última versão deste documento foi publicado em 2012 (M27-S4) que inclui pontos de corte espécie-específicos para as cinco espécies mais comuns de *Candida* e *C. guilliermondii* (CLSI, 2012).

A microdiluição em caldo segundo o documento M27-A3 é o método de referência padronizado pelo CLSI para testar a susceptibilidade aos antifúngicos de leveduras que

causam infecções invasivas, como *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* (CLSI, 2008a). Apresenta boa reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial para a avaliação *in vitro* dos testes de susceptibilidade aos antifúngicos (REX et al., 2001; CUENCA-ESTRELLA et al., 2002; PFALLER et al., 2010), porém é um método trabalhoso e que exige habilidade técnica para a realização e a interpretação dos resultados (GIOLO; ESTIVALET-SVIDZINSKI, 2010). Métodos comerciais vêm sendo utilizados para minimizar esse problema. Dentre eles podemos citar Etest[®] e o sistema automatizado Vitek[®] 2 (AST Card YS01) (bioMérieux SA, France) (PFALLER et al., 2007; BORGHI et al., 2010; BOURGEOIS et al., 2010; CUENCA-ESTRELLA et al., 2010b).

Outro método para testar a susceptibilidade aos antifúngicos de leveduras é o teste de disco difusão (M44-A2) (CLSI, 2009a). Ao contrário da microdiluição em caldo, este método não utiliza variações de concentrações de antifúngicos. O critério de leitura segundo o documento M44-S3 (CLSI, 2009b) é a medida das zonas de inibição do crescimento das leveduras, sendo os microrganismos classificados como susceptíveis, susceptíveis dependente da dose, resistentes ou não susceptíveis, de acordo com o fármaco em questão e o tamanho do halo de inibição (CLSI, 2009a).

Embora seja rara a resistência à anfotericina B para *Candida* spp., há relatos de isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* considerados resistentes à anfotericina B (SILVA et al., 2009; CANTÓN et al., 2011). *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* também já foram descritas com CIMs ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B (LOCKHART et al., 2008a). No Brasil, estudos encontraram resistência à anfotericina B entre as espécies do complexo *psilosis* (GONÇALVES et al., 2010; BONFIETTI et al., 2012; PURISCO et al., 2012; FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2014).

Chen et al. (2010), em Taiwan, identificaram um isolado susceptível dependente da dose e dois isolados resistentes ao fluconazol de *C. metapsilosis*. *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis* foram susceptíveis ao fármaco em questão. Em um estudo multicêntrico envolvendo 334 isolados do complexo *psilosis*, oriundos de 44 instituições de saúde espanholas, a susceptibilidade *in vitro* frente a nove fármacos antifúngicos foi verificada pelo método da microdiluição em caldo de acordo com o CLSI (M27-A3) e nenhum isolado de *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foi resistente ao fluconazol de acordo com os pontos de corte clínicos adotados pelo CLSI (CLSI, 2008b). Porém, os intervalos dos valores de CIM mais elevados foram observados para *C. parapsilosis stricto sensu* (0,06 a 32 $\mu\text{g/mL}$) e *C. orthopsilosis* (0,25 a 16 $\mu\text{g/mL}$) (CANTÓN et al., 2011).

No Brasil, três estudos distintos descrevendo o perfil de susceptibilidade de isolados do complexo *psilosis* observaram que *C. parapsilosis stricto sensu* apresentaram valores de CIM mais elevados em comparação com *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, sendo encontrados isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* susceptíveis dependente da dose e resistentes ao fluconazol (GONÇALVES et al., 2010; BONFIETTI et al., 2012; PURISCO et al., 2012).

De acordo com um estudo brasileiro que avaliou 109 isolados do complexo *psilosis* obtidos de 11 centros hospitalares localizados no estado de São Paulo no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2008, *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis* foram susceptíveis ao voriconazol (PURISCO et al., 2012). No entanto, outro estudo brasileiro também realizado no estado de São Paulo, porém mais abrangente, envolvendo isolados obtidos desde 1997 até 2011, identificou três isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* resistentes ao voriconazol (BONFIETTI et al., 2012). Dados internacionais demonstram intervalos de valores de CIMs mais elevados para o voriconazol (GOMEZ-LOPEZ et al., 2008a; CANTÓN et al., 2011) e isolados resistentes (SILVA et al., 2009; BORGHI et al., 2011) para *C. parapsilosis stricto sensu*.

Metin et al. (2011), em estudo comparativo avaliando a susceptibilidade antifúngica de *Candida* spp. isoladas de hemocultura pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI e pelo Etest[®], descreveram três isolados de *C. parapsilosis* como susceptíveis dependente da dose pelo Etest[®] e susceptíveis pelo CLSI para o itraconazol. Figueiredo-Carvalho et al. (2014), também em estudo comparativo avaliando a susceptibilidade antifúngica de isolados de fungemia do complexo *C. parapsilosis* pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI, pelo Etest[®], e pelo Vitek[®] 2, descreveram quatro isolados de *C. orthopsilosis* como susceptíveis dependente da dose pelo Etest[®] e susceptíveis pelo CLSI para o itraconazol.

2 JUSTIFICATIVA

A prevalência de *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* associada a episódios de fungemia vem aumentando na última década no Brasil (SILVA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010; BONFIETTI et al., 2012) e em vários países do mundo (GIUSIANO et al., 2004; PFALLER et al., 2008; CISTERNA et al., 2010).

C. parapsilosis stricto sensu, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, fenotipicamente indistinguíveis, ainda não são diferenciadas por exames laboratoriais convencionais, mas com o auxílio de técnicas moleculares estas espécies podem ser distinguidas (HENSGENS et al., 2009). Desta forma, a correta identificação das espécies permite: (i) uma avaliação epidemiológica; (ii) possível influência clínica na escolha terapêutica para tratamento de infecções fúngicas invasivas causadas por essas espécies, uma vez que estudos demonstram diferenças no perfil de susceptibilidade a diferentes fármacos antifúngicos; e (iii) possível auxílio na definição do prognóstico destas infecções, já que estudos apontam diferenças na virulência destas três espécies (GÁCSEK et al., 2007a; GARCIA-EFFRON et al., 2008; van ASBECK; CLEMONS; STEVENS, 2009; NÉMETH et al., 2013; FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2014).

O uso potencial de ferramentas moleculares para estudos epidemiológicos é importante para a compreensão da dinâmica de um microrganismo patogênico na população humana através dos quais se torna possível o acesso a informações inter e intra específicas permitindo auxílio para: (i) decifrar a complexa relação entre colonização e infecção; (ii) identificar a origem de uma infecção; (iii) monitorar o surgimento de cepas resistentes a antifúngicos; e (iv) para observar as relações genéticas (SOLL, 2000).

A molécula de DNA tem sido o principal alvo de estudos quando se necessita de exata identificação e de informações a respeito de polimorfismos, pois a sequência é única para cada indivíduo e essa sequência pode ser explorada para estudos de diversidade genética e correlação entre indivíduos (WEISING; ATKINSON; GARDNER, 1995; BORMANN, LINTON, MILES, 2008).

Deste modo, nossa hipótese é que: existe uma concordância entre as técnicas de identificação molecular e uma de tipagem frente aos isolados do complexo *psilosis*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar diferentes metodologias de identificação molecular e uma de tipagem em isolados de *C. parapsilosis lato sensu* obtidos de pacientes internados entre 1998 e 2006 com episódios de fungemia em três hospitais do município do Rio de Janeiro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar, por análises fenotípicas, a identidade dos isolados em estudo como *C. parapsilosis lato sensu*;
- Caracterizar por três métodos moleculares e um de tipagem, o complexo *psilosis*;
- Reportar a frequência das espécies de *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* nos hospitais estudados;
- Comparar a PCR espécie-específica, a PCR-RFLP e os Microsatélites com o Sequenciamento da região D1/D2 do rDNA (método empregado como padrão ouro neste trabalho);
- Analisar em conjunto os resultados do Sequenciamento da região D1/D2 do rDNA com os resultados dos Microsatélites.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLADOS CLÍNICOS

Foram incluídos neste estudo retrospectivo 100 isolados (amostragem de conveniência) de *C. parapsilosis lato sensu* oriundos de amostras de hemocultura ou de cateter (**APÊNDICE A**). Todos foram obtidos de pacientes com episódios de fungemia que estavam internados em três hospitais, Hospital dos Servidores do Estado (HSE), Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e Hospital Samaritano (SAM), localizados no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006. Os isolados foram identificados por métodos convencionais (CHROMagar[®] *Candida* e API[®] 20 C AUX) em suas instituições de origem e estavam armazenados a -20°C (*Skim Milk* a 20%), a -70°C (infusão cérebro-coração BHI+glicerol a 30%) ou em água destilada estéril no acervo de fungos do Setor de Imunodiagnóstico, Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Um esquema geral de metodologia encontra-se na **Figura 3**.

4.2 CEPAS DE REFERÊNCIA

C. albicans (ATCC 18804), *C. tropicalis* (ATCC 13803), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foram utilizadas como padrão de referência no CHROMagar[®] *Candida*. *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. orthopsilosis* (ATCC 96141) e *C. metapsilosis* (ATCC 96143) foram utilizadas como cepas de referência para os métodos de identificação molecular.

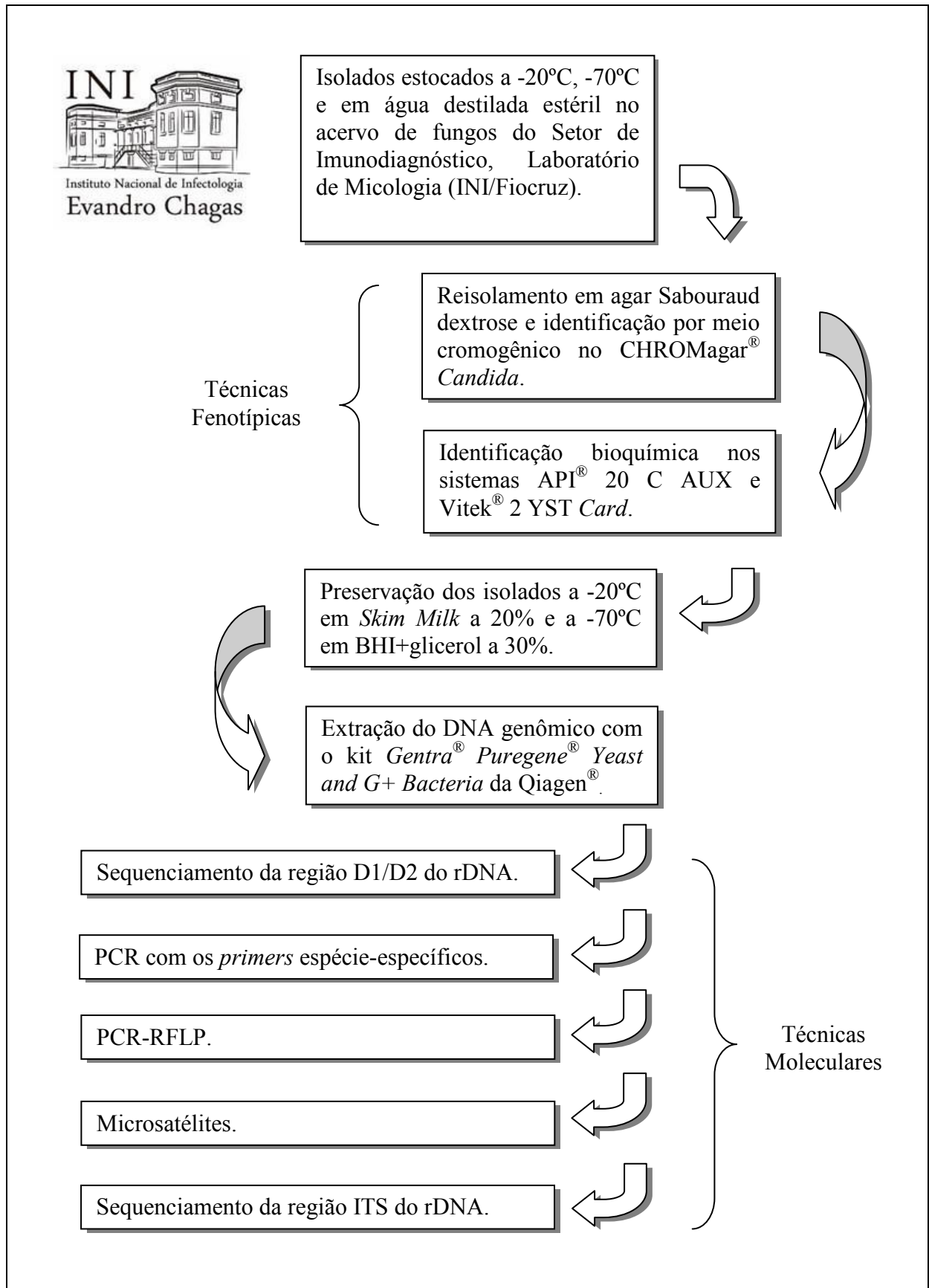


Figura 3: Esquema geral de metodologia. Resumo do fluxo de metodologias empregadas neste trabalho. Fonte: elaborado pelo autor.

4.3 CONFIRMAÇÃO FENOTÍPICA

4.3.1 Re-isolamento e identificação por meio cromogênico

Todos os isolados de *C. parapsilosis lato sensu* estocados a -20, -70°C e em água destilada estéril foram semeados tanto no meio agar Sabouraud dextrose (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) quanto no CHROMagar[®] *Candida* (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) ambos pela técnica de esgotamento (movimentos de estrias) em placas de Petri (90 mm) (ANVISA, 2004) para avaliar a viabilidade, pureza, detecção de culturas mistas e obtenção de colônia única. Todas as placas foram incubadas a 35°C por 24-72 horas. A interpretação dos resultados foi baseada na observação macroscópica das colônias no agar Sabouraud dextrose, e de acordo com as orientações do fabricante para o CHROMagar[®] *Candida*, assim sendo: colônias verde, *C. albicans*; azul metálico, *C. tropicalis*; rosa, rugosa, *C. krusei*; e branca a rosada para as demais espécies.

4.3.2 Identificação bioquímica

4.3.2.1 Sistema API[®] 20 C AUX

Após crescimento em agar Sabouraud dextrose (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) em tubos de ensaio (12 x 150 mm) com tampas de rosca mantidos à temperatura de 35°C por 24 horas, com auxílio de uma alça de semeadura de 10 µL foi preparada uma suspensão homogênea da levedura em uma ampola API[®] NaCl a 0,85% (2 mL) (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France), equivalente ao padrão n° 2 da escala de McFarland. Na sequência, uma alíquota de 100 µL dessa suspensão foi transferida para outra ampola denominada API[®] C *Medium* (7 mL) (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) e homogeneizada por pipetagem. As cúpulas da galeria API[®] 20 C AUX (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) foram preenchidas com 200 µL da suspensão obtida em API[®] C *Medium* evitando a formação de bolhas. A seguir, a galeria foi incubada à temperatura de 30°C por até 72 horas em câmara úmida. A leitura foi feita por comparação com os controles de crescimento (teste “0” livre de substrato, controle negativo; teste “GLU” contendo D-glucose, controle positivo) (ANEXO A). O teste morfológico, que determina a presença de

hifas e pseudohifas, na qual constitui o 21.º teste da galeria foi realizado em meio agar *Corn Meal Tween 80* a 35°C por 48 horas. A identificação foi realizada pela plataforma *apiweb*TM na internet com a introdução do perfil numérico (bionúmero) (*API*[®] 20 C AUX, bioMérieux, França).

4.3.2.2 Sistema Vitek[®] 2 para identificação de leveduras (*YST Card*)

Na sequência do crescimento em agar Sabouraud dextrose em tubos de ensaio mantidos à temperatura de 35°C por 24 horas, com auxílio de uma alça de sementeira de 10 µL foi preparada uma suspensão homogênea da levedura em 3 mL de salina estéril a 0,45% em tubos de ensaio de poliestireno transparente (10 x 75 mm). A densidade óptica dessa suspensão foi verificada por um densitômetro (*DensiCheck*TM, bioMérieux) e ajustada para o padrão n° 2 da escala de McFarland. O tubo contendo a suspensão e o cartão de identificação de leveduras *YST Card* (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) foram dispostos em estante própria e inseridos no compartimento superior esquerdo do aparelho com o objetivo da suspensão de levedura ser distribuída entre os poços do cartão. Em seguida, a estante foi direcionada ao compartimento inferior direito do aparelho para a realização das etapas de selagem, incubação a 35,5°C por um período de aproximadamente 18 horas e leitura do cartão (HATA et al., 2007; VITEK 2 Systems, bioMérieux, França).

4.4 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Após confirmação fenotípica, os isolados clínicos do complexo *psilosis* foram semeados em tubos de ensaio (20 x 200 mm) contendo agar batata dextrose (PDA) (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) e incubados a 35°C por 24-48 horas para obtenção de massa celular. Em seguida, dois crioprotetores foram utilizados, *Skim Milk* a 20% (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) e BHI+glicerol a 30% (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA). Foram adicionados 5 mL de cada meio crioprotetor em diferentes tubos de PDA contendo o crescimento da levedura de *C. parapsilosis* e homogeneizado por pipetagem. Alíquotas de 1 mL destas suspensões (meio crioprotetor + leveduras de *C.*

parapsilosis) foram distribuídas em criotubos de 2,0 mL e mantidas a temperatura de -20°C e -70°C, respectivamente, para posterior cultivo e extração de DNA.

4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

4.5.1 Extração do DNA genômico

Para a extração do ácido desoxiribonucléico (DNA), os isolados foram previamente descongelados e semeados em placas de Petri (90 mm) contendo o meio agar Sabouraud dextrose. Após crescimento a 35°C por 48 horas e partindo de colônia única, foram repicados no mesmo meio de cultura e incubados *overnight* a 35°C para obtenção de massa celular. O DNA genômico da levedura foi extraído utilizando o kit *Gentra® Puregene® Yeast and G+ Bacteria* (Qiagen®, Maryland, USA) de acordo com as instruções do fabricante e quantificado por espectrofotometria (NanoVue Plus™ GE Healthcare). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão 1X TBE (0,1 M Tris-HCl pH 8,4; 0,09 M de ácido bórico; 0,001 M EDTA) por aproximadamente 1 hora sob uma tensão de 90 V. A seguir, o gel foi submerso numa solução de brometo de etídio (Invitrogen™, Carlsbad, CA USA) a uma concentração final de 0,5 µg/mL por 30 minutos e as bandas observadas sob luz ultravioleta (UV) de um transiluminador (HOEFER®, MacroVue UV-20).

4.5.2 Amplificação e Sequenciamento da região D1/D2 do rDNA

A reação de amplificação da região D1/D2 da subunidade maior (28S) do DNA ribossomal foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 50 ng do DNA, 1X tampão da PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂; Invitrogen™ Brasil), 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP; Invitrogen™ Carlsbad, CA, USA), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen™ Brasil), e 10 pmol de cada *primer* (Invitrogen™ Brasil) NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (ASADZADEH et al., 2009). A PCR foi realizada em um termociclador Bio Rad (modelo C 1000) com um ciclo inicial de 5 minutos de desnaturação a 95°C; 30 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 95°C, 30 segundos de pareamento a 60°C e

extensão de 1 minuto a 72°C; seguido de uma extensão final de 10 minutos a 72°C. O produto amplificado obtido foi purificado com o QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN®) de acordo com instruções do fabricante e enviado à Plataforma de Sequenciamento Genômico PDTIS/Fiocruz, utilizando o sequenciador ABI-3730 (Applied Biosystems) onde foi utilizado como molde de DNA para a reação de sequenciamento das fitas *sense* e *anti-sense* com o kit comercial *Big Dye Terminator Sequencing* (Applied Biosystems). As sequências foram editadas usando o programa *Sequencher* versão 4.9 (Genes Codes Corporation), alinhadas e analisadas com o programa MEGA versão 4.0.2 (TAMURA et al., 2007). Por fim, as sequências foram comparadas com as depositadas no banco de dados do NCBI/*GenBank*.

4.5.3 PCR com *primers* espécie-específicos

Cada isolado foi submetido a três diferentes reações, sendo que cada reação com seu respectivo par de *primers* espécie-específicos (**Quadro 1**) para a região ITS1-5.8S-ITS2, dessa forma cada PCR foi realizada utilizando 50 µL (volume final) de mistura da reação (ASADZADEH et al., 2009). Cada reação consistiu em 50 ng de DNA da levedura, em 1X tampão de PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂; Invitrogen™ Brasil), contendo 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), 10 pmol de cada par de *primers* (Invitrogen™ Brasil) e 1 unidade (U) de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen™ Brasil). A PCR foi realizada em um termociclador Bio Rad (modelo C 1000) com um ciclo inicial de 5 minutos de desnaturação a 95°C; 30 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 95°C, 30 segundos de pareamento a 63°C e extensão de 1 minuto a 72°C; seguido de uma extensão final de 10 minutos a 72°C. O produto amplificado foi concentrado a 20 µL no equipamento MicroVac™ modelo MV-100. Após a adição de *loading buffer* (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% e glicerol 30%), na concentração de 1µL de corante para cada 5 µL de produto amplificado concentrado, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1 X a 90 V durante 80 min. Em seguida, o gel foi imerso em uma solução de brometo de etídio (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) numa concentração final de 0,5 µg/mL durante 30 minutos, observado e fotografado sob luz UV de um transiluminador (HOEFER®, MacroVue UV-20).

<i>Primers</i>	Gene alvo	Sequência (5'→3')	Espécie-específica	Tamanho do amplicon
CPAF CPAR	ITS1 ITS2	TTTGCTTTGGTAGGCCTTCTA GAGGTCTGAATTTGGAAGAAGT	<i>C. parapsilosis</i> <i>stricto sensu</i>	379 pb
CORF CORR	ITS1 ITS2	TTTGGTGGCCCCACGGCCT TGAGGTCTGAATTTGGAAGAATT	<i>C. orthopsilosis</i>	367 pb
CMEF CMER	ITS1 ITS2	TTTGGTGGGCCCCACGGCT GAGGTCTGAATTTGGAAGAATGT	<i>C. metapsilosis</i>	374 pb

Quadro 1: *Primers* espécie-específicos utilizados para discriminação molecular do complexo *psilosis* tendo como alvo a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. Fonte: adaptado de Asadzadeh et al., 2009.

4.5.4 PCR-RFLP

A reação de amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal foi realizada conforme Muniz et al. (2010) em um volume final de 50 µL contendo 50 ng do DNA, 1X tampão da PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂; Invitrogen™ Brasil), 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen™ Brasil), e 50 ng de cada *primer* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). A PCR foi realizada em um termociclador Bio Rad (modelo C 1000) com um ciclo inicial de 5 minutos de desnaturação a 95°C; 35 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de pareamento a 55°C, extensão de 1 minuto a 72°C; seguido de uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Do produto amplificado foi removido 25 µL e duplamente digerido com enzimas de restrição (5U de *Sau96I* e 6U de *HhaI* em um volume final de 30 µL) por 3 horas a 37°C. Os fragmentos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TBE 1X a 100 V durante aproximadamente 2 horas. Em seguida, o gel foi imerso em uma solução de brometo de etídio (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) numa concentração final de 0,5 µg/mL durante 30 minutos, observado e fotografado sob luz UV de um transiluminador (HOEFER®, MacroVue UV-20). A estimativa dos pesos moleculares dos fragmentos gerados após a ação enzimática foram obtidos com auxílio do programa FastPCR versão 6.0 nas sequências FJ872015, EU564208 e EU564207 oriundas do GenBank, referentes a *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. orthopsilosis* ATCC 96141 e *C. metapsilosis* ATCC 96143, respectivamente.

4.5.5 Microsatélites

Utilizamos neste método de tipagem os Microsatélites CP1, CP4a, CP6 e B em uma PCR multiplex conforme metodologia descrita por Sabino et al. (2010) com modificações por Vaz et al. (2011). Este método foi realizado no Laboratório de Microbiologia 2 do Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA), Departamento de Biologia, Escola de Ciências, Universidade do Minho, em Braga, Portugal, por meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) por intermédio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Após crescimento das leveduras em placas de meio agar de extrato de levedura, peptona e dextrose (YPD) incubadas a 30°C por 48 horas, uma colônia única foi removida do meio com auxílio de uma ponteira de 10 µL e distribuídas na porção final do tubo de PCR substituindo a adição de DNA seguindo um protocolo denominado “reação em cadeia da polimerase em colônia” (*colony PCR*). As células foram lisadas em microondas na potência máxima por 90 segundos e imediatamente colocadas em gelo para inibir a degradação do DNA. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 1X de tampão da PCR (75 mM Tris-HCL pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20, InvitrogenTM, Carlsbad, CA, EUA), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (InvitrogenTM, Carlsbad, CA, EUA), 0,06 µM dos pares de *primers* CP1 e CP4a, 0,05 µM do par de *primer* CP6, e 0,04 µM do par de *primer* B (**Quadro 2**), e 1 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (InvitrogenTM, Carlsbad, CA, EUA). Após 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C a PCR foi realizada por 30 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de pareamento a 60°C, extensão de 1 minuto a 72°C; seguido de uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Microsatélites (nucleotídeos)	Sentido	<i>Primers</i> Sequência (5'→3')
CP1 (AAG)	<i>Forward</i>	AAAGTGCTACACACGCATCG
	<i>Reverse</i>	GGCTTGCAATTTTCATTTCT
CP4a (AAC)	<i>Forward</i>	CGGTATTGCGGAAAAATTCA
	<i>Reverse</i>	TCGCTTGGACAACCTGGTGTGA
CP6 (AAC)	<i>Forward</i>	CAGGAACAGGACAATGGTGA
	<i>Reverse</i>	TCTGGAGCCTCTAGGACGTT
B (CA)	<i>Forward</i>	AGGTTTGTAGTAGTGTCCCTATGG
	<i>Reverse</i>	TATCTCTCTCGCCATTTGAACG

Quadro 2: *Primers* utilizados nos isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* na tipagem pelos microsatélites. Fonte: adaptado de Vaz et al., 2011.

Em seguida a PCR, os produtos amplificados foram diluídos 1:5 com uma mistura composta de formamida e TAMRA (24:1) (padrão interno, GenScan 500 6-carboxitetrametilrodamina, Applied Biosystems). Em seguida, as amostras foram submetidas ao sistema ABI 310 *genetic analyzer* (Applied Biosystems) para a determinação do tamanho do alelo pelo *software* de análise GeneScan (versão 3.7). Somente os primers *Forward* de cada par de *primers* foram marcados com fluorocromos: CP1 foi marcado com o tetracloro-6-carboxifluoresceína (TET), CP4a foi marcado com 6-carboxihexafluoresceína (HEX), e CP6 e B foram marcados com 6-carboxifluoresceína (FAM) pois apresentam faixas de leitura diferenciada. Os alelos foram designados pelos seus tamanhos em pares de bases. A matriz de distância entre os isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* foram geradas utilizando o método de Cavalli-Sforza & Edwards com o programa Population versão 1.2.28 (<http://www.cnrs-gif.fr/pge>), e o dendrograma construído pelo método UPGMA com o programa NTSYSpc versão 2.02h (Applied Biostatistics Inc.). Frequências alélicas e genotípicas para cada *locus* foram determinadas pelo programa Genepop versão 4.0.7 (<http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/>), enquanto que as frequências genotípicas em *multilocus* foram calculadas pelo programa Arlequin versão 3.5.1.3. Por fim, o poder discriminatório foi calculado como descrito por Hunter e Gaston (1988) para cada microsatélite em separado e em *multilocus*.

Isolados com mesma combinação alélica para todos os *loci* analisados correspondem a estirpes geneticamente similares e são definidas como idênticas, enquanto que isolados com combinação alélica distinta para mais de um *locus* correspondem a estirpes geneticamente

dissimilares e são definidas como diferentes, ao passo que isolados com dissimilaridade em apenas um *locus* são considerados casos de microvariação (SABINO et al., 2010).

4.5.6 Amplificação e Sequenciamento da região ITS do rDNA

A reação de amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 100 ng do DNA, 1X tampão da PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂; Invitrogen™ Brasil), 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP; Invitrogen™ Carlsbad, CA, EUA), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen™ Brasil), e 10 pmol de cada *primer* (Invitrogen™ Brasil) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (ASADZADEH et al., 2009). A PCR foi realizada em um termociclador Bio Rad (modelo C 1000) com um ciclo inicial de 5 minutos de desnaturação a 95°C; 30 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de pareamento a 55°C e extensão de 1 minuto a 72°C; seguido de uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O produto amplificado obtido foi purificado com o QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN®) de acordo com instruções do fabricante e enviado à Plataforma de Sequenciamento Genômico PDTIS/Fiocruz, utilizando o sequenciador ABI-3730 (Applied Biosystems) onde foi utilizado como molde de DNA para a reação de sequenciamento das fitas *sense* e *anti-sense* com o kit comercial *Big Dye Terminator Sequencing* (Applied Biosystems). As sequências foram editadas usando o programa *Sequencher* versão 4.9 (Genes Codes Corporation), alinhadas e analisadas com o programa MEGA versão 4.0.2 (TAMURA et al., 2007). Por fim, as sequências foram comparadas com as depositadas no banco de dados do NCBI/*GenBank*.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados categóricos (epidemiológicos) foram analisados usando o teste exato de Fisher e resultados foram considerados estatisticamente significativos quando P abaixo de 0,05. Para a avaliação do grau de concordância entre as técnicas de biologia molecular foi utilizado o coeficiente Kappa de acordo com a classificação de Landis e Koch (1977) (ANEXO C).

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRAGEM E DADOS

De um total de 100 *Candida parapsilosis lato sensu* isolados de casos de fungemia, obtidos no período de 1998 a 2006, obtivemos 17 amostras isoladas de cateter e 83 de sangue (hemoculturas), oriundos de três diferentes hospitais: 76% do HSE, 20% do HUPE e 4% do SAM. Dentre estes 100 isolados, 78 pertencem a 44 pacientes, desta forma, com base nas informações disponíveis destes pacientes, obtivemos 27 (61,4%) pacientes do sexo masculino e 17 (38,6%) do sexo feminino. Quanto a classificação etária obtivemos 14,7% crianças ou adolescentes (< 18 anos) e 85,3% adultos \geq 18 anos). Os dados demográficos de dois isolados do HSE e todos (20 isolados) do HUPE não puderam ser recuperados, dessa forma não se pôde construir a informação destes pacientes. Quanto à independência amostral obtivemos: quatro pacientes com quatro amostras (16), cinco pacientes com três amostras (15), 12 pacientes com duas amostras (24) e os demais pacientes (23) com uma amostra cada. As amostras oriundas do mesmo paciente foram diferenciadas por data de coleta e/ou origem (cateter/sangue). Todos os dados disponíveis dos pacientes encontram-se no **APÊNDICE A**.

5.2 CONFIRMAÇÃO FENOTÍPICA

5.2.1 Macromorfologia

Em agar Sabouraud dextrose, observamos pigmentação que variava levemente do branco ao creme com reverso incolor; bordas delineadas e por vezes apresentando uma leve aparência rendada por conta de maior tempo de incubação quando permanecidas na estufa; textura cremosa e homogênea com aspecto úmido ou seco; relevo glabro e com o passar do tempo fracamente rugoso e; quanto ao brilho verificamos ora de aspecto brilhoso ora opaco (**Figura 4**).

Em meio cromogênico (CHROMagar[®] *Candida*) todos os isolados apresentaram colônias de pigmentação branca-rosácea. Não foram observadas colônias de cor verde, azul e rosa rugosa, assim descartando a presença de colônias mistas com *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, respectivamente (**Figura 5**).

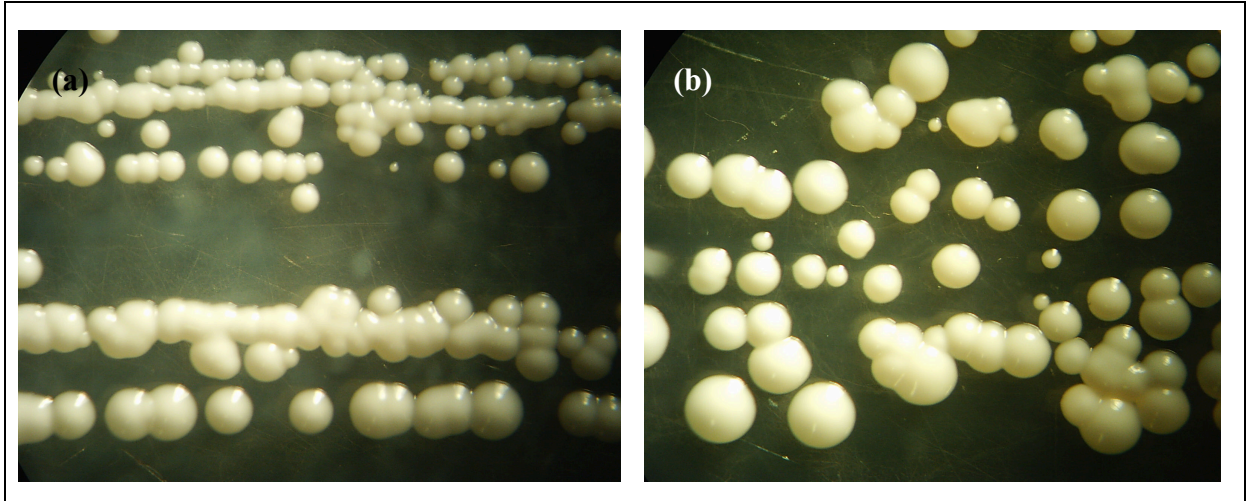


Figura 4: Macromorfologia do cultivo em agar Sabouraud dextrose por 72 horas a 35°C. Representativo com dois diferentes isolados: **(a)** 33286HSE e **(b)** 70158HUPE. Fonte: elaborado pelo autor, as fotos foram obtidas apoiado-se a objetiva da câmera fotográfica digital Sony DSC-H10 na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X.

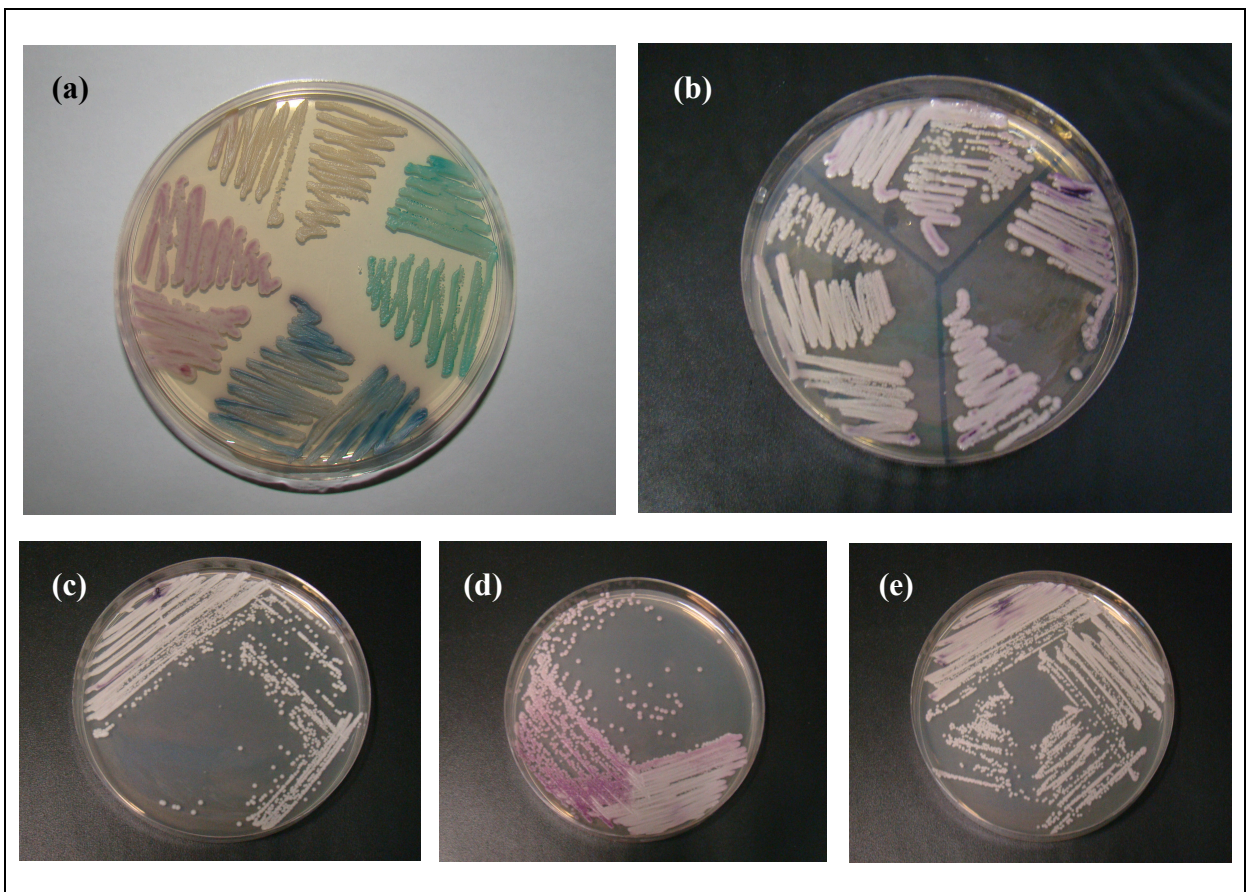


Figura 5: Chromagar[®] *Candida* por 72 horas a 35°C. Cepas ATCCs e três diferentes isolados. **(a)** No sentido horário a partir de 12h: cor branca *C. parapsilosis* ATCC 22019, cor verde *C. albicans* ATCC 18804, cor azul *C. tropicalis* ATCC 13803 e rosa rugosa *C. krusei* (ATCC 6258). **(b)** No sentido horário a partir de 12h: *C. orthopsilosis* ATCC 96141, *C. metapsilosis* ATCC 96143 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. **(c)** **(d)** e **(e)** Representativo com três diferentes isolados, 24775HSE, 25381HSE e 25011112911SAM, respectivamente. Fonte: elaborado pelo autor com auxílio da câmera digital Sony DSC-H10.

5.2.2 Identificação bioquímica

Todos os 100 isolados investigados pelo API[®] 20 C AUX foram identificados como *C. parapsilosis* e apresentaram taxa de probabilidade que variou de 91,2 a 99,9%, sendo a média do percentual de probabilidade de 99,5%. Pelo sistema automatizado Vitek[®] 2 YST Card, 96 isolados foram identificados como *C. parapsilosis* e estes apresentaram taxa de probabilidade que variou de 86,0 a 99,0%, sendo a média do percentual de probabilidade de 96,4% (**Tabela 1**); os outros quatro isolados, mesmo realizando o teste em triplicata, apresentaram baixa discriminação. Os resultados referentes à identificação bioquímica encontram-se no **APÊNDICE B**.

Tabela 1: Caracterização bioquímica dos 100 isolados *C. parapsilosis* oriundos de amostras de sangue e cateter de pacientes com fungemia internados em três hospitais no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006.

Métodos	n	Moda (%)	Mediana (%)	Média (%)	IC 95 (%)
API [®] 20 C AUX	100	99,9	99,9	99,5	99,2 – 99,7
Vitek [®] 2 YST Card	96	99,0	97,0	96,4	95,9 – 97,0

IC, intervalo de confiança.

5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

5.3.1 Sequenciamento da região D1/D2 do rDNA

O sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal dos 100 isolados, quando comparados com as sequências depositadas no GenBank e sucessiva análise no programa MEGA versão 4.0.2 na construção do dendrograma (**Figura 6**), revelou 61 *C. parapsilosis stricto sensu*, 37 *C. orthopsilosis* e duas *C. metapsilosis*. Todas as sequências foram depositadas no GenBank sob os números de acesso KJ817066 a KJ817165. As cepas de referência *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. orthopsilosis* ATCC 96141 e *C. metapsilosis* ATCC 96143 também foram sequenciadas (**Figura 7**) e depositadas no GenBank com os respectivos números de acesso KJ463413, KJ463414 e KJ463415. Vale ressaltar que na posição 176 das 570 bases da região D1/D2 para *C. orthopsilosis*, observamos 18 isolados (todos do HSE) contendo adenina e 19 isolados (11 do HSE e 8 do HUPE) contendo timina,

assim como a cepa de referência ATCC 96141, por isso uma divisão em dois grupos foi observada no dendrograma. Os 18 isolados, identificados como *C. orthopsilosis*, com polimorfismo T→A, ocorreram em 10 pacientes oriundos do mesmo hospital (HSE), entre 29/08/2002 (paciente n.º 43, código da amostra n.º 53) e 05/12/2005 (paciente n.º 11, código da amostra n.º 97).

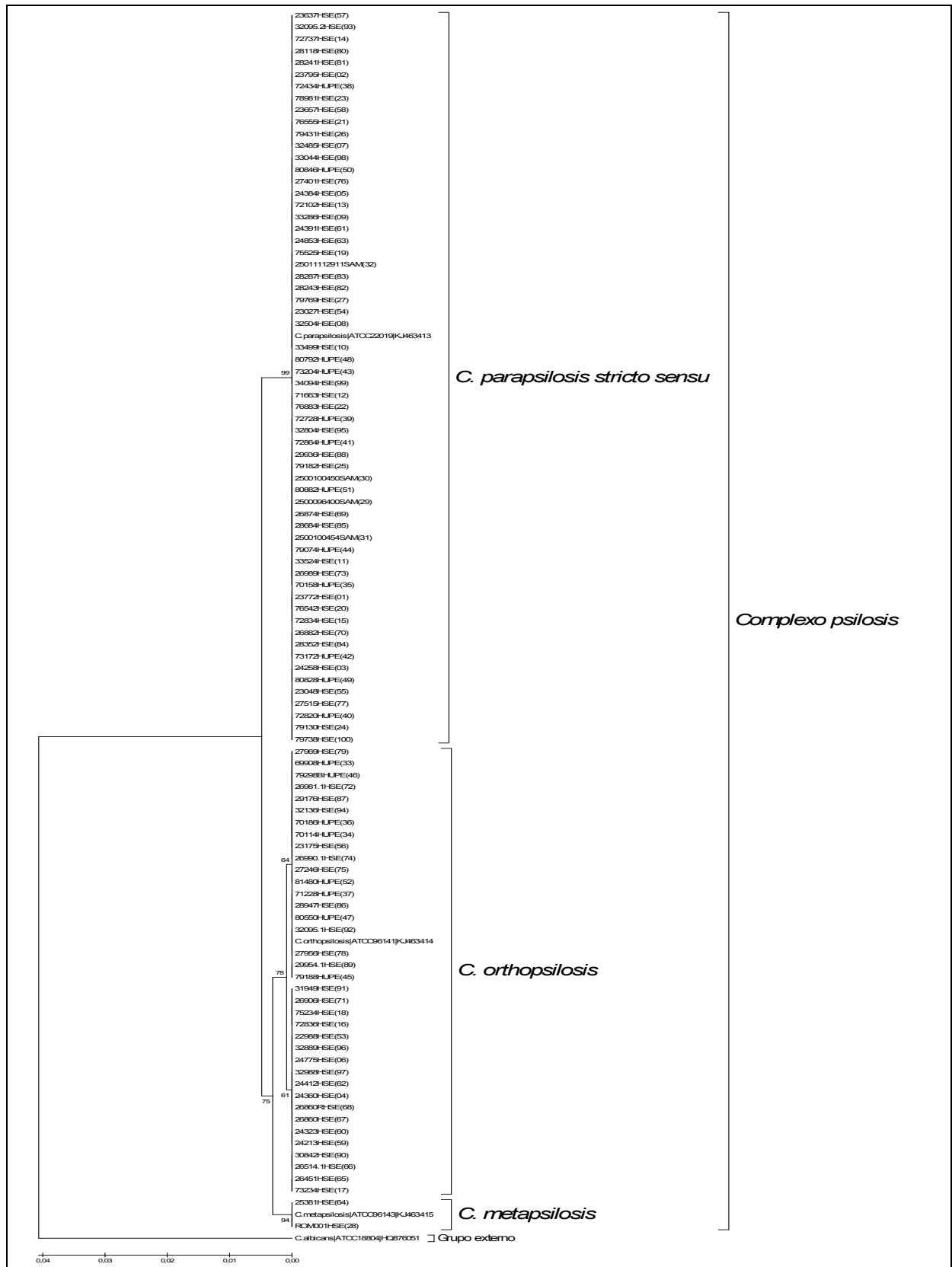


Figura 6: Dendrograma baseado na análise da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal de 104 táxons (100 isolados, três cepas ATCCs e uma sequência oriunda do GenBank, *C. albicans* ATCC 18804). A história evolutiva foi inferida usando o método UPGMA. A porcentagem dos agrupamentos ao utilizar um *bootstrap* de 1000 réplicas encontra-se ao lado dos ramos. A distância evolutiva foi computada utilizando o método *Maximum Composite Likelihood*. Um total de 570 bases foi observado no conjunto final. Fonte: elaborado pelo autor com o programa MEGA 4.0.2.

C.parapsilosis ATCC22019	AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCA	50
C.orthopsilosis ATCC96141	AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCA	50
C.metapsilosis ATCC96143	AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCA	50

C.parapsilosis ATCC22019	AATTTGAAATCTGGCACTTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTA	100
C.orthopsilosis ATCC96141	AATTTGAAATCTGGCACTTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTA	100
C.metapsilosis ATCC96143	AATTTGAAATCTGGCACTTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTA	100

C.parapsilosis ATCC22019	TC TT TGGG TCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAG	150
C.orthopsilosis ATCC96141	TC TT TGGG TCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAG	150
C.metapsilosis ATCC96143	TC TT TGGG TCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAG	150

C.parapsilosis ATCC22019	GGTGAGAATCCCGTGCATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAGTTCCCTTC	200
C.orthopsilosis ATCC96141	GGTGAGAATCCCGTGCATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAGTTCCCTTC	200
C.metapsilosis ATCC96143	GGTGAGAATCCCGTGCATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAGTTCCCTTC	200

C.parapsilosis ATCC22019	GAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCA	250
C.orthopsilosis ATCC96141	GAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCA	250
C.metapsilosis ATCC96143	GAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCA	250

C.parapsilosis ATCC22019	TCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATG	300
C.orthopsilosis ATCC96141	TCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATG	300
C.metapsilosis ATCC96143	TCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATG	300

C.parapsilosis ATCC22019	GAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGT	350
C.orthopsilosis ATCC96141	GAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGT	350
C.metapsilosis ATCC96143	GAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGT	350

C.parapsilosis ATCC22019	TGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCT	400
C.orthopsilosis ATCC96141	TGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCT	400
C.metapsilosis ATCC96143	TGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCT	400
	***** *	
C.parapsilosis ATCC22019	CGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGG	450
C.orthopsilosis ATCC96141	CGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGG	450
C.metapsilosis ATCC96143	CGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGG	450

C.parapsilosis ATCC22019	ATAAGTGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTG	500
C.orthopsilosis ATCC96141	ACAATTGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTG	500
C.metapsilosis ATCC96143	AGAATTGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTG	500
	* * * *****	
C.parapsilosis ATCC22019	TCGATACTGCCAGCTTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTG	550
C.orthopsilosis ATCC96141	TCGATACTGCCAGCTTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTG	550
C.metapsilosis ATCC96143	TCGATACTGCCAGCTTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTG	550

C.parapsilosis ATCC22019	GCATAATGATCTTAAGTCGC	570
C.orthopsilosis ATCC96141	GCATAATGATCTTAAGTCGC	570
C.metapsilosis ATCC96143	GCATAATGATCTTAAGTCGC	570

Figura 7: Alinhamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal das cepas ATCCs *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, números de acesso no GenBank KJ463413, KJ463414 e KJ463415 respectivamente. Este alinhamento não contempla a região dos *primers*. A presença do (*) significa semelhança entre bases e a ausência não. Nota-se que há apenas sete regiões de não semelhança entre bases, posições 176, 399, 442, 452, 455, 477 e 515. Fonte: elaborado pelo autor com o aplicativo ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>).

5.3.2 PCR com primers espécie-específicos

Todos os 100 isolados amplificaram para um único par específico de *primers*, sendo caracterizados como 59 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu*, 39 de *C. orthopsilosis* e dois de *C. metapsilosis*. De uma forma representativa, os resultados são demonstrados na **Figura 8**, onde em **(a)** encontramos as cepas de referência ATCCs e em **(b)** cinco diferentes isolados.

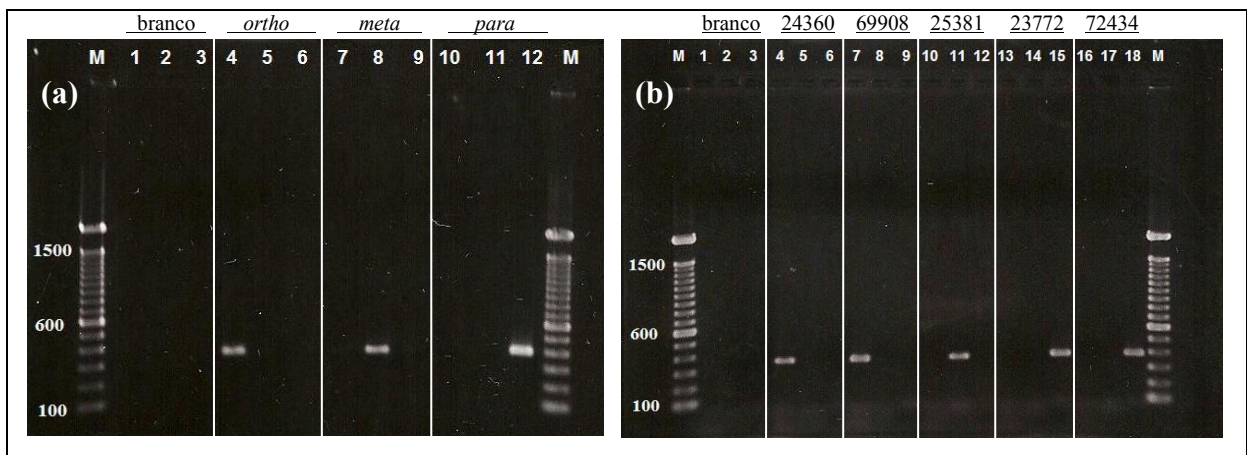


Figura 8: Eletroforese dos produtos da PCR com os *primers* espécies-específicos após amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA em gel de agarose a 1% a 90 V por 1 hora e 20 minutos. **(a)** Colunas 1, 4, 7 e 10 *primers* CORF+CORR; colunas 2, 5, 8 e 11 *primers* CMEF+CMER; colunas 3, 6, 9 e 12 *primers* CPAF+CPAR. Colunas 1, 2 e 3 brancos; colunas 4, 5 e 6 *C. orthopsilosis* ATCC 96141; colunas 7, 8 e 9 *C. metapsilosis* ATCC 96143; colunas 10, 11 e 12 *C. parapsilosis* ATCC 22019. As cepas de referência amplificaram em seus respectivos pares específicos de *primers*, colunas 4, 8 e 12 para *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis stricto sensu*, respectivamente. **(b)** Eletroforese representativa de cinco isolados. Colunas 1, 4, 7, 10, 13 e 16 *primers* CORF+CORR; colunas 2, 5, 8, 11, 14 e 17 *primers* CMEF+CMER; colunas 3, 6, 9, 12, 15 e 18 *primers* CPAF+CPAR. Colunas 1, 2 e 3 brancos; colunas 4, 5 e 6 isolado 24360HSE identificado como *C. orthopsilosis* em 4; colunas 7, 8 e 9 isolado 69908HUPE identificado como *C. orthopsilosis* em 7; colunas 10, 11 e 12 isolado 25381HSE identificado como *C. metapsilosis* em 11; colunas 13, 14 e 15 isolado 23772HSE identificado como *C. parapsilosis stricto sensu* em 15; colunas 16, 17 e 18 isolado 72434HUPE identificado como *C. parapsilosis stricto sensu* em 18. Coluna M, marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder, sendo indicadas as posições de migrações dos fragmentos de 100, 600 e 1500 (pb) pares de bases. Fonte: elaborado pelo autor com auxílio da Polaroid GelCam.

5.3.3 PCR-RFLP

Os fragmentos ITS1-5.8-ITS2 gerados após a reação em cadeia da polimerase utilizando os *primers* ITS1 e ITS 4 dos 100 isolados incluindo as três cepas de referências ATCC foram submetidos a dupla digestão enzimática com duas enzimas de restrição (*Sau96I* e *HhaI*), gerando assim três fragmentos, onde foram caracterizados como 59 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu*, 39 de *C. orthopsilosis* e dois de *C. metapsilosis* (**Figura 9**). A

estimativa dos pesos moleculares dos fragmentos gerados após a ação enzimática com o uso das sequências FJ872015 (ATCC 22019), EU564208 (ATCC 96141) e EU564207 (ATCC 96143) oriundas do GenBank, com auxílio do programa FastPCR versão 6.0 foram: 117, 176 e 227 pb para *C. parapsilosis* ATCC 22019; 102, 182 e 227 pb para *C. orthopsilosis* ATCC 96141; e 114, 186 e 230 pb para *C. metapsilosis* ATCC 96143.

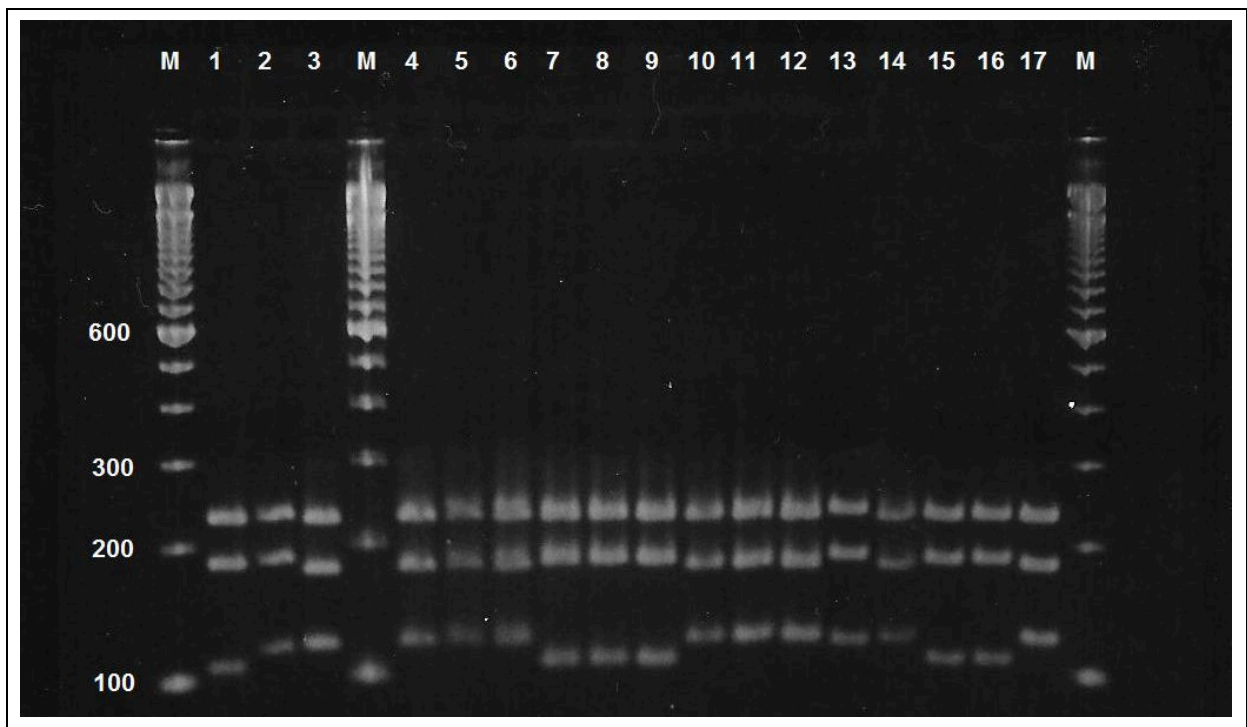


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose a 3% a 100V por aproximadamente 2 horas dos produtos da PCR com os *primers* ITS1 e ITS4 (ITS1-5.8S-ITS2) após dupla digestão enzimática das enzimas de restrição *Sau96I* e *HhaI* por 3 horas a 37°C. Colunas 1, 2 e 3 cepas de referência ATCC, *C. orthopsilosis* 96141; *C. metapsilosis* 96143; e *C. parapsilosis* 22019, respectivamente. Colunas 4, 5, 6, 10, 11, 12, 14 e 17 isolados 23795HSE, 24384HSE, 33286HSE, 80792HUPE, 80828HUPE, 80846HUPE, 75525HSE e 72820HUPE, respectivamente identificados como *C. parapsilosis stricto sensu*. Colunas 7, 8, 9, 15 e 16 isolados 79188HUPE, 79298BHUPE, 80550HUPE, 26990.1HSE e 27246HSE, respectivamente identificados como *C. orthopsilosis*. Coluna 13 isolado ROM001HSE, identificado como *C. metapsilosis*. Coluna M, marcador de peso molecular 100 *bp* DNA ladder, sendo indicadas as posições de migrações dos fragmentos de 100, 200, 300 e 600 pb. Fonte: elaborado pelo autor com auxílio da Polaroid GelCam.

5.3.4 Microsatélites

Esta PCR em *multiplex* foi realizada para todos 100 os isolados e as três cepas de referência, mesmo sabendo-se que estes microsatélites estão presentes apenas em *C. parapsilosis stricto sensu* (SABINO et al., 2010). Assim quando todos os isolados submetidos os quatros pares de *primers* para os microsatélites empregados (CP1, CP4a, CP6 e B) apenas

61 revelaram ser *C. parapsilosis stricto sensu*, mais a cepa de referência ATCC 22019. Os isolados 28118HSE (código da amostra 080), 28287HSE (código da amostra 083) e o 28352HSE (código da amostra 084), sendo estes dois últimos pertencentes ao mesmo paciente, não amplificaram para o par de *primers* referente ao microsatélite CP4a. Nas figuras que se seguem encontramos exemplos do padrão TAMRA, isolados que amplificaram, isolado que não amplificou (**Figura 10**) e isolados de sangue e cateter de um mesmo paciente (**Figura 11**).

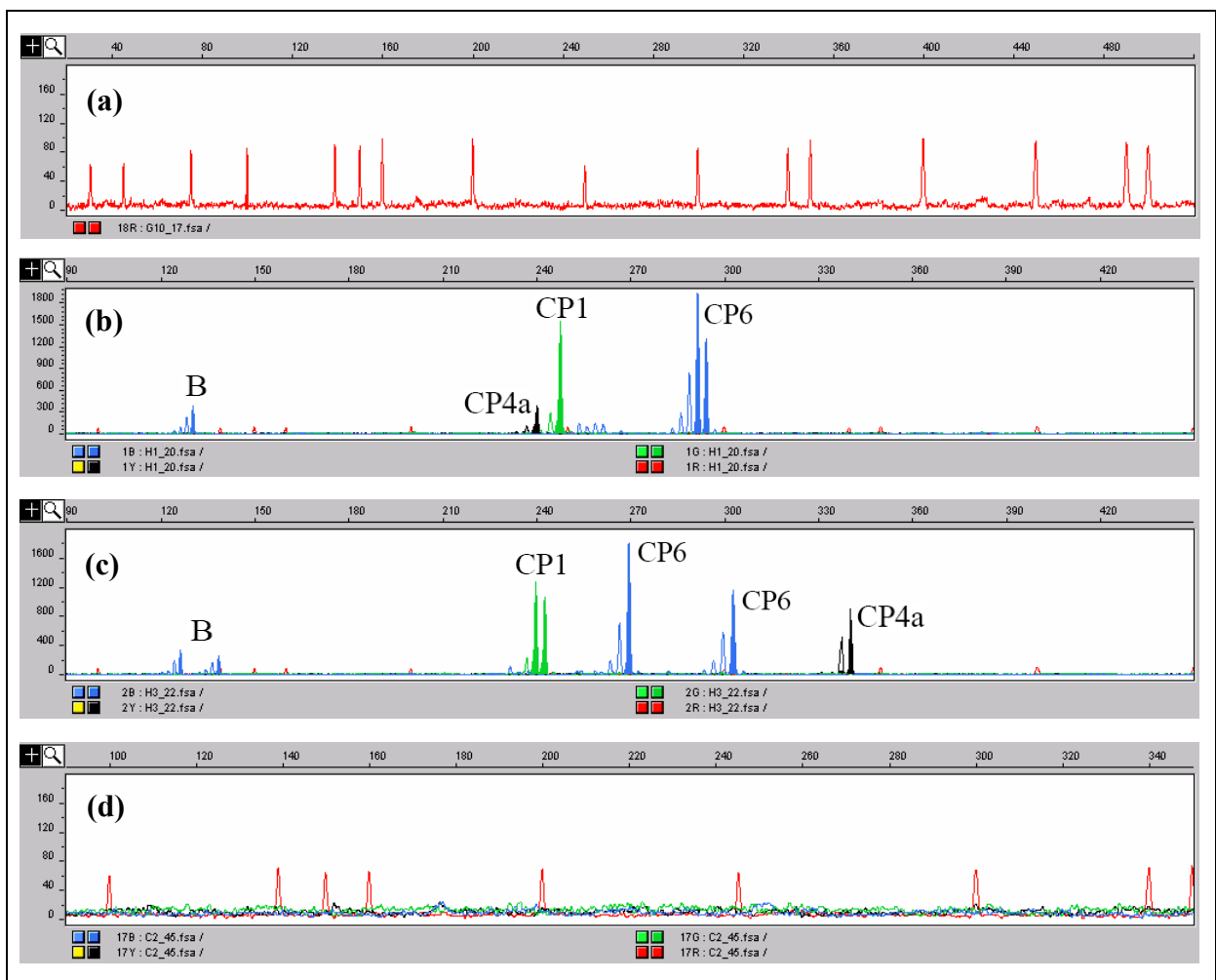


Figura 10: Representativo de diferentes perfis gerados pelo programa GeneScan versão 3.7 na análise em *multilocus* dos microsatélites CP1 (verde), CP4a (preto), CP6 (azul) e B (azul) nos isolados de *C. parapsilosis stricto sensu*. **(a)** Padrão GS-500 TAMRA Size Standard (vermelho). **(b)** Isolado 76542HSE, homocigoto para os microsatélites CP1 (243:243), CP4a (236:236) e B (131:131) e heterocigoto para o CP6 (291:294). **(c)** Isolado 76883HSE, homocigoto para o microsatélite CP4a (341:341) e heterocigotos em CP1 (240:243), CP6 (270:303) e B (127:139). **(d)** Isolado 79188HUPE, não amplificado para os microsatélites por se tratar de um isolado de *C. orthopsilosis*, nota-se apenas a presença do padrão TAMRA e ruído basal. As escalas horizontais não estão alinhadas, pois depende do que se quer observar, em (a) a escala está mais alargada para melhor se observar todos os picos do padrão TAMRA; em (b) e (c) as leituras foram feitas na escala entre 90 e 450 pares de bases; e em (d) a escala foi alterada para melhor observar o padrão e o ruído basal. Fonte: elaborado pelo autor com as saídas do programa GeneScan versão 3.7.

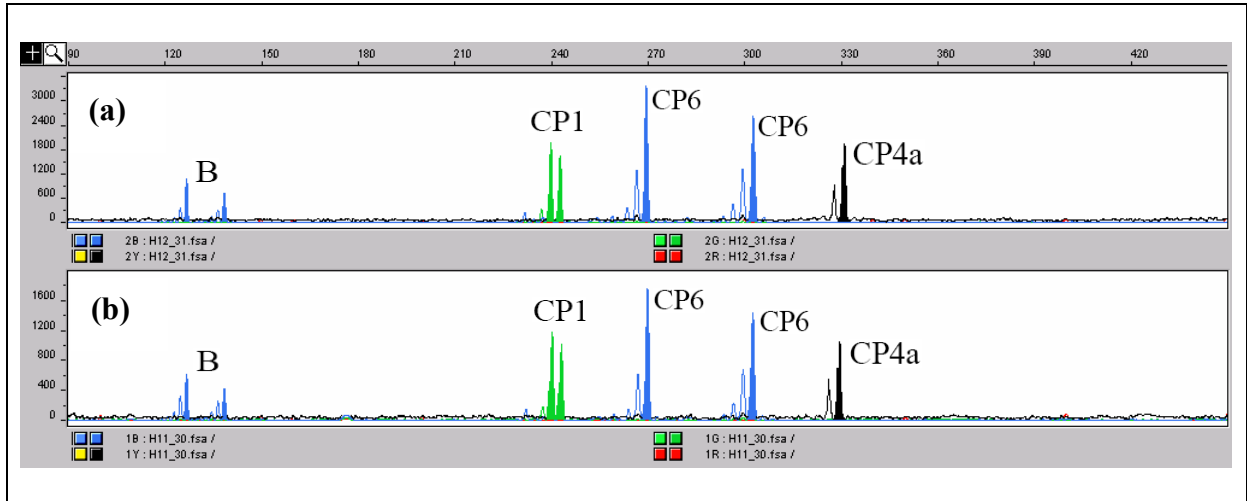


Figura 11: Comparativo entre perfis de dois isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* gerados pelo programa GeneScan versão 3.7 na análise em *multilocus* dos microsátélites CP1 (verde), CP4a (preto), CP6 (azul) e B (azul) oriundos de mesmo paciente (n.º 42) coletados em um mesmo dia (06/09/2005). **(a)** Isolado 2500100454SAM oriundo de amostra de cateter, homocigoto para o microsátélite CP4a (332:332) e heterocigotos em CP1 (240:243), CP6 (270:303) e B (127:139). **(b)** Isolado 2500100450SAM oriundo de amostra de sangue, homocigoto para o microsátélite CP4a (329:329) e heterocigotos em CP1 (240:243), CP6 (270:303) e B (127:139). Fonte: elaborado pelo autor com as saídas do programa GeneScan versão 3.7.

A análise dos 61 isolados mostrou um polimorfismo nos *loci* microsátélites de *C. parapsilosis stricto sensu*, apresentando entre 11 e 26 alelos de 13 e 31 diferentes genótipos. Os resultados mostraram que o microsátélite CP6 demonstrou maior valor (0,97) de poder discriminatório (PD), enquanto CP1 apresentou o menor valor (0,85). O microsátélite B produziu 18 diferentes alelos e 21 genótipos, resultando em um valor de PD de 0,95. A análise em *multiplex* englobando os microsátélites CP1, CP4a, CP6 e B resultou num total de 39 diferentes genótipos em *multilocus* com um valor de PD de 0,99 considerando apenas os isolados independentes (apenas um isolado por paciente). O número total de diferentes alelos e genótipos, amplitude dos alelos, respectivas mínimas e máximas frequências alélicas e genotípicas para cada microsátélite, poder discriminatório, e heterozigosidade estão apresentadas na **Tabela 2**. Todos os resultados pertinentes aos microsátélites estão presentes no **APÊNDICE C**.

Tabela 2: Características dos Microsatélites obtidas dos 61 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu*.

Microsatélite	Número total de alelos	Valor mínimo e máximo (pb)	Frequência alélica mínima	Alelos com frequência alélica mínima (pb)	Frequência alélica máxima	Alelos com frequência alélica máxima (pb)	Número total de genótipos	Frequência genotípica mínima	Genótipos com frequência genotípica mínima (pb)	Frequência genotípica máxima	Genótipos com frequência genotípica máxima (pb)	PD	Heterozigosidade (%)
CP1	11	189-264	0,0082	219 237	0,4918	243	13	0,016393	237:243 246:246 219:261 243:261 264:264	0,295082	243:243	0,85	55,74
CP4a	21	212-365	0,0086	245 269 281 311	0,2759	236	23	0,017241	233:233 242:242 245:272 290:290 296:296 269:302 281:311 341:341	0,241379	236:236	0,94	32,76
CP6	26	210-360	0,0082	243 276 279 324 327 354 360	0,1721	303	31	0,016393	267:270 276:282 282:282 252:288 273:291 291:291 294:294 300:300 243:303 285:306 279:312 282:312 294:312 312:312 264:324 297:327 354:360	0,131147	270:303	0,97	55,74
B	18	103-167	0,0082	149	0,1721	127	21	0,016393	121:121 129:131 143:143 143:145 129:147 147:149	0,147541	127:139	0,95	49,18
<i>Multilocus</i>	-	-	-	-	-	-	39	0.016393	-	0.081967	-	0.99	-

pb, pares de bases; PD, poder discriminatório.

O dendrograma baseado na análise dos genótipos em *multilocus* para os microsatélites CP1, CP4a, CP6 e B dos 61 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* mais a cepa de referência ATCC 22019 é apresentado na **Figura 12**. A relação entre os diferentes isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* quando do mesmo paciente e seus genótipos em *multilocus* são apresentados na **Tabela 3**.

Em relação às estirpes de *C. parapsilosis stricto sensu* isoladas durante diferentes episódios de candidemia foi possível observar que, em relação à presença ou não do cateter, em pacientes que mantiveram a estirpe infectante (pacientes n.^{os} 4, 6, 13, 18 e 44), as datas de coletas foram de aproximadamente um mês. Por outro lado, todos os casos observados em que se sugere que a estirpe foi substituída (pacientes n.^{os} 11, 27 e 29), as datas de coletas foram superiores a três meses (**Tabela 3**). Observamos que a probabilidade da estirpe ser substituída no intervalo de três a seis meses foi estatisticamente significativa pelo teste exato de Fisher (P=0,018).

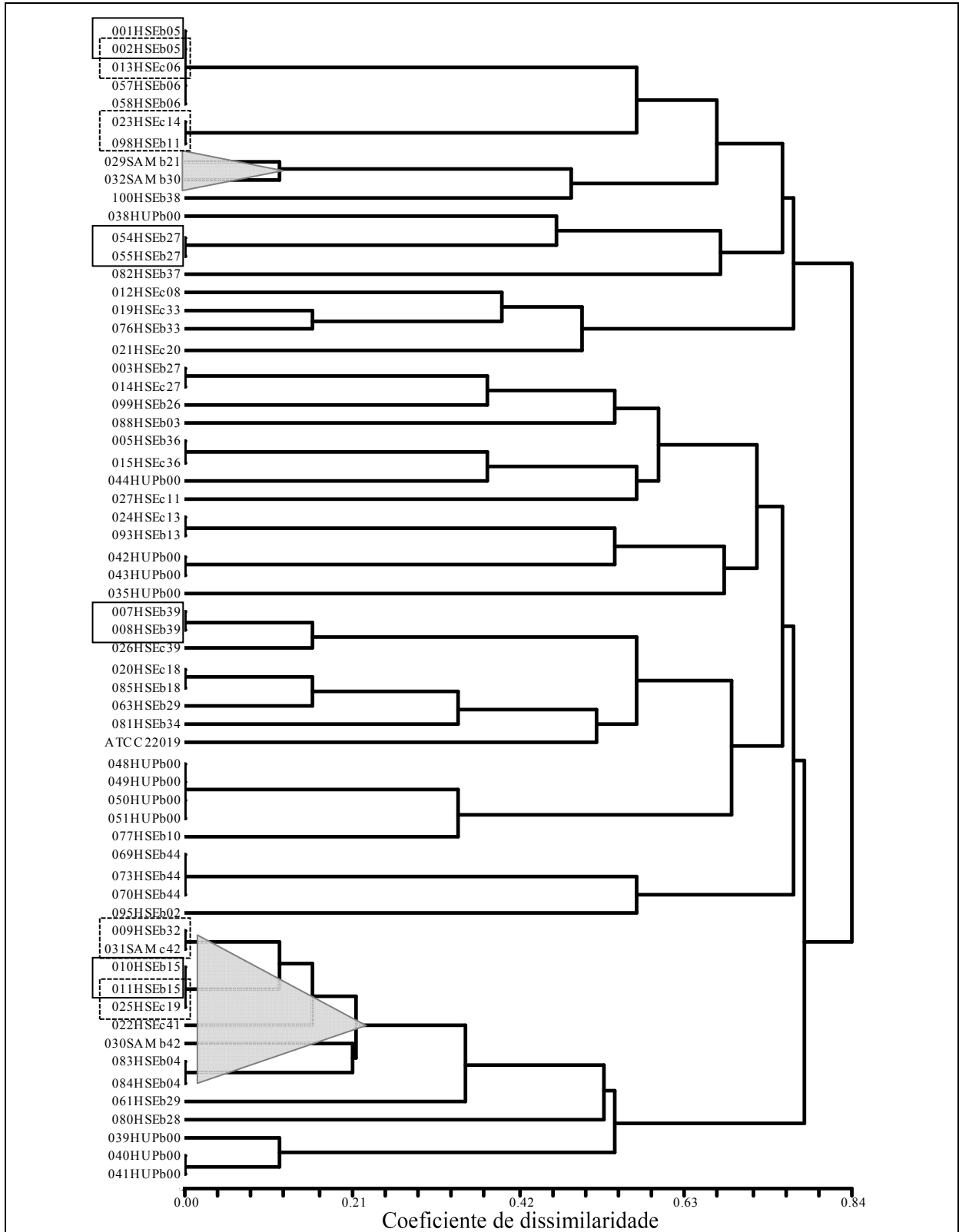


Figura 12: Dendrograma baseado na análise dos genótipos em *multilocus* para os microsátélites CP1, CP4a, CP6 e B dos 61 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* mais a cepa de referência ATCC 22019. O grau de parentesco foi inferido pelo método UPGMA a partir da matriz de distância construída pelo método Cavalli-Sforza & Edwards. Retângulos de linha contínua representam estirpes em duplicata; retângulos tracejados representam estirpes oriundas de diferentes pacientes que compartilham o mesmo genótipo em *multilocus* e; triângulos representam estirpes com microvariação. O código dos táxons inclui o código do isolado (000 a 100), sigla do hospital (HSE, HUP ou SAM) seguido das letras (b) para sangue ou (c) para cateter, e o número do paciente. Fonte: elaborado pelo autor com os programas Polulation versão 1.2.28 e NTSYSpc versão 2.02h.

Tabela 3: Resultados dos microsátélites em relação aos diferentes isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* quando do mesmo paciente.

N.º do paciente	Hospital	Quantidade de isolados	Código da Amostra	Origem	Data da coleta	Código MG	Genótipo <i>multilocus</i>			
							(CP1)	(CP4a)	(CP6)	(B)
4	HSE	2	083	Sangue	09/06/2004	MG-16	240:243	000:000	273:303	127:139
			084	Sangue	01/07/2004	MG-16	240:243	000:000	273:303	127:139
5	HSE	2	001	Sangue	19/12/2002	MG-1	189:240	236:236	315:315	165:167
			002	Sangue	19/02/2002	MG-1	189:240	236:236	315:315	165:167
6	HSE	3	057	Sangue	28/10/2002	MG-1	189:240	236:236	315:315	165:167
			013	Cateter	06/11/2002	MG-1	189:240	236:236	315:315	165:167
			058	Sangue	06/11/2002	MG-1	189:240	236:236	315:315	165:167
11	HSE	2	027	Cateter	29/10/2005	MG-37	243:261	242:242	354:360	129:129
			098	Sangue	01/02/2006	MG-10	240:240	236:236	264:267	145:145
13	HSE	2	024	Cateter	08/08/2005	MG-35	243:246	299:302	285:291	127:129
			093	Sangue	23/08/2005	MG-35	243:246	299:302	285:291	127:129
15	HSE	2	010	Sangue	01/02/2006	MG-23	240:243	332:341	270:303	127:139
			011	Sangue	01/02/2006	MG-23	240:243	332:341	270:303	127:139
18	HSE	2	085	Sangue	26/07/2004	MG-27	243:243	236:236	291:294	131:131
			020	Cateter	12/08/2004	MG-27	243:243	236:236	291:294	131:131
27	HSE	4	054	Sangue	29/08/2002	MG-14	240:240	272:272	273:273	103:103
			055	Sangue	29/08/2002	MG-14	240:240	272:272	273:273	103:103
			014	Cateter	20/02/2003	MG-32	243:243	299:299	264:342	129:157
			003	Sangue	20/02/2003	MG-32	243:243	299:299	264:342	129:157
29	HSE	2	061	Sangue	28/02/2003	MG-20	240:243	269:302	270:303	127:127
			063	Sangue	12/05/2003	MG-26	243:243	236:236	273:291	131:131
33	HSE	2	019	Cateter	27/02/2004	MG-11	240:240	239:239	279:312	109:109
			076	Sangue	27/02/2004	MG-13	240:240	239:239	294:312	109:109
36	HSE	2	015	Cateter	28/02/2003	MG-34	243:243	365:365	210:306	129:129
			005	Sangue	28/02/2003	MG-34	243:243	365:365	210:306	129:129
39	HSE	3	026	Cateter	29/09/2005	MG-7	234:243	287:290	297:297	131:131
			007	Sangue	29/09/2005	MG-8	234:243	287:296	297:297	131:131
			008	Sangue	29/09/2005	MG-8	234:243	287:296	297:297	131:131
42	SAM	2	031	Cateter	06/09/2005	MG-22	240:243	332:332	270:303	127:139
			030	Sangue	06/09/2005	MG-21	240:243	329:329	270:303	127:139
44	HSE	3	069	Sangue	29/12/2003	MG-29	243:243	251:251	252:252	145:161
			070	Sangue	30/12/2003	MG-29	243:243	251:251	252:252	145:161
			073	Sangue	13/01/2003	MG-29	243:243	251:251	252:252	145:161

Isolados com mesma combinação alélica para todos os *loci* analisados correspondem a estirpes geneticamente similares e são definidas como idênticas (pacientes n.ºs 4, 5, 6, 13, 15, 18, 27, 36, 39 e 44), enquanto que isolados com combinação alélica distinta para mais de um *locus* correspondem a estirpes geneticamente dissimilares e são definidas como diferentes (pacientes n.ºs 11, 27 e 29), ao passo que isolados com dissimilaridade em apenas um *locus* (destacado em fundo cinza) são considerados casos de microvariação (pacientes n.ºs 33, 39 e 42). HSE, Hospital Servidores do Estado; SAM, Hospital Samaritano; MG, código do genótipo em *multilocus*.

5.3.5 Sequenciamento da região ITS do rDNA

O sequenciamento da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do DNA ribossomal, e análise no programa MEGA versão 4.0.2 na construção do dendrograma (**Figura 13**), foram realizados apenas para os isolados 28287HSE (código da amostra n.º 83) e 28352HSE (código da amostra n.º 84), tendo em vista a discordância dos resultados na PCR com os *primers* espécie-específicos e PCR-RFLP (*C. orthosporiosis*) frente aos resultados do sequenciamento da região D1/D2 do rDNA (*C. parapsporiosis stricto sensu*). Assim, os dois isolados revelaram ser *C. parapsporiosis stricto sensu* (**Figura 14**) e suas sequências foram depositadas no GenBank sob os números KP170491 e KP170492, respectivamente. Ambos os isolados são provenientes de mesmo paciente (n.º 4) do HSE, duas amostras de sangue de datas de coleta em 09/06/2004 e 01/07/2004.

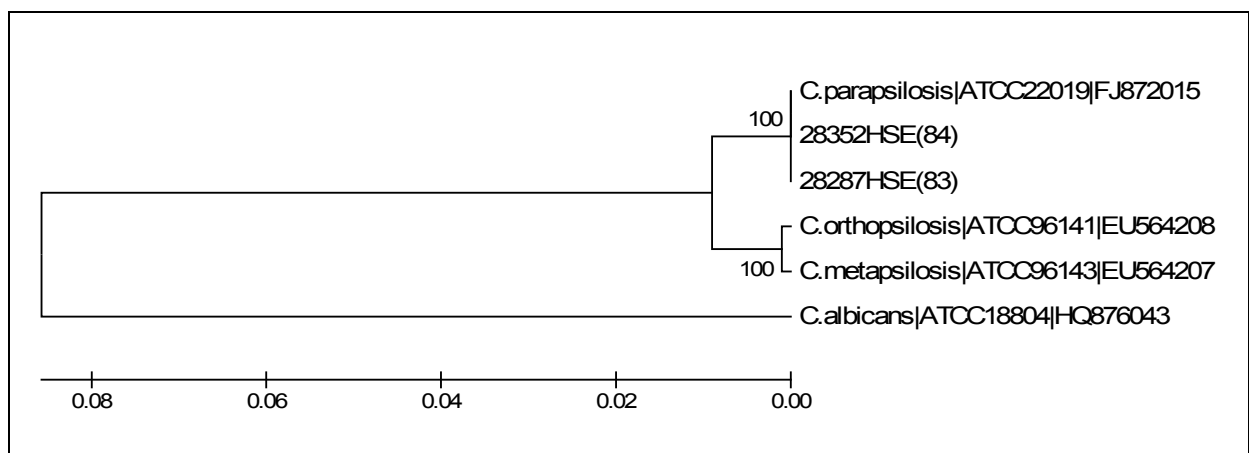


Figura 13: Dendrograma baseado na análise da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do DNA ribossomal de 6 táxons (isolados 28352HSE e 28287HSE mais quatro sequências de cepas ATCCs oriundas do GenBank). A história evolutiva foi inferida usando o método UPGMA. A porcentagem dos agrupamentos ao utilizar um *bootstrap* de 1000 réplicas encontra-se ao lado dos ramos. A distância evolutiva foi computada utilizando o método *Maximum Composite Likelihood*. Um total de 484 bases foi observado no conjunto final. Fonte: elaborado pelo autor com o programa MEGA 4.0.2.

```

C.parapsilosis|ATCC22019      AAGGATCATTACAGAATGAAAAGTGCTTAACTGCATTTTTCTTACACAT 50
28287HSE_83_                  AAGGATCATTACAGAATGAAAAGTGCTTAACTGCATTTTTCTTACACAT 50
28352HSE_84_                  AAGGATCATTACAGAATGAAAAGTGCTTAACTGCATTTTTCTTACACAT 50
*****

C.parapsilosis|ATCC22019      GTGTTTTCTTTTTTGAAAACITTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGG 100
28287HSE_83_                  GTGTTTTCTTTTTTGAAAACITTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGG 100
28352HSE_84_                  GTGTTTTCTTTTTTGAAAACITTTGCTTTGGTAGGCCTTCTATATGGGG 100
*****

C.parapsilosis|ATCC22019      CCTGCCAGAGATTAAGTCAACCAAATTTATTTAATGTCAACCGATTAT 150
28287HSE_83_                  CCTGCCAGAGATTAAGTCAACCAAATTTATTTAATGTCAACCGATTAT 150
28352HSE_84_                  CCTGCCAGAGATTAAGTCAACCAAATTTATTTAATGTCAACCGATTAT 150
*****

C.parapsilosis|ATCC22019      TTAATAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGA 200
28287HSE_83_                  TTAATAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGA 200
28352HSE_84_                  TTAATAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGA 200
*****

C.parapsilosis|ATCC22019      AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAAT 250
28287HSE_83_                  AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAAT 250
28352HSE_84_                  AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAAT 250
*****

C.parapsilosis|ATCC22019      CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATCCAAAGGGCATG 300
28287HSE_83_                  CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATCCAAAGGGCATG 300
28352HSE_84_                  CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATCCAAAGGGCATG 300
*****

C.parapsilosis|ATCC22019      CCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGGTGTGAGCG 350
28287HSE_83_                  CCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGGTGTGAGCG 350
28352HSE_84_                  CCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCTCGGGTTTGGTGTGAGCG 350
*****

C.parapsilosis|ATCC22019      ATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGG 400
28287HSE_83_                  ATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGG 400
28352HSE_84_                  ATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGGCGGAGTATAAACTAATGGATAGG 400
*****

C.parapsilosis|ATCC22019      TTTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACITTTCTTCCAAATTCGACCT 450
28287HSE_83_                  TTTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACITTTCTTCCAAATTCGACCT 450
28352HSE_84_                  TTTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAACITTTCTTCCAAATTCGACCT 450
*****

C.parapsilosis|ATCC22019      CAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACITTA 481
28287HSE_83_                  CAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACITTA 481
28352HSE_84_                  CAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACITTA 481
*****

```

Figura 14: Alinhamento da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do DNA ribossomal dos isolados 28352HSE e 28287HSE e da cepa ATCC 22019 oriunda do GenBank sob o número FJ872015. Este alinhamento não contempla a região dos *primers*. A presença do (*) significa semelhança entre bases. Fonte: elaborado pelo autor com o aplicativo ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>).

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E O SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO D1/D2 DO rDNA

A distribuição dos isolados do complexo *psilosis* presentes nos três hospitais do município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006, mostrou *C. parapsilosis stricto sensu* nos hospitais HSE, HUPE e SAM; *C. orthopsilosis* no HSE e HUPE; e *C. metapsilosis* presente apenas no HSE (**Tabela 4**). Quanto a origem das amostras observamos a presença das três espécies em amostras de sangue (**Tabela 5**). Também observamos maior número de pacientes masculinos que femininos, porém as três espécies do complexo só foram encontradas no sexo feminino (**Tabela 6**). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma destas três correlações estudadas (P valores de 0,353, 0,058 e 0,147 respectivamente).

Tabela 4: Distribuição quanto aos três diferentes hospitais do município do Rio de Janeiro e o número de isolados do complexo *C. parapsilosis* de acordo com os resultados do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal.

Hospitais	Espécies do complexo <i>psilosis</i>			Total
	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>	
HSE	45	29	02	76
HUPE	12	08	00	20
SAM	04	00	00	04
Total	61	37	02	100

HSE, Hospital Servidores do Estado; HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto; SAM, Hospital Samaritano. P=0,353.

Tabela 5: Distribuição quanto à origem e o número de isolados do complexo *C. parapsilosis* de acordo com os resultados do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal.

Origem	Espécies do complexo <i>psilosis</i>			Total
	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>	
Cateter	14	03	00	17
Sangue	47	34	02	83
Total	61	37	02	100

P=0,058.

Tabela 6: Distribuição quanto ao sexo dos pacientes do HSE (41 pacientes) e SAM (3 pacientes) e os resultados do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal.

Sexo	Espécies do complexo <i>psilosis</i>				Total
	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis stricto sensu e C. orthopsilosis</i>	
Masculino	13	10	0	4	27
Feminino	13	2	2	0	17
Total	26	12	2	4	44

P=0,147.

Considerando apenas os isolados provenientes do HSE (41 pacientes), observamos que 56,1% dos pacientes apresentaram fungemia devido a *C. parapsilosis stricto sensu*, 29,7% devido a *C. orthopsilosis* e 4,9% devido a *C. metapsilosis*. Neste hospital *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis* foram isoladas do mesmo paciente em 9,8% (4 de 41 pacientes) dos casos. Os casos de infecções polifúngicas foram observados em pacientes do sexo masculino, porém sem diferença significativa (P=0,147) na distribuição das espécies quando observado entre os dois sexos. Todos os pacientes classificados como < 18 anos (10 crianças) foram provenientes do HSE e 70% deles estavam infectados por *C. orthopsilosis*. Este tipo de análise não foi possível com os isolados do HUPE e do SAM. As informações dos pacientes do HUPE estavam incompletas (não recuperadas); já os pacientes do SAM eram apenas três (um feminino e dois masculinos) contabilizando quatro isolados, sendo eles *C. parapsilosis stricto sensu*.

5.5 COMPARAÇÃO ENTRE O SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO D1/D2 DO rDNA E OS OUTROS MÉTODOS EMPREGADOS

Quando comparamos os resultados do sequenciamento da região D1/D2 do rDNA com a PCR espécie-específica e a PCR-RFLP observamos uma concordância quase perfeita, de acordo com a classificação (Kappa = 0,96) de Landis e Koch (1977) (**Tabelas 7 e 8**). Os resultados discordantes encontrados nos dois diferentes métodos foram com os mesmos isolados, o 28287HSE (código da amostra 083) e o 28352HSE (código da amostra 084). No sequenciamento estes dois isolados foram caracterizados como *C. parapsilosis stricto sensu* enquanto que na PCR espécie-específica e na PCR-RFLP demonstraram ser *C. orthopsilosis* (**APÊNDICE A**).

Tabela 7: Comparativo entre os resultados do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal e os resultados da PCR espécie-específica.

PCR espécie-específica	Sequenciamento da região D1/D2 do rDNA			Total
	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>	
<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	59	00	00	59
<i>C. orthopsilosis</i>	02*	37	00	39
<i>C. metapsilosis</i>	00	00	02	02
Total	61	37	02	100

(*) Resultados discordantes entre as técnicas.
Kappa = 0,96.

Tabela 8: Comparativo entre os resultados do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal e os resultados da PCR-RFLP.

PCR-RFLP	Sequenciamento da região D1/D2 do rDNA			Total
	<i>C. parapsilosis</i> <i>stricto sensu</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>	
<i>C. parapsilosis</i> <i>stricto sensu</i>	59	00	00	59
<i>C. orthopsilosis</i>	02*	37	00	39
<i>C. metapsilosis</i>	00	00	02	02
Total	61	37	02	100

(*) Resultados discordantes entre as técnicas.
Kappa = 0,96.

5.6 ANÁLISE EM CONJUNTO ENTRE O SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO D1/D2 DO rDNA E A TÉCNICA DOS MICROSATÉLITES

Quando comparamos os resultados do sequenciamento da região D1/D2 do rDNA com os microsátélites (CP1, CP4a, CP6 e B), observamos que os isolados que amplificaram para os marcadores microsátélites foram os mesmos que no sequenciamento da região D1/D2 do rDNA revelaram ser *C. parapsilosis stricto sensu* (61), incluindo a cepa de referência ATCC 22019. Desta forma sugere-se, que por exclusão, os isolados que não amplificaram para os quatro marcadores microsátélites possam ser *C. orthopsilosis* ou *C. metapsilosis* (**Tabela 9**).

Tabela 9: Comparativo entre os resultados do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal e os resultados dos microsátélites.

Microsátélites	Sequenciamento da região D1/D2 do rDNA		Total
	<i>C. parapsilosis</i> <i>stricto sensu</i>	<i>C. orthopsilosis</i> ou <i>C. metapsilosis</i>	
<i>C. parapsilosis</i> <i>stricto sensu</i>	58+3*	00	61
Não amplificado	00	39	39
Total	61	39	100

* Os isolados 28118HSE (código da amostra 080), 28287HSE (código da amostra 083) e o 28352HSE (código da amostra 084), não amplificaram para o par de *primers* referente ao microsátélite CP4a, porém foram considerados *C. parapsilosis stricto sensu* pelo fato de amplificarem para os pares de *primers* referentes aos microsátélites CP1, CP6 e B.

Kappa = 1.

A fim de combinar os resultados dos diferentes isolados coletados de um mesmo paciente utilizando o sequenciamento da região D1/D2 do rDNA e os microsátélites, observamos que quatro pacientes (n.^{os} 11, 13, 14 e 19) apresentaram *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis*. Dessa forma observamos três situações: (i) possível alternância de espécies do complexo *psilosis* (pacientes n.^{os} 11 e 19); (ii) possível alternância de estirpes de *C. parapsilosis stricto sensu* (paciente n.^o 11); e (iii) infecção polifúngica por diferentes espécies do complexo *psilosis* (pacientes n.^{os} 13 e 14).

Tabela 10: Relação entre os diferentes isolados de um mesmo paciente quando diferentes espécies são encontradas utilizando os resultados combinados do sequenciamento da região D1/D2 do rDNA e os resultados dos microsatélites.

N.º do paciente	Hospital	Quantidade de isolados	Código da Amostra	Origem	Data da coleta	Espécie	Código MG (Microsatélites)
11	HSE	4	027	Cateter	29/10/2005	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	MG-37
			096	Sangue	21/11/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	-
			097	Sangue	05/12/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	-
			098	Sangue	01/02/2006	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	MG-10
13	HSE	3	024	Cateter	08/08/2005	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	MG-35
			092	Sangue	08/08/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	-
			093	Sangue	23/08/2005	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	MG-35
14	HSE	2	023	Cateter	28/07/2005	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	MG-10
			091	Sangue	28/07/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	-
19	HSE	2	025	Cateter	23/08/2004	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	MG-23
			094	Sangue	23/08/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	-

HSE, Hospital Servidores do Estado; MG, código do genótipo em *multilocus*.

O paciente n.º 11 (**Tabela 10**) que, no dia 29/10/2005, apresentou *C. parapsilosis stricto sensu* em cultura positiva para amostra de cateter sem coleta de sangue para hemocultura neste mesmo dia; nos dois meses subsequentes duas hemoculturas foram positivas para *C. orthopsilosis*; porém no dia 01/02/2006 a hemocultura foi positiva para *C. parapsilosis stricto sensu*, porém estirpe diferente pelo padrão de microsatélites da primeira encontrada em outubro de 2005. Sendo estas duas *C. parapsilosis stricto sensu* coletadas com três meses de diferença.

O paciente n.º 13 (**Tabela 10**) no dia 08/08/2005 apresentou *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis* em amostras de cateter e sangue respectivamente, já no dia 23/08/2005 a hemocultura foi positiva para *C. parapsilosis stricto sensu*. O paciente n.º 14 (**Tabela 10**) apresentou *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis* em amostras de cateter e sangue, porém oriundas de mesmo dia de coleta 28/07/2005. O paciente n.º 19 também apresentou *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis* em amostras de cateter e sangue, porém em diferentes ocasiões.

6 DISCUSSÃO

A frequência de fungemia em hospitais terciários tem aumentado nas últimas décadas, especialmente entre pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva, imunocomprometidos, pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos invasivos e recém-nascidos prematuros (PEMÁN et al., 2011). Estudos demonstram que ocorrem diferenças na distribuição de espécies do gênero *Candida* associadas a candidemia, sendo observada uma variação entre continentes, países, estados e instituições (NUCCI et al., 2010; PFALLER et al., 2011), estando também associada à doença de base, à cateterização e ao uso da profilaxia antifúngica indiscriminada (COLOMBO et al., 2006; CISTERNA et al., 2010).

Dentre as espécies não-*albicans*, *C. parapsilosis* emerge como importante agente de candidemia, sendo a espécie comumente isolada de pacientes com infecções hematogênicas em várias partes do globo nos últimos anos (LOCKHART et al., 2008a; PFALLER et al., 2008; DIZBAY et al., 2010), porém na atualidade, *C. parapsilosis* é formada por um complexo de três espécies, denominadas *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (TAVANTI et al., 2005). No entanto, sabemos que a incidência das infecções por *C. parapsilosis lato sensu* variam de acordo com múltiplos fatores como idade, doença de base do paciente, localização geográfica, condições sócio-econômicas, dentre outros (GARCIA-EFFRON et al., 2012).

Sabe-se que a distinção das espécies incluídas no complexo *psilosis* só é possível por meio de técnicas moleculares envolvendo DNA e proteômica (MALDI-TOF-MS) (DE CAROLIS et al., 2014). Entretanto, a primeira caracterização fenotípica e o método de preservação destes isolados para posteriores estudos moleculares são de fundamental importância. Todos os isolados, incluídos em nosso estudo, estavam estocados a -20°C (*Skim Milk* a 20%), a -70°C (BHI+glicerol a 30%) ou em água destilada estéril e se mostraram viáveis no reisolamento. A manutenção de fungos em certos meios de cultura requer muitos cuidados, pois consomem os nutrientes do meio rapidamente e necessitam de repiques frequentes, gastando tempo e possibilitando contaminação e diminuição da virulência. Devido a essas dificuldades foram desenvolvidos outros métodos para conservação de fungos, como em óleo mineral, areia, sílica gel, tecidos secos dos hospedeiros, água destilada, liofilização e criopreservação são alternativas, embora os resultados sejam variados (DIOGO, SARPIERI, PIRES, 2005).

Mariano, Gonçalves e Höfling (2007), em um estudo com seis cepas de referência do gênero *Candida*, avaliaram a influência de métodos de manutenção laboratorial de leveduras sobre suas características fenotípicas e genotípicas. Os cinco diferentes métodos de estoque foram: transferência seriada em meio sólido, óleo mineral, água destilada, congelamento em glicerol a -70°C e liofilização. Foram avaliadas as características das colônias em meio CHROMagar *Candida*, micromorfologia em agar fubá, assimilação e fermentação de carboidratos, produção de peptidases e fosfolipases, teste de crescimento a 45°C e crescimento em meio hipertônico. O DNA das amostras foi extraído nos tempos zero, 6, 12 e 18 meses, para análise genotípica por RAPD. Os resultados obtidos mostraram que todos os métodos de conservação avaliados permitiram a manutenção da viabilidade das amostras durante todo o período analisado.

Após o reisolamento dos nossos 100 isolados de *C. parapsilosis lato sensu* foi observada a macromorfologia com aspecto clássico em meio agar Sabouraud dextrose, (**Figura 4**) que é encontrada comumente nas espécies de *Candida*. O ágar de Sabouraud é um dos principais meios de cultura usados em micologia, sendo utilizado para o cultivo primário geral dos fungos, por se tratar de um meio não seletivo. A composição do agar Sabouraud foi, inicialmente, proposta por Raymond Sabouraud, em 1904, e vem apresentando diferentes modificações com o passar dos anos (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Candida parapsilosis em CHROMagar[®] *Candida* apresenta variação do branco ao rosa. Assim, como metodologia de triagem, todos os nossos isolados apresentaram colônias de pigmentação branca-rosácea (**Figura 5**), descartando então a presença de colônias mistas com *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Desta forma, se observou que *C. parapsilosis* não pôde ser totalmente identificada nesta metodologia, e conseqüentemente, todos os isolados foram estocados e submetidos à bioquímica, padrão ouro dos testes fenotípicos para leveduras. Após a utilização dos testes bioquímicos, nossos resultados, assim como de outros estudos (GOMEZ-LOPEZ et al., 2008a; LOCKHART et al., 2008b; ASADZADEH et al., 2009) mostram que isolados clínicos foram identificados apenas como *C. parapsilosis* através de métodos bioquímicos, corroborando a necessidade de métodos moleculares para discriminação entre *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (TAVANTI et al. 2005).

Os 100 isolados incluídos em nosso estudo, identificados fenotipicamente como *C. parapsilosis lato sensu*, foram caracterizados pelo sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal. *C. parapsilosis stricto sensu* foi a espécie predominante (61%) seguida de *C. orthopsilosis* (37%) e *C. metapsilosis* (2%). Este método

em nosso estudo foi eleito como padrão ouro para a comparação com as outras técnicas de biologia molecular abordadas. Assim, os resultados obtidos pelo sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal foram utilizados para a comparação com os obtidos por outros autores.

Gonçalves et al. (2010), em um estudo multicêntrico realizado com 141 isolados do complexo *psilosis* a partir de hemoculturas coletadas de pacientes com candidemia, envolvendo 11 hospitais gerais localizados em nove cidades brasileiras entre 2003 e 2004, demonstraram a presença de *C. parapsilosis stricto sensu* (88%), *C. orthopsilosis* (9%) e *C. metapsilosis* (3%).

Purisco et al. (2012), em um trabalho envolvendo 162 isolados da corrente sanguínea de *Candida não-albicans* e *não-tropicalis* oriundos de 11 centros hospitalares em São Paulo, revelaram 112 pertencentes ao complexo *psilosis*, sendo 103 (92%) isolados identificados como *C. parapsilosis stricto sensu*, oito (7,1%) identificados como *C. orthopsilosis* e um (0,9%) identificado como *C. metapsilosis*.

Bonfietti et al. (2012) também em São Paulo estudando 100 isolados da corrente sanguínea obtidos entre 1998 e 2007, revelaram que 37 destes pertenciam ao complexo *psilosis*, ocorrendo 34 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* e três de *C. orthopsilosis*. Nenhuma *C. metapsilosis* foi encontrada neste estudo. *C. albicans* (44 isolados) foi a espécie predominante encontrada.

A distribuição dos isolados do complexo *psilosis* presentes nos três hospitais do município do Rio de Janeiro, entre 1998 e 2006, mostra a maior frequência de *C. parapsilosis stricto sensu* circulando nos hospitais HSE, HUPE e SAM; seguida de *C. orthopsilosis* no HSE e HUPE; e *C. metapsilosis* presente apenas no HSE. Nossos achados corroboram a circulação de isolados de *C. orthopsilosis* em hospitais no município do Rio de Janeiro, uma vez que já foi descrita a associação de *C. parapsilosis* grupo II (hoje *C. orthopsilosis*) com um surto de fungemia por *C. parapsilosis* (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2000).

Lockhart et al. (2008a) em um dos primeiros relatos da descrição global da prevalência das três espécies do complexo *psilosis*, mostraram que entre 2001 e 2006 de 1.929 isolados de *C. parapsilosis*, provenientes de 89 centros de estudos em 29 países de seis continentes, na verdade continham um predomínio de *C. parapsilosis stricto sensu* (91,3%) seguido de *C. orthopsilosis* (6,1%), *C. metapsilosis* (1,8%) e *Lodderomyces elongisporus* (0,8%).

Como descrito em resultados, o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior 28S do DNA ribossomal de *C. orthopsilosis* apresentou uma variação na posição 176 das 570 bases, enquanto que 18 isolados (todos do HSE) apresentaram adenina nesta posição, 19

isolados (11 do HSE e 8 do HUPE) apresentaram timina, dessa forma gerando uma divisão neste grupo no dendrograma (**Figura 6**). Este fato também foi observado por Asadzadeh et al. (2009), onde relataram que o sequenciamento de seus isolados Kw301-97 (FM172988) e Kw709-04 (FM172989), apresentaram diferença em um único nucleotídeo, sendo que estas sequencias depositadas no GenBank, também possuem na posição 176 adenina e timina, respectivamente. Todos os nossos 18 isolados, identificados como *C. orthopsilosis*, com plimorfismo T→A, ocorreram em 10 pacientes oriundos do mesmo hospital (HSE), entre 29/08/2002 (paciente n.º 43, código da amostra n.º 53) e 05/12/2005 (paciente n.º 11, código da amostra n.º 97). Sendo assim, o desenvolvimento de métodos de tipagem de *C. orthopsilosis* se faz necessário, porém o genoma desta espécie só foi obtido em 2012 e 2014 (RICCOMBENI et al., 2012; PRYSZCZ et al., 2014).

A rápida identificação de uma levedura isolada de amostra clínica é particularmente importante não só do ponto de vista epidemiológico, mas, sobretudo, terapêutico. Porém, isso se complica devido ao número crescente de patógenos emergentes que não estão incluídos nos repertórios de *kits* comerciais disponíveis para a identificação ao nível de espécie por bioquímica. Assim, identificações de leveduras estão cada vez mais dependentes de técnicas de biologia molecular, como por exemplo, a amplificação por PCR e sequenciamento dos produtos resultantes de regiões conservadas de seus genomas (BORMAN et al., 2008).

Diferentes métodos de biologia molecular têm sido utilizados na identificação das espécies do complexo *psilosis*. Kocsubé et al. (2007) identificaram *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. metapsilosis* pela técnica RAPD e sequenciamento da região ITS do rDNA; Asadzadeh et al. (2009) identificaram seus isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis* pela PCR com os *primers* espécie-específicos, PCR-RFLP com a enzima de restrição *BanI* sobre região parcial do gene *SADH*, PCR-RFLP com cinco diferentes enzimas de restrição sobre a região IGS1 e, o sequenciamento das regiões ITS e D1/D2 do rDNA; Cantón et al. (2011), Miranda-Zapico et al. (2011) e Mohammadi et al. (2011) utilizaram a PCR-RFLP com a enzima de restrição *BanI* sobre região parcial do gene *SADH* e o sequenciamento da região ITS para identificar as três espécies do complexo; Garcia-Effron et al. (2012) identificaram seus isolados com a PCR-RFLP com a enzima de restrição *EcoRI* sobre região parcial do gene *FKSI* e o sequenciamento da região ITS; Moris et al. (2012) confirmaram seus resultados com a PCR-RFLP com a enzima de restrição *BanI* sobre região parcial do gene *SADH* e a técnica RAPD; Prandini et al. (2013) descreveram uma metodologia baseada na PCR capaz de diferenciar as três espécies do complexo *psilosis* pela inteína do gene *VMA*, inteínas são sequências codificantes que são transcritas e traduzidas

juntamente com as sequências que as flanqueiam (exteínas), em seguida ocorre o *splicing* de proteínas, assim a inteína é capaz de se auto-remover estabelecendo uma ligação peptídica entre as exteínas para formar uma proteína funcional, porém o sequenciamento da região ITS foi utilizado apenas para confirmar *C. orthopsilosis* e; Trabasso et al. (2014) propuseram a metodologia da LAMP, tendo como alvo o gene *TOP2* para distinguir as três espécies do complexo, sendo que os resultados foram também confirmados pelo sequenciamento da região ITS.

Feng et al. (2014) identificaram e diferenciaram as espécies do complexo *C. parapsilosis* combinando resultados de uma PCR de uma região parcial do gene *MnSOD* com uma ação enzimática (*StyI*) localizada apenas no *intron* de *C. orthopsilosis* e não em *C. metapsilosis*. A espécie aparentada *L. elongisporus* também foi utilizada neste estudo. No primeiro instante uma PCR de uma região do gene *MnSOD* foi realizada e na sequência a eletroforese revelou os seguintes produtos: 340 pb para *L. elongisporus*; 250 pb para *C. metapsilosis*, 235 pb para *C. orthopsilosis* e; 171 pb para *C. parapsilosis stricto sensu*. Esta diferença entre bases encontra-se no *intron* por conta da quantidade de *gaps* entre as espécies. Porém os autores relataram que os fragmentos de *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* são próximos, sendo assim necessário serem submetidas ao corte enzimático pela enzima de restrição *StyI*, no entanto esta ação enzimática ocorreu apenas na região do *exon* de *C. orthopsilosis*, dessa forma proporcionando fragmentos de 70 e 165 pb. Os autores ponderam que *C. parapsilosis stricto sensu* é a espécie mais predominante encontrada, e que *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* podem ser identificadas em um segundo momento caso necessário.

Como observamos nos dois parágrafos acima, dificilmente uma única metodologia de biologia molecular é utilizada na identificação das espécies do complexo *psilosis*, dessa forma, assim como outros autores, também utilizamos diferentes metodologias para a sua real identificação. Quando comparamos os nossos resultados do sequenciamento da região D1/D2 do rDNA com a PCR espécie-específica e a PCR-RFLP observamos uma concordância quase perfeita de acordo com a classificação de Landis e Koch (1977) através do coeficiente Kappa (0,96) (**Tabelas 7 e 8**). Porém, dois isolados, o 28287HSE (código da amostra 083) e o 28352HSE (código da amostra 084) apresentaram resultados discordantes em ambas metodologias, sendo que no sequenciamento da região D1/D2 do rDNA estes dois isolados foram identificados como *C. parapsilosis stricto sensu* e na PCR espécie-específica e PCR-RFLP demonstraram ser *C. orthopsilosis*. Com o intuito de se elucidar esta questão, o sequenciamento da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do rDNA foi realizado e estes dois isolados

revelaram ser *C. parapsilosis stricto sensu*. Dados semelhantes foram observados em estudo de Abi-chacra et al. (2013) (parágrafo abaixo) utilizando diferentes métodos de biologia molecular, onde também foram encontrados discordâncias e, portanto outros métodos complementares foram realizados para uma correta identificação das espécies.

Abi-chacra et al. (2013), em estudo das propriedades fenotípicas associadas com a virulência de isolados clínicos do complexo *C. parapsilosis*, utilizaram quatro diferentes métodos de biologia molecular na identificação destes isolados. Um total de 11 isolados clínicos de *C. parapsilosis lato sensu* mais três cepas de referência ATCC (22019, 96141 e 96143) foram utilizados. Os diferentes métodos de biologia molecular foram: PCR com os *primers* espécie-específicos; PCR-RFLP com a enzima de restrição *BanI* sobre o gene *SADH*; PCR-RFLP com a enzima de restrição *EcoRI* sobre o gene *FKSI* e; o sequenciamento da região D1/D2 do rDNA. Os resultados da PCR com os *primers* espécie-específicos mostraram nove isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* e dois isolados inespecíficos. A fim de se resolver esta questão, na sequência, as duas metodologias de PCR-RFLP foram empregadas, porém a PCR-RFLP com a enzima de restrição *BanI* sobre o gene *SADH* revelou serem todos os 11 isolados *C. parapsilosis stricto sensu*; enquanto que a PCR-RFLP com a enzima de restrição *EcoRI* sobre o gene *FKSI* revelou serem nove isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* e dois de *C. orthopsilosis*. Na confirmação destes dois isolados de *C. orthopsilosis* o sequenciamento da região D1/D2 do rDNA foi realizado. Após estas quatro metodologias em conjunto empregadas os autores chegaram à conclusão final de se tratarem de nove isolados *C. parapsilosis stricto sensu* e dois isolados de *C. orthopsilosis*, podendo assim dar continuidade aos testes fenotípicos associados à virulência.

Em um primeiro momento podemos utilizar os microsátélites (CP1, CP4a, CP6 e B) como identificadores de espécies de *C. parapsilosis stricto sensu*, uma vez que estes marcadores não estão presentes em *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (SABINO et al. 2010). Quando comparamos os resultados do sequenciamento da região D1/D2 do rDNA com os isolados que amplificaram para os microsátélites, observamos que 58 isolados amplificaram para os quatro marcadores (**Tabela 9**). No entanto, três isolados, o 28118HSE (código da amostra 080), o 28287HSE (código da amostra 083) e o 28352HSE (código da amostra 084) não amplificaram para o marcador CP4a (**APÊNDICE C**), porém foram considerados *C. parapsilosis stricto sensu* uma vez que amplificaram para os demais marcadores microsátélites (CP1, CP6 e B). Por isso foi encontrado concordância quase perfeita (Kappa = 1) de acordo com a classificação de Landis e Koch (1977). Vale lembrar que os dois últimos isolados mencionados (28287HSE e 28352HSE), que são provenientes do mesmo paciente

(n.º 4), foram também os que apresentaram discordância nas técnicas de PCR espécie-específica e PCR-RFLP quando comparados com os resultados do sequenciamento da região D1/D2 do rDNA. Entretanto, o sequenciamento da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do rDNA destes dois isolados foram realizados e revelaram ser *C. parapsilosis stricto sensu* (**Figura 13**). Acreditamos que com estes achados, estes três isolados poderiam se tratar de isolados atípicos e/ou indivíduos com variação genômica, dessa forma mais investigações seriam necessárias.

A sequência do genoma de seis diferentes espécies de *Candida*, incluindo *C. parapsilosis stricto sensu*, está disponível desde 2009 (BUTLER et al., 2009), facilitando numerosos estudos de biologia e virulência. Considerando que as propriedades de virulência podem variar significativamente entre cepas de uma mesma espécie, é importante estudar a fundo o perfil genético de diferentes isolados patogênicos. Este aspecto parece ser de particular importância para *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis* (PRYSZCZ et al., 2014).

Pryszcz et al. (2013), publicou a primeira comparação de genomas completos de diferentes cepas de *C. parapsilosis stricto sensu*, lançando uma luz sobre a estrutura populacional destas espécies. Os autores sequenciaram todo o genoma de três cepas de *C. parapsilosis stricto sensu*, sendo duas de amostras ambientais e uma de amostra clínica (sangue) e compararam com o genoma de *C. parapsilosis stricto sensu* descrita por Butler et al. (2009). Dentre os resultados destacamos: (i) elevada variabilidade intraespecífica em famílias de genes relevantes envolvidas na virulência, como a família *ALS* de adesinas; (ii) evidências de recombinação intracromossomal e regiões de repetição como mecanismo para gerar variações no número de cópias entre cepas, logo, verificou-se que regiões genômicas de alta variação são provavelmente o resultado de eventos de recombinação entre as diferentes cepas; (iii) como evidência independente para a recombinação entre linhagens clínicas e ambientais, relataram a existência de regiões de deleção e duplicação com limites idênticos em cepas que não são monofiléticas; (iv) mostraram a existência de expansões independentes no transporte de um *cluster* de arsenito em todas as cepas analisadas, este padrão é indicativo de seleção no meio ambiente, proporcionando assim um suporte adicional contra a proposta da expansão clonal das espécies no hospedeiro humano.

Análises iniciais da região ITS (diferença em três posições) (TAY; NA; CHONG, 2009) e genes *MAT* (*mating-type*) (homozigotos para *MTLa* e *MTL α* e heterozigoto *MLTa/ α*) mostraram que *C. orthopsilosis* é formada pelo menos por duas subespécies claramente distinguíveis chamadas de tipo 1 e tipo 2 (SAI et al., 2011). Em 2012, o genoma do tipo 2 de

C. orthopsilosis (isolado 90-125) foi sequenciado e comparado com o de *C. parapsilosis stricto sensu*. As principais diferenças encontradas incluem a expansão da família de genes de parede celular *IFF/HYR* e da família de genes transportadores monocarboxílicos *JEN* de *C. parapsilosis stricto sensu* em relação a *C. orthopsilosis* (RICCOMBENI et al., 2012).

No entanto, a falta de sequências de cepas adicionais de *C. orthopsilosis*, em particular da outra subespécie encontrada (tipo 1), impediu o conhecimento sobre a variabilidade genômica dentro desta espécie. De modo a preencher esta lacuna, Prysycz et al. (2014), sequenciaram o genoma de *C. orthopsilosis* ATCC 96141, atribuído como tipo 1, assim podendo comparar com o tipo 2. Inesperadamente verificou-se que esta cepa ATCC selecionada se tratava de um híbrido das duas subespécies. Esta conclusão é fortemente apoiada pela presença de um genoma altamente heterozigótico em que um dos haplótipos é em grande parte semelhante ao do tipo 1, enquanto que o outro haplótipo, que contém definido do tipo 1 os *loci MAT* e ITS possui uma divergência média de 5%. Além disso, o genoma definido como híbrido verificou ser diplóide, mostrando padrões de heterozigosidade compatível com o efeito de recombinação meiótica. Detectou-se também que o híbrido apresentou número de cópias mais elevadas em genes relacionados com a virulência, tais como bombas de efluxo e lipases secretadas. A importância deste achado levanta a questão de saber se a formação de híbridos e a virulência estão relacionadas, principalmente no que tange ao sucesso na propagação de cepas virulentas.

O processo de formação de híbridos foi recentemente reconhecido como um processo importante no reino dos fungos, mas a sua relevância para a patogênese permanece inexplorada. Este mecanismo pode ter implicações importantes na forma como os relevantes fenótipos de virulência podem evoluir dentro de linhagens patogênicas. É tentador especular que tal mecanismo pôde ter conferido algum tipo de vantagem seletiva no ambiente que facilitou a sua propagação, e ao mesmo tempo, conferindo maiores propriedades de virulência (MOLARES; DUJON, 2012). A constituição de híbridos pode desencadear a formação de novas espécies que podem exibir características fenotípicas únicas, e tem sido proposto que este mecanismo desempenha um papel no aparecimento de linhagens virulentas globalmente distribuídas, como demonstrado em fungos patógenos de plantas (STUKENBROCK et al. 2012).

Microsatélites são definidos como curtas repetições (entre 2-10 pares de bases) múltiplas em sequência no DNA dos eucariotos e são utilizados como importantes marcadores genéticos. Microsatélites são os mais frequentes marcadores com o propósito de diferenciação

em função da hipervariabilidade, fácil amplificação, interpretação e por se tratar de um ensaio automatizado (SAMPAIO et al., 2005).

A primeira metodologia relatada capaz de distinguir isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* pelo método dos microsátélites, foi a descrita por Lasker, Butler e Lott (2006) com seis marcadores dinucleotídeos e um trinucleotídeo, porém o poder discriminatório (PD) combinado alcançado para os sete *loci* utilizados foi de 0,97. Além disso, a tipagem por microsátélites dinucleotídeos apresenta limitações de acurácia na identificação alélica, mesmo o processo sendo automatizado, devido à alta frequência de um processo denominado *slippage* “deslizamento” da enzima DNA polimerase na repetição do dinucleotídeo durante o processo de polimerização.

Em nosso trabalho, a genotipagem de todos os 61 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* com os microsátélites (CP1, CP4a, CP6 e B) identificou 39 genótipos em *multilocus* dos quais 24 deles foram observados apenas uma vez. O genótipo mais prevalente, MG-1 (**Tabela 3**), foi encontrado em cinco isolados recuperados de dois pacientes. Considerando apenas os isolados independentes, o poder discriminatório (PD) combinado em *multiplex* foi de 0,99, estando de acordo com estudos anteriores (SABINO et al., 2010; DIAB-ELSCHAHAWI et al., 2012). Assim, os isolados com mesma combinação alélica para todos os *loci* analisados correspondem a estirpes geneticamente similares e são definidos como idênticos, enquanto que isolados com combinação alélica distinta para mais de um *locus* correspondem a estirpes geneticamente dissimilares e são definidos como diferentes, ao passo que isolados com dissimilaridade em apenas um *locus* são considerados casos de microvariação (**Tabela 3**).

No agrupamento das diferentes estirpes dos isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* relacionadas quanto à origem, observamos que diferentes pacientes compartilham estirpes similares (**Figura 12**). O paciente n.º 6 apresentou hemocultura positiva na amostra 057 e um mês depois a mesma estirpe estava presente no cateter (amostra 013) e novamente no sangue (amostra 058). Mais de um mês depois deste episódio, o paciente n.º 5, do mesmo hospital, foi infectado por uma estirpe similar (amostra 001). Pacientes n.ºs 14 e 11, do mesmo hospital, também apresentaram estirpes com mesmo genótipo em *multilocus* (MG-10), coletadas com aproximadamente sete meses de diferença (amostras 023 e 098). De forma similar, os pacientes n.ºs 15 e 19, do mesmo hospital, compartilham estirpes com genótipo MG-23 (amostras 010 e 025), coletadas com aproximadamente um ano e meio de diferença (23/08/2004 e 01/02/2006). Já os pacientes n.ºs 32 e 42, de diferentes hospitais, apresentam estirpes com o mesmo genótipo em *multilocus* (MG-22, amostras 009 e 031) coletadas com diferença de aproximadamente cinco meses (06/09/2005 e 01/02/2006). Os genótipos MG-22

e MG-23 diferem apenas para o *locus* CP4a sendo considerados microvariantes. Além disso, o MG-24 observado na amostra 022 do paciente n.º 41 e o MG-21 da amostra 030 do paciente n.º 42 podem também ser considerados microvariantes do MG-22 e MG-23. Estas observações sugerem que isolados com o genótipo em *multilocus* similar ao isolado de amostra 025 (MG-23), o primeiro a ser isolado, persistiu no ambiente hospitalar por um período entre agosto de 2004 a fevereiro de 2006, afetando seis diferentes pacientes. Casos similares de microvariação em diferentes pacientes do mesmo hospital podem ser observados em: (i) amostra 029 do paciente n.º 21 (MG-3) e um mês depois na amostra 032 do paciente n.º 30 (MG-2) e; (ii) amostra 063 do paciente n.º 29 (MG-26) e um ano e dois meses depois o microvariante MG-27 na amostra 085 do paciente n.º 18. Considerando que os pacientes não são relacionados, não podemos excluir a hipótese de infecção cruzada dos pacientes por intermédio das mãos dos profissionais de saúde, como extensivamente reportada em outros estudos (LUPETTI et al., 2002; HERNÁNDEZ-CASTRO et al., 2010; VAZ et al., 2011). Amostras 039 e 040 ou 041 também são consideradas microvariantes, porém a ausência de informação em relação à identidade dos pacientes (HUPE) impossibilita serem consideradas como uma possível infecção cruzada.

Vaz et al. (2011) em um estudo com 25 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* oriundos de um surto em uma unidade neonatal de tratamento intensivo, de um hospital infantil em Taiwan, mostrou dois grupos de isolados de sangue que foram relacionados com isolados das mãos dos funcionários do hospital e não relacionados com os isolados oriundos da colonização dos neonatos. A análise demonstrou que dois isolados da corrente sanguínea de neonatos apresentaram o mesmo genótipo em *multilocus* (CP1, CP4a, CP6 e B) de dois isolados das mãos de profissionais de saúde. Já os isolados da colonização dos neonatos não demonstraram relação com isolados da corrente sanguínea, porém o dendrograma os coloca próximos dos isolados das mãos dos profissionais de saúde. O estudo ainda sugere que os isolados da colonização dos neonatos possuem origem materna ou foram adquiridos de fontes do ambiente hospitalar, ao invés das mãos dos profissionais de saúde. Os autores finalizam o trabalho concluindo que a fonte da fungemia na unidade neonatal de tratamento intensivo foram as mãos dos profissionais de saúde.

Já em outro estudo, Romeo et al. (2013,) em outro estudo com 27 isolados de hemoculturas de *C. parapsilosis stricto sensu* recuperados em dois períodos de tempo diferentes (16 isolados entre 2007-2009 e 11 isolados entre 2011-2012), oriundos de crianças hospitalizadas na unidade neonatal de tratamento intensivo na Itália, revelaram a persistência e o domínio de um único genótipo em particular e microvariações nos demais. Dezesesseis

isolados (59%) compartilharam o mesmo perfil alélico, sendo assim considerado um único clone epidêmico responsável pela grande parte das infecções invasivas entre as crianças da unidade neonatal de tratamento intensivo. A análise pelos microsátélites (CP1, CP4a, CP6 e B) também possibilitou a identificação de dois genótipos adicionais (5 isolados, 18%; 2 isolados, 7%) com diferenças em apenas um *locus* quando comparado ao clone responsável pela maior parte das infecções. Os autores finalizam concluindo que uma mesma estirpe de *C. parapsilosis stricto sensu* foi isolada em diferentes ocasiões num período de aproximadamente cinco anos.

A análise por microsátélites possui uma vantagem sobre os outros métodos de tipagem comumente usados por conta desses comportarem-se como marcadores codominantes, evoluírem rapidamente no genoma e assim serem capazes de distinguir entre isolados e detectar microvariações. Têm sido descritos vários marcadores de microsátelite para genotipagem de diferentes espécies de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (HENNEQUIN et al., 2001), *C. albicans* (BRETAGNE et al., 1997; BOTTEREL et al., 2001; SAMPAIO et al., 2003; SAMPAIO et al., 2005), *C. krusei* (SHEMER et al., 2001) e *C. glabrata* (FOULET et al., 2005). Os microsátélites demonstraram ser também uma ferramenta valiosa para uso na diferenciação de cepas de *C. parapsilosis* e estudos epidemiológicos, nosocomiais e na cinética do processo colonização para infecção (SABINO et al., 2010).

Em nosso trabalho, analisando as relações das estirpes de *C. parapsilosis stricto sensu* de pacientes com isolados oriundos de culturas de sangue e cateter, foi possível observar que em cinco situações estas estirpes se mostraram idênticas (pacientes n.^{os} 6, 13, 18, 27 e 36), três situações mostraram microvariações no par sangue/cateter (pacientes n.^{os} 33, 39 e 42), e duas situações apresentaram diferentes estirpes em sangue/cateter (pacientes n.^{os} 11 e 27) (**Tabela 3**). A ocorrência de microvariações em isolados recuperados de cateteres tem sido relatada ao invés de isolados do sangue, para *C. parapsilosis stricto sensu* (ROMEIO et al., 2013) assim como para *C. albicans* (SHIN et al., 2004).

Em relação às estirpes de *C. parapsilosis stricto sensu* isoladas durante diferentes episódios de candidemia foi possível observar que, em relação à presença ou não do cateter, em pacientes que mantiveram a estirpe infectante (pacientes n.^{os} 4, 6, 13, 18 e 44), as datas de coleta foram de aproximadamente um mês. Por outro lado, todos os casos observados em que se sugere que a estirpe foi substituída (pacientes n.^{os} 11, 27 e 29), as datas de coletas foram superiores a três meses (**Tabela 3**). Observamos que a probabilidade da estirpe ser substituída no intervalo de três a seis meses foi estatisticamente significativa (P=0,018), sugerindo que

nestas infecções as estirpes de *C. parapsilosis stricto sensu* foram adquiridas do ambiente hospitalar.

A identificação de isolados geneticamente relacionados em nosso estudo obtidos do sangue e cateter, ocorrendo em diferentes pacientes no mesmo hospital, por vezes ao longo de vários anos, reforça o fato destas infecções possuírem origem nosocomial. A persistência temporal de uma simples estirpe de *C. parapsilosis stricto sensu* por um longo período de tempo, em um mesmo hospital ou enfermaria, associada a surtos, tem sido descrita em outros estudos (VIVIANE et al., 2006; ÁSMUNDSDÓTTIR et al., 2008; ROMEO et al., 2013).

Ao combinar os resultados dos diferentes isolados coletados de um mesmo paciente utilizando o sequenciamento da região D1/D2 do rDNA e os microsátélites, em nosso trabalho, observamos que de fato quatro pacientes (9,1%), todos do HSE, apresentaram *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis*, onde se pôde observar três situações: (i) possível alternância de espécies do complexo *psilosis* (pacientes n.ºs 11 e 19); (ii) possível alternância de estirpes de *C. parapsilosis stricto sensu* (paciente n.º 11) e; (iii) infecção polifúngica por diferentes espécies do complexo *psilosis* (pacientes n.ºs 13 e 14) (**Tabela 10**). Como relatado acima, a persistência temporal de uma estirpe no ambiente hospitalar, também pode explicar o fato de que o paciente internado por um longo período pode apresentar diferentes infecções, seja por diferentes espécies, seja por uma outra estirpe. Vale salientar que só se pôde dizer que *C. parapsilosis stricto sensu* (MG-10) oriunda de amostra de sangue do dia 01/02/2006 do paciente n.º 11 é uma estirpe diferente da *C. parapsilosis stricto sensu* (MG-37) oriunda do cateter do dia 29/10/2005, por meio da técnica dos microsátélites. A situação do paciente n.º 11, além de apresentar diferentes estirpes de *C. parapsilosis stricto sensu*, ainda apresenta *C. orthopsilosis* em diferentes momentos. Este fato, somente pela identificação bioquímica seria apenas uma persistência ou reinfecção de *C. parapsilosis lato sensu*.

Infecções polifúngicas por espécies do gênero *Candida* são mais comuns em indivíduos imunodeprimidos e hospitalizados por longos períodos. Semelhança entre espécies, seja fenotípica ou genotípica em infecções polifúngicas, pode não evidenciar tal fato, mas espécies bem mais facilmente distinguíveis podem ser encontradas em diferentes combinações em onicomioses, candidíases orais e fungemias (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Rodrigues et al. (2007) avaliaram as espécies de *Candida* na mucosa orofaríngea em 52 portadores de HIV e 52 não portadores de HIV, residentes na região Nordeste Paulista. A taxa de isolamento de *Candida* foi significativamente maior no grupo com HIV (76,9%) que no grupo controle (50%). Foram isoladas cerca de 79% de amostras de *C. albicans* e 21% de não-*albicans*, nos dois grupos estudados. As espécies de *Candida* não-*albicans* isoladas a

partir da mucosa oral dos pacientes com HIV foram: duas de *C. dubliniensis*, duas de *C. krusei*, duas de *C. inconspicua*, duas de *C. tropicalis*, uma de *C. guilliermondii*, e uma de *C. famata*. Já no grupo controle, as espécies de *Candida* não-*albicans* foram: três de *C. glabrata*, uma de *C. famata*, uma de *C. tropicalis* e uma de *C. parapsilosis*. No grupo controle, três indivíduos (7%) apresentaram duas espécies (infecção polifúngica), de dois deles foram isoladas amostras de *C. glabrata* e *C. albicans*, enquanto que um terceiro apresentou *C. parapsilosis* e *C. albicans*. Já no grupo com HIV, sete indivíduos (14%) apresentaram diferentes combinações de espécies configurando dupla colonização (infecção polifúngica): dois deles portavam *C. albicans* e *C. inconspicua*, um *C. albicans* e *C. guilliermondii*, um *C. albicans* e *C. dubliniensis*, um *C. krusei* e *C. dubliniensis*, um *C. albicans* e *C. krusei* e, um último *C. albicans* e *C. famata*.

Como sabemos, existem poucos estudos que relatam infecções polifúngicas envolvendo as espécies do complexo *psilosis*, e nenhum de infecções sistêmicas. Feng et al. (2012), em um estudo com as espécies do complexo *psilosis* em infecções superficiais, encontraram 7,5% delas como polifúngicas (todos os isolados do complexo *psilosis* oriundos das 16 populações polifúngicas eram *C. parapsilosis stricto sensu*). Escribano et al. (2014) menciona dois casos de infecção polifúngica (*C. albicans* e *C. glabrata*) em 20 pacientes hospitalizados com candidemia relacionada ao cateter, no entanto nenhuma espécie do complexo *psilosis* estava envolvida nestas infecções.

É evidente a capacidade de formação de biofilme por *C. parapsilosis stricto sensu* em cateteres e outros dispositivos médicos de implante (KUHN et al., 2002; TUMBARELLO et al., 2007), especialmente quando comparada com as outras espécies do complexo, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (LATTIF et al., 2010). Isto pode explicar o fato de que em infecções polifúngicas sistêmicas se isola do cateter geralmente *C. parapsilosis stricto sensu* e não *C. orthopsilosis*. Entretanto, não se pode colocar em dúvida a capacidade de formação de biofilme por *C. orthopsilosis*, pois, em nosso trabalho, quando apenas esta espécie foi encontrada, estava presente tanto no sangue como no cateter (por exemplo, pacientes n.ºs 12, 17 e 35) (**APÊNDICE C**). Em contrapartida, em amostras de sangue/cateter (**Tabela 10**), quando *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis* estavam presentes em infecção polifúngica (pacientes n.ºs 13 e 14), *C. parapsilosis stricto sensu* foi isolada do cateter e *C. orthopsilosis* do sangue.

É importante ressaltar que este estudo foi retrospectivo com isolados de *C. parapsilosis lato sensu* oriundos de amostras de sangue e cateter de três diferentes hospitais do município do Rio de Janeiro, entre 1998 e 2006. Porém os dados obtidos no presente

trabalho substanciam a necessidade de (i) maiores esforços no sentido de utilização de técnicas diversificadas com o objetivo de identificar com maior confiabilidade as espécies do complexo *psilosis*; (ii) cuidados com a manipulação do cateter, uma vez que possibilita a introdução exógena do patógeno invasor em pacientes comprometidos e; (iii) estudos de constante vigilância e monitoramento do ambiente hospitalar para identificar possíveis permanências de estirpes e suas rotas de transmissão.

7 CONCLUSÕES

1. Neste trabalho ficou evidenciado que todos os 100 isolados deste estudo, estocados entre 1998 e 2006 no Setor de Imunodiagnóstico, Laboratório de Micologia, do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, foram classificados como espécies *C. parapsilosis lato sensu*.
2. A caracterização do complexo *psilosis* somente foi obtida pelo uso de métodos moleculares em conjunto, pois auxilia tanto no processo de discriminação do complexo *psilosis* quanto tipagem de *C. parapsilosis stricto sensu*.
3. *C. parapsilosis stricto sensu* foi a espécie predominante, seguida respectivamente de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, após o sequenciamento da região D1/D2 do rDNA, metodologia padrão ouro empregada neste trabalho, seguindo a tendência encontrada na literatura mundial, tal evento pode ser parcialmente explicado devido à sua capacidade de formar biofilme quando comparada com as outras espécies do complexo e por ser de natureza ubíqua, uma vez que pode ser isolada de diferentes fontes.
4. O sequenciamento da região D1/D2 do rDNA, a PCR espécie-específica e a PCR-RFLP identificam as três espécies do complexo *psilosis*, porém a metodologia dos microsatélites identifica apenas as espécies de *C. parapsilosis stricto sensu*, sendo assim um fator limitante no processo de tipagem das outras espécies do complexo.
5. Apesar da limitação intrínseca da metodologia dos microsatélites, por ausência de marcadores específicos para as demais espécies, esta metodologia proporcionou demonstrar microvariações bem como características dos alelos o que define possíveis microevoluções em tais isolados.
6. Baseado na metodologia padrão ouro (sequenciamento da região D1/D2 do rDNA) a correlação das metodologias PCR espécie-específica, PCR-RFLP e microsatélite especificamente para o processo de identificação, apresentam correlação quase perfeita, pois há presença de isolados discordantes. Tal resultado não denota baixa eficiência das metodologias empregadas; porém podem ser considerados isolados atípicos.

7. Considerando o conceito de praticidade na execução, o método do PCR-RFLP é uma opção dentre as metodologias empregadas, quando comparado com os outros métodos deste trabalho.

8. Dentre todas as metodologias envolvidas nesse estudo, a análise dos microsatélites demonstra se as estirpes de *C. parapsilosis stricto sensu* em questão, se mantêm; se ocorre presença de genótipos distintos ou se são aparentadas; identificando potenciais rotas de transmissão e permanência de uma determinada estirpe no ambiente hospitalar; embora não seja uma metodologia de uso rotineiro.

9. Presença de infecção polifúngica por *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis* em dois pacientes (n.^{os} 13 e 14), determinada através do sequenciamento da região D1/D2 do rDNA revela uma necessidade de investigação epidemiológica mais apurada no sentido de verificar fatores de virulência, fonte de infecção e intensificar a inserção de medidas profiláticas.

REFERÊNCIAS

Abi-chacra EA, Souza LOP, Cruz LP, Braga-Silva LA, Gonçalves DS, Sodré CL et al. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. FEMS Yeast Res. 2013;13(8):831-848.

Adler-Shohet F, Waskin H, Lieberman M. Amphotericin B lipidic complex for neonatal invasive candidiasis. Arch Dis Child Fetal Neonatal. 2001;84(2):F131-F133.

Aittakorpi A, Kuusela P, Koukila-K hk l  P, Vaara M, Petrou M, Gant V et al. Accurate and rapid identification of *Candida* spp frequently associated with fungemia by using PCR and the microarray-based prove-it sepsis assay. J Clin Microbiol. 2012;50(11):3635-3640.

Alangaden GJ. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. Infect Dis Clin North Am. 2011;25(1):201-225.

Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, et al. Epidemiology, risk factors and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infection: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona from 2002 to 2003. J Clin Microbiol. 2006;44(5):1681-1685.

Anaisse EJ. Diagnosis and therapy of fungal infection in patients with leukemia-new drugs and immunotherapy. Best Pract Res Clin Haematol. 2008;21(4):683-690.

Anaisse EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Micology. Philadelphia (PA): Churchill Livingstone; 2003.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detec o e Identifica o dos Fungos de Importância Médica. Módulo VII. 2004. [Acesso em: 25 de ago 2010]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf

API[®] 20 C AUX [Manual do API[®] 20 C AUX]. Sistema de identifica o das leveduras. Referência 20 210, 07628G-pt. Março de 2003. bioMérieux, França.

Araújo CR, Miranda KC, Passos XS, Souza LKH, Lemos JÁ, Khrais CHA et al. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMagar® *Candida*. Rev Patol Trop. 2005;34(1):37-42.

Arikan S. Current status of antifungal susceptibility methods. Med Mycol. 2007;45(7):569-587.

Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan ZU. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. J Med Microbiol. 2009;58(Pt 6):745-752.

Ashford B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. Am J Trop Med Hyg. 1928;8:507-538.

Ásmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Haraldsson G, Guo H, Xu J, Gottfredsson M. Molecular Epidemiology of Candidemia: Evidence of Clusters of Smoldering Nosocomial Infections. Clin Infect Dis. 2008;47(2):e17-e24.

Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostics: a mini review. J Appl Genet. 2004;45(1):3-15.

Barbedo LS, Brito SCP, Kegele FCO, Cordeiro JA, Oliveira JC, Sgarbi DBG. Etiologia dos casos de candidíase cutânea atendidos no serviço de micologia da Universidade Federal Fluminense, Brasil. Rev Soc Venez Microbiol. 2013;33(1):53-59.

Barbedo LS, Sgarbi DBG. Candidíase. DST - J Bras Doenças Sex Transm. 2010;22(1):22-38.

Barnes PD, Marr KA. Risks, diagnosis, and outcome of invasive fungal infections in haemotopoietic stem cell transplant recipients. Br J Haematol. 2007;139(4):519-531.

Berdal J-E, Haagensen R, Ranheim T, Bjornholt JV. Nosocomial candidemia; risk factors and prognosis revisited; 11 years experience from a norwegian secondary hospital. PLoS One. 2014;9(7):e103916.

Berenguer J, Buck M, Witebsky F, Stock F, Pizzo PA, Walsh TJ. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis. Disseminated versus single-organ infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1993;17(2):103-109.

Biswas S, Dijck PV, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007;71(2):348-376.

Bonfietti LX, Martins MA, Szeszs MW, Pukiskas SB, Purisco SU, Pimentel FC et al. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 7):1003-1008.

Bourgeois N, Dehandschoewercker L, Bertout S, Bousquet PJ, Rispaël P, Lachaud L. Antifungal susceptibility of 205 *Candida* spp. isolated primarily during invasive candidiasis and comparison of the vitek 2 system with the CLSI broth microdilution and Etest methods. *J Clin Microbiol*. 2010;48(1):154-161.

Borghi E, Iatta R, Sciota R, Biassoni C, Cuna T, Montagna MT et al. Comparative evaluation of the Vitek 2 yeast susceptibility test and CLSI broth microdilution reference method for testing antifungal susceptibility of invasive fungal isolates in Italy: the GISIA3 study. 2010;48(9):3153-3157.

Borghi E, Sciota R, Iatta R, Biassoni C, Montagna MT, Morace G. Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30(11):1437-1441.

Boriollo MFC, Dias RA, Fiorini JE, Oliveira NMS, Spolidório DMP, Souza HMB et al. Disparity between *multilocus* enzyme electrophoresis, microsatellite markers and pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological tracking of *Candida albicans*. *J Microbiol Methods*. 2010;82(3):265-281.

Borman AM, Linton CJ, Oliver D, Palmer MD, Szekeley A, Johnson EM. Rapid molecular identification of pathogenic yeasts by pyrosequencing analysis of 35 nucleotides of internal transcribed spacer 2. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3648-3653.

Bormann AM, Linton CJ, Miles S-J, Johnson EM. Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemoter.* 2008;61(Suppl 1):i7-i12.

Botterel F, Desterke C, Costa C, Bretagne S. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for a rapid typing. *J Clin Microbiol.* 2001;39(11):4076-4081.

Bougnoux ME, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D et al. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by Nested PCR. *J Clin Microbiol.* 1999;37(4):925-930.

Bretagne S, Costa J-M, Besmond C, Carsique R, Calderone R. Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for a typing system. *J Clin Microbiol.* 1997;35(7):1777-1780.

Buchman TG, Rossier M, Merz WG, Charache P. Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part I. Rapid identification of *Candida albicans* by *in vitro* amplification of a fungus-specific gene. *Surgery.* 1990;108(2):338-347.

Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature.* 2009;459:657-662.

Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2011;55(12):5590-5596.

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

Cassone A, De Bernardis F, Pontieri E, Carruba G, Girmenia C, Martino P et al. Biotypic diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis*. 1995;171(4):967-975.

Cendejas-Bueno E, Kolecka A, Alastruey-Izquierdo A, Theeled B, Groenewald M, Kostrzewa M et al. Reclassification of the *Candida haemulonii* complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: Three multiresistant human pathogenic yeasts. *J Clin Microbiol*. 2012;50(11):3641-3651.

Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by multiplex PCR methods. *J Clin Microbiol*. 2001;39(10):3466-3471.

Chaves GM, Cavalcanti MAQ, Porto ALF. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeast strains. *Braz J Microbiol*. 2003;34(3):197-202.

Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Bui U et al. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):4042-4051.

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

Chen YC, Lin YH, Chen KW, Lii J, Teng HJ, Li SY. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68(3):284-292.

Chen YR, Lin LC, Young TG, Liu CE, Chen CH, Tsay RW. Risk factors for candidemia-related mortality at a medical center in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2006;39(2):155-161.

Cheng S, Clancy CJ, Checkley MA, Zhang Z, Wozniak KL, Seshan KR et al. The role of *Candida albicans* NOT5 in virulence depends upon diverse host factors in vivo. *Infect Immun*. 2005;73(11):7190-7197.

Cisterna R, Ezpeleta G, Telleria O, Guinea J, Regueiro B, Garcia-Rodríguez J et al. Nationwide sentinel surveillance of bloodstream *Candida* infections in 40 tertiary care hospitals in Spain. *J Clin Microbiol*. 2010;48(11):4200-4206.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa. 1997.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – second edition M27-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa. 2002a.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – second information supplement M27-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa. 2002b.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – Third edition. CLSI document M-27A3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa. 2008a.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – Third information supplement. CLSI document M-27 S3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA. 2008b.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guideline – Second edition. CLSI document M44-A2. Wayne, PA:2009a.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guideline – Second edition supplement CLSI document M44-S3. Wayne, PA:2009b.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – Fourth information supplement. CLSI document M-27 S4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA. 2012.

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(5):599-607.

Colombo AL, Guimarães T, Sukienik T, Pasqualotto AC, Andreotti R, Queiroz-Telles et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. Intensive Care Med. 2014;40(10):1489-1498.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. J Clin Microbiol. 2006;44(8):2816-2823.

Conde-Rosa A, Amador R, Perez-Torres D, Cólón E, Sánchez-Rivera C, Nievas-Plaza M et al. Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center. P R Health Sci J. 2010; 29(1): 26-29.

Cornely OA, Böhme A, Buchheidt D, Einsele H, Heinz WJ, Karthaus M et al. Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies. Recommendations of the infectious diseases working party of the German Society for Haematology and Oncology. Haematologica. 2009;94(1):113-122.

Cortéz JA, Russi JA. Equinocandinas. Rev Chil Infectol. 2011;28(6):529-536.

Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Should antifungal treatments be based upon results of antifungal susceptibility testing? Rev Iberam Micol. 2002;19(3):133-138.

Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Mellado E, Warnock DW, *et al.* Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(11):3644-3647.

Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quimioter.* 2010; 23(4):169-176.

Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Comité on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) broth microdilution referente methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for *in vitro* detection of resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2010;48(5):1782-1786.

De Carolis E, Hensgens LA, Vella A, Posteraro B, Sanguinetti M, Senesi S *et al.* Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF vs. AFLP. *Med Mycol.* 2014;52(2):123-130.

Diab-Elschahawi M, Forstner C, Hagen F, Meis JF, Lassnig AM, Presterl E *et al.* Microsatellite genotyping clarified conspicuous accumulation of *Candida parapsilosis* at a cardiothoracic surgery intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3422-3426.

Diezmann S, Cox CJ, Schönian G, Vilgalys RJ, Mitchell TG. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5624-5635.

Dignani MC, Solomkin JS, Anaisse E. *Candida*. In: Anaisse EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. *Medical Mycology*. 1st edition. Philadelphia: Churchill Livingstone;2003:p195-239.

Diogo HC, Sarpieri A, Pires MC. Preservação de fungos em água destilada. *An Bras Dermatol.* 2005;80(6):591-594.

Dizbay M, Findan I, Kalkanci A, Sari N, Yalcin B, Kustimur S et al. High incidence of *Candida parapsilosis* candidaemia in non-neutropenic critically ill patients: epidemiology and antifungal susceptibility. *Scand J Infect Dis.* 2010;42(2):114-120.

Dizbay M, Kalkanci A, Sezer BE, Aktas F, Aydogan S, Fidan I et al. Molecular Investigation of a fungemia outbreak due to *Candida parapsilosis* in an intensive care unit. *Bras J Infect Dis.* 2008;12(5):395-399.

Eggimann P, Bille J, Marchetti O. Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU. *Ann Intensive Care.* 2011;1:1-37.

Ellepola ANB, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol.* 2005;43(5):65-84.

Enache-Angoulvant A, Guitard J, Grenouillet F, Martin T, Durrens P, Fairhead C et al. Rapid discrimination between *Candida glabrata*, *Candida nivariensis*, and *Candida bracarensis* by use of a singleplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3375-3379.

Enger L, Joly S, Pujol C, Simonson P, Pfaller M, Soll DR. Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):658-669.

Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González-Gómez N, Pontón J et al. Evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3340-3345.

Escribano P, Guinea J, Marcos-Zambrano LJ, Martín-Rabadán P, Fernández-Cruz A, Sánchez-Carrillo C et al. Is catheter-related candidemia a polyclonal infection? *Med Mycol.* 2014;52(4):411-416.

Feng X, Ling B, Yang G, Yu X, Ren D, Yao Z. Prevalence and distribution profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* responsible for superficial candidiasis in a Chinese university hospital. *Mycopathologia*. 2012;173(4):229-234.

Feng X, Wu Z, Ling B, Pan S, Liao W, Pan W et al. Identification and differentiation of *Candida parapsilosis* complex species by use of exon-primed intron-crossing PCR. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1758-1761.

Figueiredo-Carvalho MHG, Barbedo LS, Oliveira MME, Brito-Santos F, Almeida-Paes R, Zancopé-Oliveira RM. Comparison of commercial methods na the CLSI broth microdilution to determine the antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* complex bloodstream isolates from three health institutions in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia*. 2014;178(1-2):27-35.

Foulet F, Nicolas N, Eloy O, Botterel F, Gantier J-C, Costa J-M et al. Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4574-4579.

Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol*. 2001;39(1):9-33.

Fundyga RE, Kuykendall RJ, Lee-Yang W, Lott TJ. Evidence for aneuploidy and recombination in the human commensal yeast *Candida parapsilosis*. *Infect Genet Evol*. 2004;4(1):37-43.

Gácsér A, Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol*. 2007a;44(12):1336-1341.

Gácsér A, Trofa D, Schäfer W, Nosanchuk JD. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipases in virulence. *J Clin Invest*. 2007b;117(10):3049-3058.

Garcia-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlin DS. Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato species isolated from bloodstream infections at Spanish university hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2739-2748.

Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2305-2312.

Garcia-Vidal C, Viassus D, Carratalà J. Pathogenesis of invasive fungal infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(3):270-276.

Giolo MP, Estivalet-Svidzinski TI. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. *J Bras Patol Med Lab.* 2010;46(3):225-234.

Giusiano GE, Mangiaterra M, Rojas F, Gomes V. Yeasts species distribution in neonatal intensive care units in northeast Argentina. *Mycoses.* 2004;47(7):300-303.

Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(3):401-405.

Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodríguez-Tudela JL et al. Prevalence and susceptibility of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2008a;52(4):1506-1509.

Gomez-Lopez A, Zaragoza O, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Pharmacotherapy of yeast infections. *Expert Opin Pharmacother.* 2008b;9(16):2801-2816.

Gonçalves SS, Amorim CS, Nucci M, Padovan ACB, Briones MRS, Melo ASA et al. Prevalence rates and antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(7):885-887.

Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(3):454-500.

Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sá M, Johnson EM et al. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med.* 2009;35(1):55-62.

Hamajima K, Nishikawa A, Shinoda T, Fukazawa Y. Deoxyribonucleic acid base composition and its homology between two forms of *Candida parapsilosis* and *Lodderomyces elongisporus*. *J Gen Appl Microbiol.* 1987;33:299-302.

Hata DJ, Hall L, Fothergill AW, Larone DH, Wengenack NL. Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1087-1092.

Hennequin C, Thierry A, Richard GF, Lecointre G, Nguyen HV, Gaillardin C et al. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):551-559.

Hensgens LAM, Tavanti A, Mogavero S, Ghilardi E, Senesi S. AFLP genotyping of *Candida metapsilosis* clinical isolates: evidence for recombination. *Fungal Genet Biol.* 2009;46(10):750-758.

Hernández-Castro R, Arroyo-Escalante S, Carrillo-Casas EM, Moncada-Barrón D, Alvarez-Verona, Hernández-Delgado L et al. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *Eur J Pediatr.* 2010;169(7):783-787.

Holland LM, Schröder MS, Turner SA, Taff H, Andes D, Grózer Z et al. Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. PLOS Pathogens. 2014;10(9):e1004365.

Horvath LL, George BJ, Murray CK, Harrison LS, Hospenthal DR. Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for *Candida* growth detection. J Clin Microbiol. 2004;42(1):115-118.

Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;48(3):153-160.

Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988;26(11):2465-2466.

James SA, Collins MD, Roberts IN. The genetic relationship of *Lodderomyces elongisporus* to other ascomycete yeast species as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. Lett Appl Microbiol. 1994;19(5):308-311.

Joachin H, Polayes S. Subacute endocarditis an systemic mycosis (monilia). JAMA. 1940;115(1):205-208.

Kato M, Ozeki M, Kikuchi A, Kanbe T. Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic *Candida* species. Gene. 2001;272(1-2):275-281.

Kim SK, El Bissati K, Mamoun CB. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. Microbiology. 2006;152(Pt 10):2885-2894.

Kitch TT, Jacobs MR, McGinnis MR, Appelbaum PC. Ability of RapID yeast plus system to identify 304 clinically significant yeasts within 5 hours. J Clin Microbiol. 1996;34(5):1069-1071.

Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59(4):401-406.

Kocsubé S, Tóth M, Vágvölgyi C, Dóczy I, Pesti M, Pócsi I et al. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. *J Med Microbiol*. 2007;56(Pt 2):190-195.

Kubesová A, Salplachta J, Horká M, Ruzicka F, Slais K. *Candida* “*psilosis*” – electromigration techniques and MALDI-TOF mass spectrometry for phenotypical discrimination. *Analyst*. 2012;137(8):1937-1943.

Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*. 2002;70(2):878-888.

Kuhn DM, Mukherjee PK, Clark TA, Pujol C, Chandra J, Hajjed RA et al. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(6):1074-1081.

Kumar CP, Menon T. Biofilm production by clinical isolates of *Candida* species. *Med Mycol*. 2006;44(1):99-101.

Kurtzman CP, Fell JW, Boewhout T. *The Yeast, a Taxonomy Study*. 5th edition. United States of America, Elsevier; 2011.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de micologia médica Lacaz*. 9. ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

Laffey SF, Butler G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*. 2005;151(Pt 4):1073-1081.

Lain A, Moragues MD, García-Ruiz JC, Mendoza J, Camacho A, Palacio A et al. Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect immunoglobulin G antibody to

enolase for serodiagnosis of invasive candidiasis. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(3):318-319.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-174.

Larone DH. *Medically important fungi: a guide to identification.* 4th edition. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 2002.

Lasker BA, Butler G, Lott TJ. Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. *J Clin Microbiol.* 2006;44(3):750-759.

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

Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol.* 1992;30(12):3249-3254.

Lin D, Wu Lung-Chi, Rinaldi MG, Lehmann PF. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol.* 1995;33(7):1815-1821.

Linder N, Klinger G, Shalit I, Levy I, Ashkenazi S, Haski G et al. Treatment of candidaemia in premature infants: comparison of three amphotericin B preparations. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(4):663-667.

Linton CJ, Borman AM, Cheung G, Holmes AD, Szekely A, Palmer MD et al. Molecular identification of unusual pathogenic yeast isolates by large ribosomal subunit gene sequencing: 2 years of experience at the United Kingdom mycology reference laboratory. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1152-1158.

Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 2008a;46(8):2659-2664.

Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. J Clin Microbiol. 2008b;46(1):374-376.

Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M et al. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). Intensive Care Med. 2014;40(9):1303-1312.

Lott TJ, Kuykendall RJ, Welbel SF, Pramanik A, Lasker BA. Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. Curr Genet. 1993;23(5-6):463-467.

Luo G, Samaranayake LP, Cheung BP, Tang G. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP expression in *Candida glabrata* and its possible role in vitro haemolysin production. APMIS. 2004;112(4-5):283-290.

Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusini I et al. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol. 2002;40(7):2363-2369.

Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, Crokaert F. Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. J Clin Microbiol. 2004;42(7):3159-3163.

Mariano PLS, Gonçalves RB, Höfling JF. Storage procedures for yeast preservation: phenotypic and genotypic evaluation. Ann Microbiol. 2007;57(3):461-465.

Medeiros EAS, Lott TJ, Colombo AL, Godoy P, Coutinho AP, Braga MS et al. Evidence for pseudo-outbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in a university hospital in Brazil. J Clin Microbiol. 2007;45(3):942-947.

Menezes EA, Guerra ACP, Rodrigues RCB, Peixoto MMLV, Lima LS, Cunha FA. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do banco de leite humano da universidade federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos. J Bras Patol Med Lab. 2004;40(5):299-305.

Mensa J, Pitart C, Marco F. Treatment of critically ill patients with candidemia. Int J Antimicrob Agents. 2008;32(2):S93-S97.

Metin DY, Hilmioglu-Polat S, Samlioglu P, Doganay-Ofllazoglu B, Inci R, Tumbay E. Evaluation of antifungal susceptibility testing with microdilution and Etest methods of *Candida* blood isolates. Mycopathologia. 2011;172(3):187-199.

Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME) 8.^a ed.- Brasília, DF. 2013.

Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM e al. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. J Antimicrob Chemother. 2011;66(10):2315-2322.

Mohammadi R, Mirhendi H, Yadegari MH, Ghahri M, Shadzi S, Jalalizand N et al. [Evaluation of prevalence of the new *Candida* species (*C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*) among *C. parapsilosis* group isolated from patients by PCR-RFLP of SADH gene in Iran]. J Isfahan Med School. 2011;29(134):376-384.

Monge RA, Román E, Nombela C, Pla J. The MAP kinases signal transduction network in *Candida albicans*. Microbiology. 2006;152(Pt 2):905-912.

Morace G, Borghi E. Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics. Minerva Anesthesiol. 2010;76(11):950-956.

Morales L, Dujon B. Evolutionary role of interspecies hybridization and genetic exchanges in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;76(4):721-739.

Moreira-Oliveira MS, Mikami Y, Miyaji M, Imai T, Schreiber AZ, Moretti ML. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24(11):721-726.

Moris DV, Melhem MSC, Martins MA, Souza LR, Kacew S, Szeszs MW et al. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* complex isolates collected from oral cavities of HIV-infected individuals. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 12):1758-1765.

Moudgal V, Little T, Boikov D, Vasquez JA. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):767-769.

Muniz MM, Tavares PMS, Meyer W, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira M. Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(13):4438-4447.

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

Németh T, Tóth A, Szenzenstein J, Horváth P, Nosanchuk JD, Grózer Z et al. Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis* sensu lato species. *PloS One.* 2013;8(7):e68704.

Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Andes D. Beta-1,3 glucan as a test for central venous catheter biofilm infection. *J Infect Dis.* 2007;195(11):1705-1712.

Nieto MC, Tellería O, Cisterna R. Sentinel surveillance of invasive candidiasis in Spain: epidemiology and antifungal susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;81(1):34-40.

Nosek J, Tomáška L, Ryčovská A, Fukuhara H. Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 2002;40(4):1283-1289.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. Clin Infect Dis. 2010;51(5):561-570.

Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vasquez J, Pappas PG, Saeki F et al. Multicenter clinical evaluation of the (1→3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin Infect Dis. 2005;41(5):654-659.

Padovan AC, Melo AS, Colombo AL. Systematic review and new insights into the molecular characterization of the *Candida rugosa* species complex. Fungal Genet Biol. 2013;61:33-41.

Pemán J, Almirante B. Avances en el diagnóstico y tratamiento de las infecciones por levaduras: papel de los nuevos antifúngicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26(Suppl 13):38-46.

Pemán J, Cantón E, Linares-Sicilia MJ, Roselló EM, Borell N, Pérez-de-Pipaon MTR et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey. J Clin Microbiol. 2011;49(12):4158-4163.

Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer AS, Moet GJ, Jones RN, et al. Comparison of European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. J Clin Microbiol. 2010;48(5):1592-1599.

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

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell KP, Colombo AL, Finkelstein J et al. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005. J Clin Microbiol. 2008;46(3):842-849.

Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3522-3528.

Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38(1):65-69.

Pires RH, Santos JM, Zaia JE, Martins CGH, Mendes-Giannini MJS. *Candida parapsilosis* complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and in vitro evaluation of the use of clinical antifungals. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(6):646-654.

Pontón J, Palacio A. Avances y limitaciones del diagnóstico precoz de las infecciones invasoras causadas por levaduras. *Rev Iberoam Micol.* 2007;24(3):181-186.

Prandini TH, Theodoro RC, Bruder-Nascimento AC, Scheel CM, Bagagli E. Analysis of inteins in the *Candida parapsilosis* complex for simple and accurate species identification. *J Clin Microbiol.* 2013;51(9):2830-2836.

Pryszcz LP, Németh T, Gácsér A, Gabaldón T. Genome comparison of *Candida orthopsilosis* clinical strains reveals the existence of hybrids between two distinct subspecies. *Genome Biol Evol.* 2014;6(5):1069-1078.

Pryszcz LP, Németh T, Gácsér A, Gabaldón T. Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Genome Biol Evol.* 2013;5(12):2382-2392.

Purisco SU, Martins MA, Szeszs MW, Castro e Silva DM, Pukinkas SRBS, Bonfietti LX et al. Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and the Clinical Laboratory Standards Institute BMD method for non-*Candida albicans* and non-*C. tropicalis* bloodstream isolates from eleven tertiary hospitals in São Paulo state, Brazil. *FEMS Yeast Res.* 2012;8(12):890-896.

Quiles-Melero I, García-Rodríguez J, Gómez-López A, Mingorance J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(1):67-71

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

Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):643-658.

Riccombeni A, Vidanes G, Proux-Wéra E, Wolfe KH, Butler G. Sequence and analysis of the genome of the pathogenic yeast *Candida orthopsilosis*. *PLoS One.* 2012;7(4):e35750.

Rodrigues GMC, Capobianco TD, Atique TSC, Conceição LM, Fraga VD, Giannini MJS et al. Estudo de colonização por *Candida* sp. na cavidade oral de indivíduos soropositivos e soronegativos para HIV-1 no noroeste paulista, Brasil. *Rev Panam Infectol.* 2007;9(3):26-31.

Romeo O, Criseo G. Molecular epidemiology of *Candida albicans* and its closely related yeasts *Candida dubliniensis* and *Candida africana*. *J Clin Microbiol.* 2009;47(1):212-214.

Romeo O, Delfino D, Cascio A, Lo Passo C, Amorini M, Romeo D et al. Microsatellite-based genotyping of *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates reveals dominance and persistence of a particular epidemiological clone among neonatal intensive care unit patients. *Infect Genet Evol.* 2013;13:105-108.

Roy B, Meyer SA. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 1998;36(1):216-218.

Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M. Antifungals for systemic use. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27(6):353-362.

Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R et al. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(6):2009-2015.

Sabino R, Sampaio P, Rosado L, Stevens DA, Clemons KV, Pais C. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates. J Clin Microbiol. 2010;48(5):1677-1682.

Sai S, Holland LM, McGee CF, Lynch DB, Butler G. Evolution of mating within the *Candida parapsilosis* species group. Eukaryot Cell. 2011;10(4):578-587.

Salavert LM, Jarque RI, Pemán GJ. Changing epidemiological aspects of candidemia and their clinical and therapeutic implications. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;24 Suppl 1:36-45.

Sampaio P, Gusmão L, Alves C, Pina-Vaz C, Amorim A, Pais C. Highly polymorphic microsatellite for identification of *Candida albicans* strains. J Clin Microbiol. 2003;41(2):552-557.

Sampaio P, Gusmão L, Correia A, Alves C, Rodrigues AG, Pina-Vaz C et al. New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strains typing reveals microevolutionary changes. J Clin Microbiol. 2005;43(8):3869-3876.

Sandven P, Bevanger L, Digranes A, Haukland HH, Mannsaker T, Gaustad P. Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. J Clin Microbiol. 2006;44(6):1977-1981.

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

Sendid B, Jouault T, Coudriau R, Camus D, Odds F, Tabouret M et al. Increased sensitivity of mannanaemia detection tests by joint detection α - and β -linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1):164-171.

Shemer R, Weissman Z, Hashman N, Kornitzer D. A highly polymorphic degenerate microsatellite for molecular strain typing of *Candida krusei*. *Microbiology*. 2001;147(Pt 8):2021-2028.

Shin JH, Park M-R, Song JW, Shin DH, Jung S-I, Cho D et al. Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. *J Clin Microbiol*. 2004;42(9):4025-4031.

Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rdrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol*. 2009;47(8):2392-2397.

Sivakumar VG, Shankar P, Nalina K, Menon T. Use of CHROMagar in the differentiation of common species of *Candida*. *Mycopathologia*. 2009;167(1):47-49.

Smith MB, Dunklee D, Vu H, Woods GL. Comparative performance of the RapID yeast plus system and the API 20C AUX clinical yeast system. *J Clin Microbiol*. 1999;37(8):2697-2698.

Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(2):332-370.

Song JW, Shin JH, Shint DH, Jung SI, Cho D, Kee SJ et al. Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Med Mycol*. 2005;43(7):657-661.

Stukenbrock EH, Christiansen FB, Hansen TT, Dutheil JY, Schierup MH. Fusion of two divergent fungal individuals led to the recent emergence of a unique widespread pathogen species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(2):10954-10959.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24(8):1596-1599.

Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):284-292.

Tavanti A, Hensgens LAM, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1455-1462.

Tay ST, Na SL, Chong J. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 2):185-1914.

Trabasso P, Matsuzawa T, Fagnani R, Muraosa Y, Tominga K, Resende MR et al. Isolation and drug susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato and other species of *C. parapsilosis* complex from patients with blood stream infections and proposal of a novel LAMP identification method for the species. *Mycopathologia*. 2014; DOI 10.1007/s11046-014-9830-9.

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

Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol*. 2007;45(6):1843-1850.

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

van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Pan fungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol*. 1998;36(5):1169-1175.

Vaz C, Sampaio P, Clemons KV, Huang Y-C, Stevens DA, Pais C. Microsatellite *multilocus* genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;71(2):159-162.

Vigouroux S, Morim O, Moreau P, Harousseau J-L, Milpied N. Candidemia in patients with hematologic malignancies: analysis of 7 years' experience in a single center. *Haematologica*. 2006;91(5):717-718.

Vitek[®] 2 Systems Product Information 069043-6EN1 [YST Product Information]. bioMérieux, França.

Viviani MA, Cogliati M, Esposto MC, Prigitano A, Tortorano M. Four-year persistence of a single *Candida albicans* genotype causing bloodstream infections in a surgical ward proven by *multilocus* sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2006;44(1):218-221.

Walsh TJ, Pappas P, Winston DJ, Lazarus HM, Petersen F, Raffalli J et al. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N Engl J Med*. 2002;346(4):225-234.

Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn J Med Mycol*. 2007;48(1):1-12.

Weising K, Atkinson RG, Gardner RC. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *Genome Res*. 1995;4(5):249-255.

Zancopé-Oliveira RM, James MJ, Derossi AP, Sampaio JLM, Muniz MM, Li RK et al. Strain characterization of *Candida parapsilosis* fungemia by molecular typing methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19(7):514-520.

Ziarrusta GB. Vulvogaginitis candidiásica. Rev Iberoam Micol. 2002;19(1):22-24.

APÊNDICES

APÊNDICE A1 – Dados dos pacientes, testes bioquímicos e métodos moleculares (ordenado pelo código da amostra).

Código da amostra	Isolado	Hospital	Origem	N.º do paciente	Sexo	Class. Etária	Data da coleta	Vitek 2 (%)	API (%)	Seq. D1/D2	PCRpee	PCR-RFLP	Microsatélites
001	23772	HSE	Sangue	5	F	Adulto	19/12/2002	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
002	23795	HSE	Sangue	5	F	Adulto	19/12/2002	97	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
003	24258	HSE	Sangue	27	M	Adulto	20/02/2003	95	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
004	24360	HSE	Sangue	35	M	Adulto	20/02/2003	96	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
005	24384	HSE	Sangue	36	M	Adulto	28/02/2003	98	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
006	24775	HSE	Sangue	12	M	Criança	14/04/2003	95	98,4	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
007	32485	HSE	Sangue	39	F	Adulto	29/09/2005	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
008	32504	HSE	Sangue	39	F	Adulto	29/09/2005	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
009	33286	HSE	Sangue	32	F	Adulto	01/02/2006	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
010	33499	HSE	Sangue	15	M	Criança	01/02/2006	99	97,1	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
011	33524	HSE	Sangue	15	M	Criança	01/02/2006	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
012	71663	HSE	Cateter	8	M	Adulto	11/09/2002	98	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
013	72102	HSE	Cateter	6	F	Adulto	06/11/2002	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
014	72737	HSE	Cateter	27	M	Adulto	20/02/2003	99	98,4	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
015	72834	HSE	Cateter	36	M	Adulto	28/02/2003	98	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
016	72836	HSE	Cateter	35	M	Adulto	28/02/2003	98	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
017	73234	HSE	Cateter	12	M	Criança	14/04/2003	95	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
018	75234	HSE	Cateter	17	M	Criança	02/01/2004	96	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
019	75525	HSE	Cateter	33	F	Adulto	27/02/2004	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
020	76542	HSE	Cateter	18	M	Criança	12/08/2004	97	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
021	76555	HSE	Cateter	20	F	Adulto	12/08/2004	98	99,8	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
022	76883	HSE	Cateter	41	F	Adulto	24/09/2004	98	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
023	78981	HSE	Cateter	14	M	Criança	28/07/2005	98	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
024	79130	HSE	Cateter	13	M	Criança	08/08/2005	98	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
025	79182	HSE	Cateter	19	M	Adulto	23/08/2004	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>

HSE, Hospital Servidores do Estado; SAM, Hospital Samaritano; HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto; ?, dado não recuperado; M, masculino; F, feminino; BD, baixa discriminação; Seq. D1/D2, sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA; PCRpee, PCR com os *primers* espécies-específicos; NA, não amplificado.

APÊNDICE A2 – Dados dos pacientes, testes bioquímicos e métodos moleculares (ordenado pelo código da amostra)
(continuação).

Código da amostra	Isolado	Hospital	Origem	N.º do paciente	Sexo	Class. Etária	Data da coleta	Vitek 2 (%)	API (%)	Seq. D1/D2	PCRpee	PCR-RFLP	Microsatélites
026	79431	HSE	Cateter	39	F	Adulto	29/09/2005	93	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
027	79769	HSE	Cateter	11	M	Criança	29/10/2005	93	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
028	ROM001	HSE	Sangue	40	F	Adulto	19/12/2002	97	99,9	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>	NA
029	2500096400	SAM	Sangue	21	M	Adulto	06/09/2005	96	97,1	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
030	2500100450	SAM	Sangue	42	M	Adulto	06/09/2005	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
031	2500100454	SAM	Cateter	42	M	Adulto	06/09/2005	95	97,8	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
032	25011112911	SAM	Sangue	30	F	Adulto	07/10/2005	98	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
033	69908	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	90	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
034	70114	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	02/09/1999	89	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
035	70158	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	94	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
036	70186	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	95	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
037	71228	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	94	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
038	72434	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	96	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
039	72728	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	23/09/1999	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
040	72820	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	23/09/1999	95	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
041	72864	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	02/09/1999	95	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
042	73172	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	23/09/1999	97	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
043	73204	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	02/09/1999	96	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
044	79074	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	02/09/1999	98	97,1	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
045	79188	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	96	99,1	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
046	79298 B	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	93	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
047	80550	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	95	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
048	80792	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	98	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
049	80828	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	94	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
050	80846	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	91	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>

HSE, Hospital Servidores do Estado; SAM, Hospital Samaritano; HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto; ?, dado não recuperado; M, masculino; F, feminino; BD, baixa discriminação; Seq. D1/D2, sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA; PCRpee, PCR com os *primers* espécies-específicos; NA, não amplificado.

APÊNDICE A3 – Dados dos pacientes, testes bioquímicos e métodos moleculares (ordenado pelo código da amostra)
(continuação).

Código da amostra	Isolado	Hospital	Origem	N.º do paciente	Sexo	Class. Etária	Data da coleta	Vitek 2 (%)	API (%)	Seq. D1/D2	PCRpee	PCR-RFLP	Microsatélites
051	80882	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	98	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
052	81480	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	86	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
053	22988	HSE	Sangue	43	M	Adulto	29/08/2002	96	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
054	23027	HSE	Sangue	27	M	Adulto	29/08/2002	96	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
055	23048	HSE	Sangue	27	M	Adulto	29/08/2002	97	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
056	23175	HSE	Sangue	16	M	Criança	29/08/2002	95	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
057	23637	HSE	Sangue	6	F	Adulto	28/10/2002	98	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
058	23657	HSE	Sangue	6	F	Adulto	06/11/2002	97	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
059	24213	HSE	Sangue	25	F	Adulto	03/02/2003	97	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
060	24323	HSE	Sangue	35	M	Adulto	20/02/2003	BD	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
061	24391	HSE	Sangue	29	M	Adulto	28/02/2003	98	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
062	24412	HSE	Sangue	35	M	Adulto	28/02/2003	BD	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
063	24853	HSE	Sangue	29	M	Adulto	12/05/2003	93	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
064	25381	HSE	Sangue	24	F	Adulto	17/06/2003	95	96,1	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>	NA
065	26451	HSE	Sangue	22	M	Adulto	10/11/2003	99	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
066	26514(1)	HSE	Sangue	31	F	Adulto	14/11/2003	98	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
067	26860	HSE	Sangue	17	M	Criança	26/12/2003	98	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
068	26860 R	HSE	Sangue	17	M	Criança	11/02/2004	BD	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
069	26874	HSE	Sangue	44	M	Adulto	29/12/2003	96	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
070	26882	HSE	Sangue	44	M	Adulto	30/12/2003	98	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
071	26906	HSE	Sangue	17	M	Criança	02/01/2004	BD	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
072	26981(1)	HSE	Sangue	1	M	Adulto	13/01/2003	95	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
073	26989	HSE	Sangue	44	M	Adulto	13/01/2004	96	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
074	26990(1)	HSE	Sangue	1	M	Adulto	13/01/2003	94	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
075	27246	HSE	Sangue	1	M	Adulto	09/02/2004	96	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA

HSE, Hospital Servidores do Estado; SAM, Hospital Samaritano; HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto; ?, dado não recuperado; M, masculino; F, feminino; BD, baixa discriminação; Seq. D1/D2, sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA; PCRpee, PCR com os *primers* espécies-específicos; NA, não amplificado.

APÊNDICE A4 – Dados dos pacientes, testes bioquímicos e métodos moleculares (ordenado pelo código da amostra)
(continuação).

Código da amostra	Isolado	Hospital	Origem	N.º do paciente	Sexo	Class. Etária	Data da coleta	Vitek 2 (%)	API (%)	Seq. D1/D2	PCRpee	PCR-RFLP	Microsatélites
076	27401	HSE	Sangue	33	F	Adulto	027/2/2004	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
077	27515	HSE	Sangue	10	M	Criança	09/03/2004	95	91,2	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
078	27956	HSE	Sangue	9	M	Criança	05/05/2004	93	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
079	27969	HSE	Sangue	9	M	Criança	06/05/2004	97	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
080	28118	HSE	Sangue	28	M	Adulto	20/05/2004	97	99,1	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
081	28241	HSE	Sangue	34	F	Adulto	02/06/2004	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
082	28243	HSE	Sangue	37	F	Adulto	03/06/2004	96	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
083	28287	HSE	Sangue	4	M	Adulto	09/06/2004	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
084	28352	HSE	Sangue	4	M	Adulto	01/07/2004	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
085	28684	HSE	Sangue	18	M	Criança	26/07/2004	99	96,1	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
086	28947	HSE	Sangue	?	?	Adulto	?*	89	98,5	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
087	29176	HSE	Sangue	23	M	Adulto	24/09/2004	98	99,1	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
088	29936	HSE	Sangue	3	F	Adulto	10/01/2005	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
089	29954(1)	HSE	Sangue	7	M	Adulto	10/01/2005	94	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
090	30842	HSE	Sangue	?	?	Adulto	?*	94	96,1	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
091	31949	HSE	Sangue	14	M	Criança	28/07/2005	98	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
092	32095(1)	HSE	Sangue	13	M	Criança	08/08/2005	99	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
093	32095(2)	HSE	Sangue	13	M	Criança	23/08/2005	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
094	32136	HSE	Sangue	19	M	Adulto	23/08/2005	99	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
095	32804	HSE	Sangue	2	F	Adulto	29/10/2005	99	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
096	32889	HSE	Sangue	11	M	Criança	21/11/2005	97	99,9	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
097	32988	HSE	Sangue	11	M	Criança	05/12/2005	98	99,1	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	NA
098	33044	HSE	Sangue	11	M	Criança	01/02/2006	95	99,1	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
099	34094	HSE	Sangue	26	F	Adulto	03/04/2006	97	99,9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
100	79738	HSE	Sangue	38	M	Adulto	29/10/2005	93	96,1	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>

HSE, Hospital Servidores do Estado; SAM, Hospital Samaritano; HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto; ?, dado não recuperado; M, masculino; F, feminino; BD, baixa discriminação; Seq. D1/D2, sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA; PCRpee, PCR com os *primers* espécies-específicos; NA, não amplificado; *, sem determinação de data mas pertencem ao período de estudo.

APÊNDICE B1 – Testes bioquímicos e sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA (ordenado pelo código da amostra).

Código da amostra	Isolado	Vitek 2			API 20 C AUX				Seq. D1/D2
		(%)	NC	Contradiz o Perfil Biológico Típico	(%)	NC	Bionúmero	Testes por Aproximação	
001	23772	99	EI	-	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
002	23795	97	EI	dGNTa	99,9	MBI	6742135	ADO, MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
003	24258	95	MBI	2KGAa, dGATa, GRTas	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
004	24360	96	EI	IMLTa, dXYLa	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
005	24384	98	EI	2KGa	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
006	24775	95	MBI	dXYLa, NAGa, IARAa	98,4	BI	2756135	GLY, TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
007	32485	99	EI	-	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
008	32504	99	EI	-	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
009	33286	99	EI	-	99,9	MBI	6742135	ADO, MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
010	33499	99	EI	-	97,1	BI	2752135	GLY, MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
011	33524	99	EI	-	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
012	71663	98	EI	IMLTa	99,9	MBI	6656135	2KG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
013	72102	99	EI	-	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
014	72737	99	EI	-	98,4	BI	2756135	GLY, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
015	72834	98	EI	IMLTa	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
016	72836	98	EI	IMLTa	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
017	73234	95	MBI	URE	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
018	75234	96	EI	2KGa, dXYLa	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
019	75525	99	EI	-	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
020	76542	97	EI	IMLTa	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
021	76555	98	EI	dGATa	99,8	BI	2656135	GLY, 2KG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
022	76883	98	EI	dXYLa	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
023	78981	98	EI	2KGa	99,9	MBI	6656135	2KG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
024	79130	98	EI	IMLTa	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
025	79182	99	EI	-	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>

NC, nível de confiança; BD, baixa discriminação; AI, aceitável identificação; BI, boa identificação; MBI, muito boa identificação; EI, excelente identificação; Seq. D1/D2, sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA. O significado das siglas dos substratos contidos no YST Card do Vitek 2 e nas cúpulas do API 20 C AUX encontram-se nos anexos 1 e 2 respectivamente.

APÊNDICE B2 – Testes bioquímicos e sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA (ordenado pelo código da amostra) (continuação).

Código da amostra	Isolado	Vitek 2			API 20 C AUX				Seq. D1/D2
		(%)	NC	Contradiz o Perfil Biológico Típico	(%)	NC	Bionúmero	Testes por Aproximação	
026	79431	98	EI	IMLTa	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
027	79769	93	MBI	IMLTa, DGATa, AGLU	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
028	ROM001	97	EI	dXYLa, IARAA	99,9	MBI	6746135	ADO, TRE	<i>C. metapsilosis</i>
029	2500096400	96	EI	dGATa, GLYLa	97,1	BI	2752135	GLY, MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
030	2500100450	99	EI	-	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
031	2500100454	95	MBI	dXYLa, GLYLa, IARAA	97,8	BI	2742135	GLY, ADO, MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
032	25011112911	98	EI	dGATa	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
033	69908	90	BI	2KGa, IMLTa, dXYLa, AGLU, IARAA	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
034	70114	89	BI	2KGa, dXYLa, dGATa, AGLU, GRTas, IARAA	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
035	70158	94	MBI	dXYLa, dGATa, GLYLa, GRTas	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
036	70186	95	MBI	2KGa, dXYLa, IARAA	99,9	MBI	6656135	2KG, TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
037	71228	94	MBI	dXYLa, AGLU	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
038	72434	96	EI	IMLTa, dGATa	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
039	72728	99	EI	-	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
040	72820	95	MBI	dXYLa, NAGa, IARAA	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
041	72864	95	MBI	dXYLa, XLTa, NAGa	99,9	MBI	6742135	ADO, MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
042	73172	97	EI	IMLTa, dXYLa	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
043	73204	96	EI	IMLTa, dXYLa	98,9	BI	6762135	ADO, XLT, MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
044	79074	98	EI	IMLTa	97,1	BI	2752135	GLY, MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
045	79188	96	EI	dXYLa, IARAA	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
046	79298 B	93	MBI	dXYLa, AGLU, IARAA	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
047	80550	95	MBI	dXYLa, NAGa, IARAA	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
048	80792	98	EI	IMLTa	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
049	80828	94	MBI	IMLTa, AGLU	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
050	80846	91	BI	IMLTa, dXYLa, AGLU, IARAA	99,9	BI	6750135	SOR, MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>

NC, nível de confiança; BD, baixa discriminação; AI, aceitável identificação; BI, boa identificação; MBI, muito boa identificação; EI, excelente identificação; Seq. D1/D2, sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA. O significado das siglas dos substratos contidos no YST Card do Vitek 2 e nas cúpulas do API 20 C AUX encontram-se nos anexos 1 e 2 respectivamente.

APÊNDICE B3 – Testes bioquímicos e sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA (ordenado pelo código da amostra) (continuação).

Código da amostra	Isolado	Vitek 2			API 20 C AUX				Seq. D1/D2
		(%)	NC	Contradiz o Perfil Biológico Típico	(%)	NC	Bionúmero	Testes por Aproximação	
051	80882	98	EI	IMLTa	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
052	81480	86	AI	dXYLa, dMNEa, AGLU, GLYLa, GRTas, IARAA	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
053	22988	96	EI	IMLTa, dXYLa	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
054	23027	96	EI	2KGa, dXYLa	99,9	EI	6656175	2KG	<i>C. parapsilosis</i>
055	23048	97	EI	2KGa, dXYLa	99,9	EI	6656175	2KG	<i>C. parapsilosis</i>
056	23175	91	BI	IMLTa, dXYLa, NAGa, AGLU, GRTas	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
057	23637	98	EI	GRTas	99,9	EI	6756175	-	<i>C. parapsilosis</i>
058	23657	97	EI	dGNTa	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
059	24213	97	EI	dXYLa, IARAA	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
060	24323	-	BD	<i>C. parapsilosis, C. famata</i>	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
061	24391	98	EI	dXYLa	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
062	24412	-	BD	<i>C. parapsilosis, C. famata</i>	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
063	24853	93	MBI	AMYa, IARAA	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
064	25381	95	MBI	dXYLa, GRTas, IARAA	97,6	BI	6746131	ADO, TRE, HYPH	<i>C. metapsilosis</i>
065	26451	99	EI	-	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
066	26514(1)	98	EI	2KGa	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
067	26860	98	EI	IMLTa	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
068	26860 R	-	BD	<i>C. parapsilosis, C. famata</i>	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
069	26874	96	EI	2KGa, dXYLa	99,9	MBI	6656135	2KG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
070	26882	98	EI	2KGa	99,9	MBI	6656135	2KG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
071	26906	-	BD	<i>C. parapsilosis, C. famata</i>	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
072	26981(1)	95	MBI	2KGa, dXYLa, IARAA	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
073	26989	96	EI	2KGa, dXYLa	99,9	MBI	6656135	2KG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
074	26990(1)	94	MBI	dXYLa, AGLU	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
075	27246	96	EI	IMLTa, dXYLa	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>

NC, nível de confiança; BD, baixa discriminação; AI, aceitável identificação; BI, boa identificação; MBI, muito boa identificação; EI, excelente identificação; Seq. D1/D2, sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA. O significado das siglas dos substratos contidos no YST Card do Vitek 2 e nas cúpulas do API 20 C AUX encontram-se nos anexos 1 e 2 respectivamente.

APÊNDICE B4 – Testes bioquímicos e sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA (ordenado pelo código da amostra) (continuação).

Código da amostra	Isolado	Vitek 2			API 20 C AUX				Seq. D1/D2
		(%)	NC	Contradiz o Perfil Biológico Típico	(%)	NC	Bionúmero	Testes por Aproximação	
076	27401	99	EI	-	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
077	27515	95	MBI	IMLTa, dXYLa, IARAa	91,2	BI	6146135	ARA, XYL, ADO, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
078	27956	93	MBI	dXYLa, AGLU, IARAa	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
079	27969	97	EI	dXYLa	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
080	28118	97	EI	2KGa, dGATa	99,1	BI	6656131	2KG, TRE, HYPH	<i>C. parapsilosis</i>
081	28241	99	EI	-	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
082	28243	96	EI	dGATa, GRTas	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
083	28287	99	EI	-	99,9	MBI	6752135	MDG, TRE	<i>C. parapsilosis</i>
084	28352	99	EI	-	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
085	28684	99	EI	-	96,1	BI	6756131	TRE, HYPH	<i>C. parapsilosis</i>
086	28947	89	BI	2KGaA, CITA, dXYLa, AGLU, GRTas, IARAa	98,5	BI	6676175	2KG, XLT	<i>C. orthopsilosis</i>
087	29176	98	EI	2KGa	99,1	BI	6656131	2KG, TRE, HYPH	<i>C. orthopsilosis</i>
088	29936	99	EI	-	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
089	29954(1)	94	MBI	dXYLa, URE	99,9	EI	6756175	-	<i>C. orthopsilosis</i>
090	30842	94	MBI	dGATa, AGLU	96,1	BI	6756131	TRE, HYPH	<i>C. orthopsilosis</i>
091	31949	98	EI	2KGa	99,9	MBI	6656135	2KG, TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
092	32095(1)	99	EI	-	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
093	32095(2)	99	EI	-	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
094	32136	99	EI	-	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
095	32804	99	EI	-	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
096	32889	97	EI	2KGa, GRTas	99,9	MBI	6656135	2KG, TRE	<i>C. orthopsilosis</i>
097	32988	98	EI	2KGa	99,1	BI	6656131	2KG, TRE, HYPH	<i>C. orthopsilosis</i>
098	33044	95	MBI	2KGaA, dGATa, GRTas	99,1	BI	6656131	2KG, TRE, HYPH	<i>C. parapsilosis</i>
099	34094	97	EI	dXYLa	99,9	EI	6756135	TRE	<i>C. parapsilosis</i>
100	79738	93	MBI	dGATa, AGLU	96,1	BI	6756131	TRE, HYPH	<i>C. parapsilosis</i>

NC, nível de confiança; BD, baixa discriminação; AI, aceitável identificação; BI, boa identificação; MBI, muito boa identificação; EI, excelente identificação; Seq. D1/D2, sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA. O significado das siglas dos substratos contidos no YST Card do Vitek 2 e nas cúpulas do API 20 C AUX encontram-se nos anexos 1 e 2 respectivamente.

APÊNDICE C1 – Dados dos pacientes, sequenciamento e microsátélites (ordenado pelo n.º do paciente).

Código da amostra	Isolado	Hospital	Origem	N.º do paciente	Sexo	Class. Etária	Data da coleta	Sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA	Número de acesso GenBank	Microsátélites (pb)				Código MG
										CP1	CP4a	CP6	B	
										al-1:al-2	al-1:al-2	al-1:al-2	al-1:al-2	
072	26981(1)	HSE	Sangue	1	M	Adulto	13/01/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817137	NA	NA	NA	NA	-
074	26990(1)	HSE	Sangue	1	M	Adulto	13/01/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817139	NA	NA	NA	NA	-
075	27246	HSE	Sangue	1	M	Adulto	9/2/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817140	NA	NA	NA	NA	-
095	32804	HSE	Sangue	2	F	Adulto	29/10/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817160	219:261	251:251	252:288	147:149	MG-6
088	29936	HSE	Sangue	3	F	Adulto	10/01/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817153	237:243	299:299	297:327	129:129	MG-9
083	28287	HSE	Sangue	4	M	Adulto	09/06/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817148	240:243	000:000	273:303	127:139	MG-16
084	28352	HSE	Sangue	4	M	Adulto	01/07/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817149	240:243	000:000	273:303	127:139	MG-16
001	23772	HSE	Sangue	5	F	Adulto	19/12/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817066	189:240	236:236	315:315	165:167	MG-1
002	23795	HSE	Sangue	5	F	Adulto	19/12/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817067	189:240	236:236	315:315	165:167	MG-1
013	72102	HSE	Cateter	6	F	Adulto	06/11/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817078	189:240	236:236	315:315	165:167	MG-1
057	23637	HSE	Sangue	6	F	Adulto	28/10/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817122	189:240	236:236	315:315	165:167	MG-1
058	23657	HSE	Sangue	6	F	Adulto	06/11/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817123	189:240	236:236	315:315	165:167	MG-1
089	29954(1)	HSE	Sangue	7	M	Adulto	10/01/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817154	NA	NA	NA	NA	-
012	71663	HSE	Cateter	8	M	Adulto	11/09/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817077	240:240	239:239	294:294	121:121	MG-12
078	27956	HSE	Sangue	9	M	Criança	05/05/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817143	NA	NA	NA	NA	-
079	27969	HSE	Sangue	9	M	Criança	06/05/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817144	NA	NA	NA	NA	-
077	27515	HSE	Sangue	10	M	Criança	09/03/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817142	243:243	236:236	300:300	111:111	MG-28
027	79769	HSE	Cateter	11	M	Criança	29/10/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817092	243:261	242:242	354:360	129:129	MG-37
096	32889	HSE	Sangue	11	M	Criança	21/11/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817161	NA	NA	NA	NA	-
097	32988	HSE	Sangue	11	M	Criança	05/12/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817162	NA	NA	NA	NA	-
098	33044	HSE	Sangue	11	M	Criança	01/02/2006	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817163	240:240	236:236	264:267	145:145	MG-10
006	24775	HSE	Sangue	12	M	Criança	14/04/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817071	NA	NA	NA	NA	-
017	73234	HSE	Cateter	12	M	Criança	14/04/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817082	NA	NA	NA	NA	-
024	79130	HSE	Cateter	13	M	Criança	08/08/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817089	243:246	299:302	285:291	127:129	MG-35
092	32095(1)	HSE	Sangue	13	M	Criança	08/08/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817157	NA	NA	NA	NA	-

HSE, Hospital Servidores do Estado; SAM, Hospital Samaritano; HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto; ?, dano não recuperado; M, masculino; F, feminino; pb, pares de bases; al-1, alelo 1; al-2, alelo 2; MG, código do genótipo em *multilocus*; NA, não amplificado.

APÊNDICE C2 – Dados dos pacientes, sequenciamento e microsátélites (ordenado pelo n.º do paciente) (continuação).

Código da amostra	Isolado	Hospital	Origem	N.º do paciente	Sexo	Class. Etária	Data da coleta	Sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA	Número de acesso GenBank	Microsátélites (pb)				Código MG
										CP1	CP4a	CP6	B	
										al-1:al-2	al-1:al-2	al-1:al-2	al-1:al-2	
093	32095(2)	HSE	Sangue	13	M	Criança	23/08/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817158	243:246	299:302	285:291	127:129	MG-35
023	78981	HSE	Cateter	14	M	Criança	28/07/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817088	240:240	236:236	264:267	145:145	MG-10
091	31949	HSE	Sangue	14	M	Criança	28/07/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817156	NA	NA	NA	NA	-
010	33499	HSE	Sangue	15	M	Criança	01/02/2006	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817075	240:243	332:341	270:303	127:139	MG-23
011	33524	HSE	Sangue	15	M	Criança	01/02/2006	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817076	240:243	332:341	270:303	127:139	MG-23
056	23175	HSE	Sangue	16	M	Criança	29/08/2002	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817121	NA	NA	NA	NA	-
018	75234	HSE	Cateter	17	M	Criança	02/01/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817083	NA	NA	NA	NA	-
067	26860	HSE	Sangue	17	M	Criança	26/12/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817132	NA	NA	NA	NA	-
068	26860 R	HSE	Sangue	17	M	Criança	11/02/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817133	NA	NA	NA	NA	-
071	26906	HSE	Sangue	17	M	Criança	02/01/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817136	NA	NA	NA	NA	-
020	76542	HSE	Cateter	18	M	Criança	12/08/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817085	243:243	236:236	291:294	131:131	MG-27
085	28684	HSE	Sangue	18	M	Criança	26/07/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817150	243:243	236:236	291:294	131:131	MG-27
025	79182	HSE	Cateter	19	M	Adulto	23/08/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817090	240:243	332:341	270:303	127:139	MG-23
094	32136	HSE	Sangue	19	M	Adulto	23/08/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817159	NA	NA	NA	NA	-
021	76555	HSE	Cateter	20	F	Adulto	12/08/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817086	207:240	239:239	312:312	129:131	MG-4
029	2500096400	SAM	Sangue	21	M	Adulto	06/09/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817094	207:240	236:236	282:282	131:133	MG-3
065	26451	HSE	Sangue	22	M	Adulto	10/11/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817130	NA	NA	NA	NA	-
087	29176	HSE	Sangue	23	M	Adulto	24/09/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817152	NA	NA	NA	NA	-
064	25381	HSE	Sangue	24	F	Adulto	17/06/2003	<i>C. metapsilosis</i>	KJ817129	NA	NA	NA	NA	-
059	24213	HSE	Sangue	25	F	Adulto	03/02/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817124	NA	NA	NA	NA	-
099	34094	HSE	Sangue	26	F	Adulto	03/04/2006	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817164	243:243	296:296	264:324	129:157	MG-31
003	24258	HSE	Sangue	27	M	Adulto	20/02/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817068	243:243	299:299	264:342	129:157	MG-32
014	72737	HSE	Cateter	27	M	Adulto	20/02/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817079	243:243	299:299	264:342	129:157	MG-32
054	23027	HSE	Sangue	27	M	Adulto	29/08/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817119	240:240	272:272	273:273	103:103	MG-14
055	23048	HSE	Sangue	27	M	Adulto	29/08/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817120	240:240	272:272	273:273	103:103	MG-14

HSE, Hospital Servidores do Estado; SAM, Hospital Samaritano; HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto; ?, dano não recuperado; M, masculino; F, feminino; pb, pares de bases; al-1, alelo 1; al-2, alelo 2; MG, código do genótipo em *multilocus*; NA, não amplificado.

APÊNDICE C3 – Dados dos pacientes, sequenciamento e microsátélites (ordenado pelo n.º do paciente) (continuação).

Código da amostra	Isolado	Hospital	Origem	N.º do paciente	Sexo	Class. Etária	Data da coleta	Sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA	Número de acesso GenBank	Microsátélites (pb)				Código MG
										CP1	CP4a	CP6	B	
										al-1:al-2	al-1:al-2	al-1:al-2	al-1:al-2	
080	28118	HSE	Sangue	28	M	Adulto	20/05/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817145	240:243	000:000	267:270	143:145	MG-15
061	24391	HSE	Sangue	29	M	Adulto	28/02/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817126	240:243	269:302	270:303	127:127	MG-20
063	24853	HSE	Sangue	29	M	Adulto	12/05/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817128	243:243	236:236	273:291	131:131	MG-26
032	25011112911	SAM	Sangue	30	F	Adulto	07/10/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817097	207:240	236:236	276:282	131:133	MG-2
066	26514(1)	HSE	Sangue	31	F	Adulto	14/11/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817131	NA	NA	NA	NA	-
009	33286	HSE	Sangue	32	F	Adulto	01/02/2006	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817074	240:243	332:332	270:303	127:139	MG-22
019	75525	HSE	Cateter	33	F	Adulto	27/02/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817084	240:240	239:239	279:312	109:109	MG-11
076	27401	HSE	Sangue	33	F	Adulto	27/02/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817141	240:240	239:239	294:312	109:109	MG-13
081	28241	HSE	Sangue	34	F	Adulto	02/06/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817146	243:243	290:290	291:291	131:131	MG-30
004	24360	HSE	Sangue	35	M	Adulto	20/02/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817069	NA	NA	NA	NA	-
016	72836	HSE	Cateter	35	M	Adulto	28/02/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817081	NA	NA	NA	NA	-
060	24323	HSE	Sangue	35	M	Adulto	20/02/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817125	NA	NA	NA	NA	-
062	24412	HSE	Sangue	35	M	Adulto	28/02/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817127	NA	NA	NA	NA	-
005	24384	HSE	Sangue	36	M	Adulto	28/02/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817070	243:243	365:365	210:306	129:129	MG-34
015	72834	HSE	Cateter	36	M	Adulto	28/02/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817080	243:243	365:365	210:306	129:129	MG-34
082	28243	HSE	Sangue	37	F	Adulto	03/06/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817147	264:264	236:236	273:273	143:143	MG-39
100	79738	HSE	Sangue	38	M	Adulto	29/10/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817165	207:240	281:311	282:312	133:133	MG-5
007	32485	HSE	Sangue	39	F	Adulto	29/09/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817072	234:243	287:296	297:297	131:131	MG-8
008	32504	HSE	Sangue	39	F	Adulto	29/09/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817073	234:243	287:296	297:297	131:131	MG-8
026	79431	HSE	Cateter	39	F	Adulto	29/09/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817091	234:243	287:290	297:297	131:131	MG-7
028	ROM001	HSE	Sangue	40	F	Adulto	19/12/2002	<i>C. metapsilosis</i>	KJ817093	NA	NA	NA	NA	-
022	76883	HSE	Cateter	41	F	Adulto	24/09/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817087	240:243	341:341	270:303	127:139	MG-24
030	2500100450	SAM	Sangue	42	M	Adulto	06/09/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817095	240:243	329:329	270:303	127:139	MG-21
031	2500100454	SAM	Cateter	42	M	Adulto	06/09/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817096	240:243	332:332	270:303	127:139	MG-22
053	22988	HSE	Sangue	43	M	Adulto	29/08/2002	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817118	NA	NA	NA	NA	-

HSE, Hospital Servidores do Estado; SAM, Hospital Samaritano; HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto; ?, dano não recuperado; M, masculino; F, feminino; pb, pares de bases; al-1, alelo 1; al-2, alelo 2; MG, código do genótipo em *multilocus*; NA, não amplificado.

APÊNDICE C4 – Dados dos pacientes, sequenciamento e microsátélites (ordenado pelo n.º do paciente) (continuação).

Código da amostra	Isolado	Hospital	Origem	N.º do paciente	Sexo	Class. Etária	Data da coleta	Sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S do rDNA	Número de acesso GenBank	Microsátélites (pb)				Código MG
										CP1	CP4a	CP6	B	
										al-1:al-2	al-1:al-2	al-1:al-2	al-1:al-2	
069	26874	HSE	Sangue	44	M	Adulto	29/12/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817134	243:243	251:251	252:252	145:161	MG-29
070	26882	HSE	Sangue	44	M	Adulto	30/12/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817135	243:243	251:251	252:252	145:161	MG-29
073	26989	HSE	Sangue	44	M	Adulto	13/01/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817138	243:243	251:251	252:252	145:161	MG-29
086	28947	HSE	Sangue	?	?	Adulto	??*	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817151	NA	NA	NA	NA	-
090	30842	HSE	Sangue	?	?	Adulto	??*	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817155	NA	NA	NA	NA	-
033	69908	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817098	NA	NA	NA	NA	-
034	70114	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	02/09/1999	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817099	NA	NA	NA	NA	-
035	70158	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817100	246:246	299:299	243:303	129:147	MG-38
036	70186	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817101	NA	NA	NA	NA	-
037	71228	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817102	NA	NA	NA	NA	-
038	72434	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817103	240:243	245:272	273:273	133:133	MG-19
039	72728	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	23/09/1999	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817104	240:243	233:233	255:255	127:127	MG-17
040	72820	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	23/09/1999	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817105	240:243	233:254	255:255	127:127	MG-18
041	72864	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	02/09/1999	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817106	240:243	233:254	255:255	127:127	MG-18
042	73172	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	23/09/1999	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817107	243:249	299:302	288:303	105:127	MG-36
043	73204	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	02/09/1999	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817108	243:249	299:302	288:303	105:127	MG-36
044	79074	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	02/09/1999	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817109	243:243	329:329	285:306	129:129	MG-33
045	79188	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817110	NA	NA	NA	NA	-
046	79298 B	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817111	NA	NA	NA	NA	-
047	80550	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817112	NA	NA	NA	NA	-
048	80792	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817113	243:243	212:236	303:303	111:111	MG-25
049	80828	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817114	243:243	212:236	303:303	111:111	MG-25
050	80846	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817115	243:243	212:236	303:303	111:111	MG-25
051	80882	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817116	243:243	212:236	303:303	111:111	MG-25
052	81480	HUPE	Sangue	?	?	Adulto	??/??/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817117	NA	NA	NA	NA	-



HSE, Hospital Servidores do Estado; SAM, Hospital Samaritano; HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto; ?, dano não recuperado; M, masculino; F, feminino; pb, pares de bases; al-1, alelo 1; al-2, alelo 2; MG, código do genótipo em *multilocus*; NA, não amplificado; *, sem determinação de data mas pertencem ao período de estudo.

ANEXOS

ANEXO A – Composição das galerias API[®] 20 C AUX e ficha de resultados.

Testes	Substratos	Quantidade mg/cúpula
0	Nenhum	-
GLU	D-GLUcose	1,2
GLY	GLIcerol	1,2
2KG	cálcio 2-ceto-Gluconato	1,2
ARA	L-ARAbinose	1,2
XYL	D-XILose	1,2
ADO	ADOnitol	1,2
XLT	XiLiTol	1,2
GAL	D-GALactose	1,9
INO	INOsitol	2,36
SOR	D-SORbitol	1,2
MDG	Metil- α D-Glucopiranosido	1,2
NAG	N-Acetil-Glucosamina	1,2
CEL	D-CELObiose	1,2
LAC	D-LACtose (origem bovina)	1,2
MAL	D-MALtose	1,2
SAC	D-SACarose	1,2
TRE	D-TREalose	1,2
MLZ	D-MeLeZitose	1,2
RAF	D-RAFinose	1,9

O teste morfológico HYPH determina a presença de hifas e pseudohifas com o meio RAT (*Ritz Agar Tween*). Este teste constitui o 21.º teste da galeria e é considerado positivo quando evidencia a hifa ou pseudohifa. Fonte: API[®] 20 C AUX, bioMérieux, França.

		CE 07221 C	REF. :	_____ / _____ / _____																		
			Origine / Source / Herkunft / Origen / Origem / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :																			
																						
48 h	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>														
72 h	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>															
	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	Hyphae/ Pseudo- Hyphae	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :																				Ident. / Ταυτοποίηση :		

Fonte: API[®] 20 C AUX, bioMérieux, França.

ANEXO B – Conteúdo dos poços do YST Card para o Vitek® 2.

Mnemônico	Poço	Teste	Quantidade
2KGa	62	Assimilação 2-CETO-D-GLUCONATO	0.15 mg
ACEa	58	Assimilação de ACETATO	0.15 mg
AGLU	46	ALFA-GLUCOSIDASE	0.036 mg
AMYa	18	Assimilação de AMIGDALINA	0.3 mg
ARBa	15	Assimilação de ARBUTINA	0.3 mg
ARG	7	ARGININA GP	0.15 mg
BNAG	14	BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASE	0.0408 mg
CITa	59	Assimilação de CITRATO (SÓDIO)	0.15 mg
dCELa	26	Assimilação de D-CELLOBIOSE	0.3 mg
dGALa	19	Assimilação de D-GALACTOSE	0.3 mg
dGATa	52	Assimilação de D-GALACTURONATO	0.15 mg
dGLUa	21	Assimilação de D-GLUCOSE	0.3 mg
dGNTa	64	Assimilação de D-GLUCONATO	0.15 mg
dMALa	28	Assimilação de D-MALTOSE	0.3 mg
dMELa	33	Assimilação de D-MELIBIOSE	0.3 mg
dMLZa	34	Assimilação de D-MELEZITOSE	0.3 mg
dMNEa	32	Assimilação de D-MANOSE	0.3 mg
dRAFa	29	Assimilação de D-RAFINOSE	0.3 mg
dSORa	42	Assimilação de D-SORBITOL	0.1875 mg
dTREa	48	Assimilação de D-TREALOSE	0.3 mg
dTURa	47	Assimilação de D-TURANOSE	0.3 mg
dXYLa	55	Assimilação de D-XILOSE	0.3 mg
ERYa	10	Assimilação de ERITRITOL	0.3 mg
ESC	53	Hidrolise da ESCULINA	0.225 mg
GENa	20	Assimilação de GENTIOBIOSE	0.3 mg
GGT	27	GAMA-GLUTAMIL-TRANSFERASE	0.0228 mg
GLYLa	12	Assimilação de GLICEROL	0,16 µL
GRTas	60	Assimilação de GLUCURONATO	0.15 mg
LACa	23	Assimilação de LACTOSE	0.96 mg
IARAA	51	Assimilação de L-ARABINOSE	0.3 mg
LATa	56	Assimilação de DL-LACTATO	0.15 mg
LeuA	5	Leucina-ARILAMIDASE	0.0234 mg
IGLTa	54	Assimilação de L-GLUTAMATO	0.15 mg
IMLTa	4	Assimilação de L-MALATO	0.15 mg
IPROa	61	Assimilação de L-PROLINA	0.15 mg
IRHAA	39	Assimilação de L-RAMNOSE	0.3 mg
ISBEa	38	Assimilação de L-SORBOSE	0.3 mg
LysA	3	L-Lisina-ARILAMIDASE	0.0228 mg
MAdGa	24	Assimilação de METIL-A-D-GLUCOPIRANOSÍDEO	0.3 mg
NAGa	63	Assimilação de N-ACETIL-GLUCOSAMINA	0.15 mg
NAGA1	30	PNP-N-acetil-BD-galactosaminidase 1	0.0306 mg
NO3a	49	Assimilação de NITRATO	0.03 mg
SACa	44	Assimilação de SACAROSE/SUCROSE	0.3 mg
TyrA	13	Tirosina ARILAMIDASE	0.0276 mg
URE	45	UREASE	0.15 mg
XLTa	40	Assimilação de XILITOL	0.3 mg

Fonte: VITEK 2 Systems, bioMérieux, França.

ANEXO C – Interpretação dos valores de Kappa.

Valor de Kappa	Interpretação
< 0	Ausência de concordância
0 – 0,19	Concordância fraca
0,20 – 0,39	Concordância razoável
0,40 – 0,59	Concordância moderada
0,60 – 0,79	Concordância substancial
0,80 – 1,00	Concordância quase perfeita

Fonte: Adaptado de Landis e Koch (1977).

ANEXO D – Produção científica no período de doutorado (autoria e coautoria).

Abi-chacra EA, Souza LOP, Cruz LP, Braga-Silva LA, Gonçalves DS, Sodré CL, Ribeiro MD, Seabra SH, Figueiredo-Carvalho MHG, Barbedo LS, Zancopé-Oliveira RM, Ziccardi M, Santos ALS. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. FEMS Yeast Res. 2013;13(8):831-848.

Figueiredo-Carvalho MHG, Barbedo LS, Oliveira MME, Brito-Santos F, Almeida-Paes R, Zancopé-Oliveira RM. Comparison of commercial methods na the CLSI broth microdilution to determine the antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* complex bloodstream isolates from three health institutions in Rio de Janeiro, Brazil. Mycopathologia. 2014;178(1-2):27-35.

Ramos LS, Barbedo LS, Braga-Silva LA, Santos ALS, Pinto MR, Sgarbi DBG. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. Rev Iberoam Micol. 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2014.01.003>.

Ramos LS, Figueiredo-Carvalho MHG, Barbedo LS, Ziccardi M, Chaves ALS, Zancopé-Oliveira RM, Pinto MR, Sgarbi DBG, Dornelas-Ribeiro M, Branquinha MH, Santos ALS. *Candida haemulonii* complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. J Antimicrob Chemother. 2015; 70(1):111-115.

Barbedo LS, Vaz C, Pais C, Figueiredo-Carvalho MHG, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM, Sampaio P. Different scenarios for *Candida parapsilosis* fungaemia reveal high numbers of mixed *C. parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* infections. J Med Microbiol. 2015; 64(1):7-17.

Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex

Érika A. Abi-chacra¹, Lucieri O.P. Souza¹, Lucas P. Cruz¹, Lys A. Braga-Silva^{1,2}, Diego S. Gonçalves^{1,2}, Cátia L. Sodr e^{1,3}, Marcos D. Ribeiro⁴, Sergio H. Seabra⁵, Maria H.G. Figueiredo-Carvalho⁶, Leonardo S. Barbedo⁶, Rosely M. Zancop e-Oliveira⁶, Mariangela Ziccardi^{1,7} & Andr e L.S. Santos^{1,2}

¹Laborat rio de Investiga o de Peptidases (LIP), Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil; ²Programa de Pós-Gradua o em Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil; ³Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Brazil; ⁴Laborat rio de Bacteriologia/Micologia, Instituto de Biologia do Exército (IBEx), Rio de Janeiro, Brazil; ⁵Laborat rio de Tecnologia em Cultura de Células, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Duque de Caxias, Brazil; ⁶Laborat rio de Micologia, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Funda o Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil; and ⁷Laborat rio Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, Funda o Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence: Andr e L.S. Santos, Laboratório de Investiga o de Peptidases (LIP), Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Bloco E-subsolo, sala 05, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil.
Tel.: +55 21 25626740;
fax: +55 21 25608344;
e-mail: andre@micro.ufrj.br

Received 17 June 2013; revised 22 August 2013; accepted 7 September 2013.
Final version published online 25 October 2013.

DOI: 10.1111/1567-1364.12092

Editor: Richard Calderone

Keywords

Candida parapsilosis complex; hydrolytic enzymes; interaction process; morphogenesis; surface glycoconjugates; surface hydrophobicity.

Introduction

Candida parapsilosis can be isolated from domestic animals, insects, soil and marine environments (Trofa *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012). Moreover, *C. parapsilosis* is a commensal yeast from human that frequently colonizes the skin; however, it can become pathogenic if changes occur in the host defense mechanisms or if any interference breaks up the anatomical barriers of the skin like burn or

Abstract

The production of virulence attributes in three reference strains and 11 clinical isolates primarily identified as *Candida parapsilosis* was evaluated. Morphological and phenotypical tests were not able to discriminate among the three species of the *C. parapsilosis* complex; consequently, molecular methods were applied to solve this task. After employing polymerase chain reaction-based methods, nine clinical strains were identified as *C. parapsilosis sensu stricto* and two as *C. orthopsilosis*. Protease, catalase, and hemolysin were produced by all 14 strains, while 92.9% and 78.6% of strains secreted, respectively, esterase and phytase. No phospholipase producers were detected. Mannose/glucose, *N*-acetylglucosamine, and sialic acid residues were detected at the surface of all strains, respectively, in high, medium, and low levels. All strains presented elevated surface hydrophobicity and similar ability to form biofilm. However, the adhesion to inert substrates and mammalian cells was extremely diverse, showing typical intrastrain variations. Overall, the strains showed (1) predilection to adhere to plastic over glass and the number of pseudohyphae was more prominent than yeasts and (2) the interaction process was slightly enhanced in macrophages than fibroblasts, with the majority of fungal cells detected inside them. Positive/negative correlations were demonstrated among the production of these virulence traits in *C. parapsilosis* complex.

usage of invasive devices (Almirante *et al.*, 2006; Trofa *et al.*, 2008; Nosek *et al.*, 2009; van Asbeck *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012). In the clinical arena, *C. parapsilosis* is an important pathogen of fungemia, particularly among infants and immunocompromised patients hospitalized in intensive care units, causing different clinical manifestations as endocarditis, meningitis, peritonitis, arthritis, eye infections, otomycosis, onychomycosis, vulvovaginitis, and urinary tract infections (Trofa *et al.*, 2008). In some

regions/countries, *C. parapsilosis* is the second most frequent *Candida* species, reaching 20.5% of cases in Latin America (Nucci et al., 2010) and 21.2% in the United Kingdom (Das et al., 2011).

Based on genetic analysis, it was found that *C. parapsilosis* forms a complex composed of three genetically distinct species, namely *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*, which are physiologically and morphologically indistinguishable (Tavanti et al., 2005). It is noteworthy that *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* also have clinical importance as nosocomial pathogens of fungemia, because they are also responsible for several infections around the world (Lockhart et al., 2008). Although the incidence of fungi belonging to the complex *C. parapsilosis* has increased in recent decades, little is known about the virulence factors involved in the colonization, adhesion, invasion, dissemination and escape from host defenses. Similarly, there is a large gap in the current knowledge of the pathogenesis of *C. parapsilosis* infections. Among the virulence factors proposed in the literature for *Candida* spp., adherence to host cells and/or tissues as well as to inert supports, morphological changes and secretion of a large array of hydrolytic enzymes are included (Ghannoum, 2000; Haynes, 2001; Hube & Naglik, 2001; Braga-Silva & Santos, 2011; Singh & Mukhopadhyay, 2012).

The aim of the present study was to evaluate the production of virulence attributes in three type strains and 11 clinical isolates belonging to the *C. parapsilosis* complex.

Materials and methods

Microorganisms and growth conditions

Candida metapsilosis (ATCC 96143), *Candida orthopsilosis* (ATCC 96141), and *Candida parapsilosis sensu stricto* (ATCC 22019) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville; Table 1). The 11 clinical isolates were kindly provided by Dr Marcos Dornelas Ribeiro (Table 1; Instituto de Biologia do Exército, IBEx, Rio de Janeiro, Brazil). Fungal cells were cultured into 1.2% yeast carbon base (YCB) medium (HiMedia Laboratories Ltd, India) supplemented with 0.1% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, New York, NY), pH 4.0, at 37 °C for 48 h (Hrusková-Heidingsfeldová et al., 2009). Growth was estimated by counting the fungal cells in a Neubauer chamber.

Morphological parameters

Flow cytometry

Fungal cells were processed for flow cytometry to measure two morphological parameters: cellular size and granularity. Briefly, cells (10^6) were harvested by centrifugation at 4000 g for 10 min at 4 °C, washed in cold phosphate-buffered saline (PBS; 150 mM NaCl, 20 mM phosphate buffer, pH 7.2), and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS at 4 °C for 30 min. Then, fungal cells were

Table 1. Biochemical and morphological characteristics of the *Candida parapsilosis* complex included in this study

Code	Sample	Colony color on CHROMagar	Biochemical identification (VITEK® 2 system)			Morphological and growth pattern		
			Identification	Probability (confidence)	Contraindicating typical biopattern	Number of cells × 10 ⁶	Size (FSC)	Granularity (SSC)
222	Toe	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	97% (EI)	dGATa, GRTas	8.3 ± 3.9	313.3 ± 46.0	360.4 ± 26.6
225	Toe	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	96% (EI)	dXYLa, GRTas	10.7 ± 1.9	300.3 ± 19.8	396.3 ± 63.1
229	Finger	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	95% (VGI)	URE	9.5 ± 4.5	298.9 ± 19.5	385.7 ± 42.9
234	–	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	98% (EI)	NAGa	22.5 ± 1.1	306.6 ± 16.4	370.1 ± 13.4
235	Finger	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	97% (EI)	dXYLa, GRTas	8.3 ± 2.4	321.2 ± 52.8	413.2 ± 70.4
241	Ear	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	94% (VGI)	URE, NAGa	6.1 ± 1.8	275.1 ± 1.3	421.1 ± 40.0
248	Finger	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	94% (VGI)	URE, NAGa	9.9 ± 3.4	307.3 ± 25.4	428.7 ± 93.0
251	Gluteus	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	96% (EI)	dXYLa, GRTas	15.5 ± 4.1	322.2 ± 12.7	370.5 ± 12.1
275	Finger	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	96% (EI)	dXYLa, GRTas	15.2 ± 1.3	324.5 ± 31.0	390.6 ± 21.1
276	Finger	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	94% (VGI)	URE, NAGa	13.3 ± 1.2	295.8 ± 8.0	350.0 ± 50.4
454	–	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	94% (VGI)	URE, NAGa	18.5 ± 1.6	321.2 ± 58.0	332.0 ± 23.1
22019*	Feces	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	94% (VGI)	IMLTa, dXYLa, NAGa, dGATa	11.7 ± 6.8	308.1 ± 25.2	409.9 ± 20.0
96141*	Blood	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	96% (EI)	dXYLa, IARaA	13.0 ± 1.3	310.0 ± 31.4	349.6 ± 12.6
96143*	–	White-cream	<i>C. parapsilosis</i>	98% (EI)	IARaA	10.3 ± 2.0	339.9 ± 45.0	467.6 ± 31.7

*ATCC, American Type Culture Collection. ATCC 22019, *C. parapsilosis*; ATCC 96141, *C. orthopsilosis*; ATCC 96143, *C. metapsilosis*.

IBEx, Instituto de Biologia do Exército; –, not informed; EI, excellent identification; VGI, very good identification; dXYLa, D-xylose assimilation; dGATa, D-galacturonate assimilation; GRTas, glucuronate assimilation; IARaA, L-arabinose assimilation; IMLTa, L-malate assimilation; NAGa, N-acetyl glucosamine assimilation; URE, urease; FSC, forward light scatter; SSC, side scatter.

washed three times in PBS and analyzed in a flow cytometer (FACSCalibur; BD Bioscience) equipped with a 15-mW argon laser emitting at 488 nm. Each experimental population was mapped (10 000 events) using a two-parameter histogram of forward-angle light scatter (FSC) vs. side scatter (SSC), to evaluate size and granularity, respectively (Braga-Silva & Santos, 2011).

Calcofluor white staining

PBS-washed fungal cells were stained with calcofluor white to detect chitin at the fungal cell wall. With this purpose, fungi (10^6 mL⁻¹) were mixed with 100 µL of calcofluor white (Sigma-Aldrich) solution (1 mg mL⁻¹) and incubated for 5 min at room temperature (Laffey & Butler, 2005). Then, cells were washed three times with PBS and resuspended in 100 µL of the same buffer. Five microliters of the stained cell suspension were spotted onto a glass slide and visualized under bright field and UV/DAPI using an Observer Z1 (Zeiss, Germany) fluorescence microscope. Images were acquired with a Color View AxioCam MRm digital camera.

Scanning electron microscopy (SEM)

PBS-washed fungal cells (10^6) were fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) at 4 °C, rinsed three times with PBS, and post-fixed with 2% osmium tetroxide for 2 h. Samples were then dehydrated in graded concentrations of acetone (25–100%). Cells were dried by the critical point method, mounted on stubs, coated with gold (20–30 nm), and observed in a JEOL JSM 6490LV scanning electron microscope (Sangetha *et al.*, 2009).

Biochemical identification

Initially, all fungal isolates were phenotypically identified by plating onto CHROMagar Candida[®] medium (CHROMagar Candida Company, Paris, France). The plates were incubated for 48 h at 37 °C under aerobic conditions, and the interpretation of results was based according to the manufacturer's guidelines. Furthermore, the metabolic properties, such as sugar assimilation and enzymatic reactions, were analyzed by VITEK[®] 2 system (bioMérieux, France) using YST card according to the manufacturer's guidelines.

Molecular identification

As phenotypical methods are not sufficient to distinguish between the members of the *C. parapsilosis* complex, four distinct methodologies were performed in order to detect

the presence of the two cryptic species (*C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*).

DNA extraction

Fungal cells were recovered from Sabouraud dextrose agar (Difco, Becton, Dickinson and Company) and used for genomic DNA extraction with the Gentra[®] Pure-gene[®] Yeast and G+ Bacteria Kit (Qiagen[®], Maryland), according to the manufacturer's protocol. DNA concentration was estimated with a spectrophotometer (NanoVue Plus[™]; GE Healthcare) at A₂₆₀, and its integrity was checked under UV light after through a 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide (Sigma-Aldrich). DNA extracts were stored at -20 °C until used.

PCR with species-specific primers

Each isolate was tested with three different pairs of species-specific primers: CORF (5'-TTTGGTGGCCACGGCCT-3') and CORR (5'-TGAGGTGCAATTTGGAAGAATT-3'), CMEF (5'-TTTGGTGGCCACGGCT-3') and CMER (5'-GAGGTGCAATTTGGAAGAATGT-3'), CPAF (5'-TTT GCTTTGGTAGGCCTTCTA-3') and CPAR (5'-GAGGTGCAATTTGGAAGAAGT-3') targeting the *ITS1-5.8S-ITS2* region of the *rRNA* gene of *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. parapsilosis sensu stricto*, respectively, as previously described by Asadzadeh *et al.* (2009). PCR products (concentrated to 20 µL) were mixed with 0.2 volumes of loading buffer and separated through 1% agarose gel electrophoresis in 1× TBE buffer (89 mM Tris borate, 2 mM EDTA, pH 8.4) at 90 V for 80 min. Next, the gel was immersed in an ethidium bromide solution (Invitrogen[™], Carlsbad, CA) at a final concentration of 0.5 µg mL⁻¹ for 30 min and visualized under a UV light.

BanI digestion of secondary alcohol dehydrogenase (*SADH*) gene fragment

Primers S1F (5'-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3') and S1R (5'-CAATGCCAAATCTCCCAA-3'), which amplify a fragment of the *SADH* gene, were used for the PCR as published by Tavanti *et al.* (2005). The expected *c.* 720 bp amplicon was subsequently digested with the restriction endonuclease BanI according to the manufacturer's instructions (Biolabs). The resulting DNA fragments were separated and visualized on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. *Candida orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. parapsilosis sensu stricto* *SADH* fragments showed one band (720 bp), four bands (390, 190, 100, and 40 bp) and two bands (200 and 520 bp), respectively.

EcoRI digestion of $\beta(1,3)$ -glucan synthase subunit 1 (*FKS1*) gene

Primers REA-F (5'-GATGACCAATTYTCAAGAGT-3') and REA-R (5'-GTCAACATAAATGTAGCATTCTAGAAA TC-3'), which amplify a fragment of the *FKS1* gene, were used for the PCR as published by Garcia-Effron *et al.* (2011). The expected 1032 bp amplicon was subsequently digested with the restriction endonuclease EcoRI according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). The resulting DNA fragments were separated and visualized on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. *Candida orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. parapsilosis sensu stricto* *FKS1* fragments showed three bands (474, 306, and 252 bp), two bands (474 and 558 bp), and one band (1032 pb), respectively.

DNA sequencing of the *D1/D2* region of the 28S *rRNA* gene

The results of species-specific identification of clinical isolates were confirmed, when necessary, by DNA sequencing of the *D1/D2* region of the 28S *rRNA* gene and both strands were sequenced. The amplified product was obtained with the NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGG AAAAG-3') and NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') primers as described previously by Asadzadeh *et al.* (2009). The amplicons obtained were purified with the QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen®) according to the manufacturer's protocol. Automated sequencing was carried out using the DNA sequencing platform (ABI-3730; Applied Biosystems) (PDTIS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro, Brazil). Sequences from both DNA strands were generated and edited with the Sequencher version 4.9 software package (Genes Codes Corporation), followed by alignment by means of the Mega version 4.0.2 software. The sequences of our strains were compared by BLAST with sequences available from NCBI GenBank.

Production of hydrolytic enzymes

The enzymatic activities were measured by spectrophotometer assay or plate method. In the latter, aliquots (10 μ L) of 48-h-old cultured fungal cells (10^7) were spotted on the surface of each agar medium (see below) and then incubated for 7 days at 37 °C. The colony diameter (*a*) and the diameter of colony plus precipitation zone (*b*) were measured by a digital paquimeter and the enzymatic activities were expressed as *Pz* value ($Pz = a/b$) as described by Price *et al.* (1982). According to this definition, low *Pz* values mean high enzyme production and, inversely, high *Pz* values indicate low enzymatic produc-

tion. The *Pz* value was scored into four categories: *Pz* of 1.0 was evaluated as negative; high *Pz* between 0.999 and 0.700; moderate *Pz* between 0.699 and 0.400; low *Pz* between 0.399 and 0.100.

Protease activity

Determination of protease production was assayed using the albumin agar plate (1.17% yeast carbon base (YCB) medium supplemented with 0.2% BSA, pH 4.0) as previously described by Rùchel *et al.* (1982). The protease activity results in a clear zone around the colony, which correspond to the hydrolysis of the BSA present in the medium.

Phytase activity

Determination of phytase (*myo*-inositol hexakisphosphate or *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphate) production was assayed using the calcium phytate agar plate (glucose, 10 g; (NH₄)₂SO₄, 0.5 g; KCl, 0.2 g; MgSO₄·7H₂O, 0.1 g; calcium phytate, 2 g; yeast extract, 0.5 g; MnSO₄, 0.005 g; FeSO₄, 0.005 g, pH 7.0), as previously described by Tsang (2011). The phytase activity was directly observed around the colony able to solubilize phosphate.

Lipase activity

Production of two distinct lipases, phospholipase and esterase, was also investigated. The determination of phospholipase activity was performed using egg yolk agar plate (1 M NaCl, 5 mM CaCl₂ and 8% sterile egg yolk emulsion, pH 7.0) according to Price *et al.* (1982). The esterase production was assayed using the Tween agar plate (1 g of peptone, 0.5 g of NaCl, 0.01 g of CaCl₂, pH 7.0, 1.5 g of agar and 100 mL of distilled water, which was autoclaved, then cooled to about 50 °C, and added of 0.5 mL of autoclaved Tween) according to Aktas *et al.* (2002). In these two methods, the hydrolysis of lipid substrates present in egg yolk or Tween results in the formation of a calcium complex with fatty acids released by the action of the secreted enzymes, resulting in a precipitation zone around the colony.

Hemolytic activity

Determination of hemolysis was assayed using the blood agar plate, in which the medium was prepared by adding 7 mL of fresh sheep blood to 100 mL of Sabouraud dextrose agar supplemented with 3% glucose, as previously described by Luo *et al.* (2001). The presence of a distinct

translucent halo around the inoculum site, viewed with transmitted light, indicated positive hemolytic activity.

Catalase activity

Fungal cells (10^6) were added to lysis buffer (100 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mg mL⁻¹ pepstatin A, 1 mg mL⁻¹ aprotinin) and lysed in a cell homogenizer (FastPrep) by five cycles of 30 s, alternating with the ice bath for 2 min. Then, the mixtures were centrifuged and the supernatants obtained were added of 1.8 mL H₂O₂ (Merck, Brazil) at 17 mM in a sterile tube. The mixture was kept at room temperature for 30 min. The activity of catalase was determined by monitoring the removal of H₂O₂ in a spectrophotometer at 240 nm. Catalase activity was determined as proposed by Aebi (1984), and its specific activity was expressed as $\Delta A_{240}/\text{min}$ per milligram of protein. Protein concentration was determined by the method described by Lowry *et al.* (1951), using BSA as standard.

Detection of cell surface glycoconjugates

Paraformaldehyde-fixed fungal cells (10^6) were incubated for 1 h with three distinct fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled lectins (Sigma-Aldrich) at 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$: concanavalin A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA), and *Limax flavus* agglutinin (LFA). After these incubations, the fungal-associated fluorescence was excited at 488 nm and quantified on a flow cytometer. Fungal cells treated only with PBS were run in parallel as controls. The mapped population (10 000 events) was analyzed for log green fluorescence using a single-parameter histogram. The level of surface glycoconjugates was shown as percentage of fluoresceinated cells and as the mean of the fluorescence intensity (MFI; Braga-Silva *et al.*, 2010).

Cell surface hydrophobicity

Cell surface hydrophobicity was measured by the water-octane two-phase assay (Hazen *et al.*, 1986). Briefly, 2.5 mL of PBS-washed fungi (10^8 cells mL⁻¹) was mixed vigorously with 0.5 mL of octane and the two liquids were allowed to partition during 15 min at room temperature. ABS₅₇₀ values of species in PBS without octane overlay were used as negative controls. The percentage of exclusion of the cells from the aqueous phase (% change in ABS₅₇₀) corresponding to relative cell hydrophobicity was calculated as: $[(\text{ABS}_{570} \text{ of the control} - \text{ABS}_{570} \text{ after octane overlay}) / \text{ABS}_{570} \text{ of the control}] \times 100$. As previously reported, high, moderate, and low cell surface

hydrophobicity corresponds to respective changes 80–100%, 20–80%, and 0–20% in ABS₅₇₀.

Adhesion to abiotic substrates

Fungal cell suspensions (100 μL containing 10^6 cells) were placed on glass slides, which were previously washed with Extran for 2 h, incubated in 70% ethanol for 30 min, and then sterilized at 180 °C for 2 h, as well as in 24-well plastic plates (polystyrene) for 2 h at 37 °C. Afterward, the systems were washed three times in PBS to remove nonadherent cells. Glass slides were examined in an optical microscope (Zeiss) and the 24-well plates were analyzed in an inverted microscope (Zeiss). The experiments were performed in triplicate, and five different microscopic fields were counted in each system to express the number of total fungi adhered to these substrates (Reinhart *et al.*, 1985). In parallel, the number of yeasts and pseudohyphae were individually analyzed to check the possible induction of morphological transition due to the adhesion process to these inert substrates.

Biofilm production and viability

Fungal cell suspensions (100 μL containing 10^6 cells) were transferred into each well of a 96-well polystyrene microtiter plates for 48 h at 37 °C. Subsequently, the wells were washed three times in PBS to remove nonadherent cells. The biomass of the resultant biofilms was then assessed using the crystal violet assay (Peeters *et al.*, 2008). Briefly, 100 μL of 99% methanol was added to each well for 15 min to fix the biofilm and then the supernatants were discarded. Microplates were air-dried and then 100 μL of crystal violet solution (1 : 50 from stock solution, Sigma-Aldrich) were added to wells and incubated at room temperature for 20 min. The extra dye was washed away with tap water and then 150 μL of acetic acid 33% was added to the wells. The absorbance was measured at 590 nm using a Thermomax Molecular Device microplate reader. In parallel, the viable cells in biofilm were assessed by the colorimetric assay that investigates the metabolic reduction of 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT; Sigma-Aldrich) to a water-soluble brown formazan product. In this sense, 100 μL of the XTT/menadione solution [4 mg XTT in 10 mL prewarmed PBS was dissolved and supplemented by 100 μL menadione stock solution (Sigma-Aldrich), which contained 55 mg menadione in 100 mL acetone] was added to all wells and incubated in the dark at 37 °C for 3 h. The contents of the wells were transferred to microcentrifuge tubes and centrifuged at 4000 g for 5 min. A total of 100 μL of supernatant from each well was transferred to a new

microplate and the colorimetric changes were measured at 492 nm using a microplate reader (Peeters *et al.*, 2008). In parallel, the biofilm was developed on glass slides for 24 and 48 h and then processed to be analyzed by means of SEM.

Interaction to cell lineages

The cell lineages L929 (code number CRL-2148) from mouse C3H/An connective tissue (mouse fibroblasts) and RAW264.7 (code number TIB-71) from mouse BALB/c (macrophages) were obtained from ATCC and kindly provided by Dr Maria Teresa Villela Romanos (Departamento de Virologia, IMPG – UFRJ). The animal cells were maintained and grown to confluence in 25-cm² culture flasks containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Life Technologies) at 37 °C with 5% CO₂. The pH was maintained at 7.2 by the addition of 3 g L⁻¹ HEPES and 0.2 g L⁻¹ NaHCO₃ to the medium. The initial inoculum was 5 × 10⁴ cells mL⁻¹; this was subcultured every 2 days, and the cells were maintained in log-phase growth. For adhesion assays, animal cells were plated onto 24-well multidishes at a density of 10⁵ cells per well and incubated at 37 °C for 24 h in DMEM supplemented with 10% FBS. Before interaction with animal cells, the wall of fungal cells (10⁶) was stained with 0.5 mg mL⁻¹ FITC in PBS at room temperature for 10 min (Chaka *et al.*, 1995). The cells were then washed twice with PBS and finally rinsed in DMEM. Fungal suspensions were prepared in DMEM to generate a ratio of 10 yeasts per animal cell. Interactions between fungal and animal cells occurred at 37 °C with 5% CO₂ for 2 h. Cells were washed three times in PBS to remove nonadherent yeasts. Fungus–animal cell complexes were treated for 10 min at 25 °C with trypan blue (200 µg mL⁻¹) to discriminate between surface-associated and intracellular fungal cells. After removal from the plastic surface with a cell scraper, the interaction systems were analyzed by flow cytometry as described previously (Chaka *et al.*, 1995). Control preparations were developed using uninfected animal cells and nonstained yeasts.

Statistics

All experiments were performed in triplicate, in three independent experimental sets. The data were analyzed statistically by means of Student's *t*-test using EPI-INFO 6.04 (Database and Statistics Program for Public Health) computer software. The correlation tests were determined by Pearson's correlation coefficient (*r*). In all analyses, *P* values of 0.05 or less were considered statistically significant.

Results

Identification of fungal strains

All the 14 fungal isolates (three ATCC reference strains and 11 clinical isolates) were initially rechecked to certify their authentication by mycology methodologies. Analysis of growth in a chromogenic medium culture facilitated the determination of colony purity and the identification of *Candida* spp. In this context, the fungal strains yielded only white-cream colonies after 48 h of cultivation on CHROMagar *Candida* medium (Fig. 1a), which suggests a presumptive identification of *C. parapsilosis* (Table 1). The carbohydrate assimilation and metabolic enzymatic profiles evaluated by VITEK 2 system corroborated the preliminary result, showing identity probability ranging from 94% (very good identification) to 98% (excellent identification) in which the most contradictory tests were D-xylose assimilation (6/14 strains, 42.9%), N-acetylglucosamine assimilation (6/14, 42.9%), glucuronate assimilation (5/14, 35.7%), urease (5/14, 35.7%), D-galacturonate assimilation (2/14, 14.3%), L-arabinose assimilation (2/14, 14.3%), and L-malate assimilation (1/14, 7.1%; Table 1).

Some morphological and growth characteristics were also examined. All the 14 strains of *C. parapsilosis* complex formed smooth colonies with no apparent filamentous extensions from the edge of the colonies on YCB-BSA agar medium (Fig. 1b). However, yeasts, displaying oval, round or cylindrical shapes, and pseudohyphae were detected during the *in vitro* growth in YCB-BSA broth in all the fungal isolates studied (Figs. 1c and d). Staining with calcofluor white showed that chitin was distributed along the length of all morphotypes as well as at the bud scars (Fig. 1e–g). Regarding the size and granularity, all the strains presented similar measurements for these two morphological parameters as judged by flow cytometry analyses, showing mean size of 310.3 ± 15.6 and mean granularity of 389.0 ± 36.9 (Table 1). In addition, all the strains attained the exponential growth phase at 48 h of cultivation in YCB-BSA medium; however, they yielded different amount of cells ranging from 6.1 × 10⁶ to 22.5 × 10⁶ (Table 1).

As previously proposed (Gomez-Lopez *et al.*, 2008; Lockhart *et al.*, 2008; Asadzadeh *et al.*, 2009), the three species belonging to the *C. parapsilosis* complex are both morphologically and phenotypically indistinguishable (Fig. 1e–g); consequently, molecular methods are needed for their precise detection (Fig. 2). Firstly, the fungal isolates were screened by PCR using species-specific primers derived from unique sequences within the internally transcribed spacer 1 (*ITS1*)–5.8 *rRNA*–*ITS2* region developed by Asadzadeh *et al.* (2009). As expected, PCR amplifications

of the reference ATCC strains with the CPAF+CPAR, CORF+CORR, and CMEF+CMER primers yielded amplicons of 379, 367, and 374 bp only with DNA from *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis*, respectively (Fig. 2a). Of the 11 clinical isolates, nine were amplified only by a single pair of primers, CPAF+CPAR,

identifying them as *C. parapsilosis sensu stricto*; however, the remaining strains (248 and 276) were imprecisely identified, because two distinct pair of primers (CPAF+CPAR and CORF+CORR) were able to generate amplifications (Fig. 2a). To solve this identification inaccuracy, we performed the PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) of two distinct genes: *SADH* and *FKS1*. PCR amplification of a fragment of the *SADH* gene generated an amplicon of *c.* 720 bp in all fungal strains (Fig. 2b, *SADH*), which was subsequently digested by the restriction enzyme *BanI*. As expected, *C. parapsilosis sensu stricto* (ATCC 22019) presented one *BanI* restriction site at position 196, *C. metapsilosis* (ATCC 96143) had three restrictions at positions 96, 469 and 529, while *C. orthopsilosis* (ATCC 96141) had none cleavage site (Fig. 2b, *SADH-BanI*). Among the clinical isolates, all samples ($n = 11$) were identified as *C. parapsilosis sensu stricto* (Fig. 2b, *SADH-BanI*). The *FKS1* gene was successfully amplified in all isolates tested, generating an amplicon of 1032 bp (Fig. 2c, *FKS1*) that was enzymatically digested with endonuclease *EcoRI*. As predicted, the restriction pattern of *C. metapsilosis* (ATCC 96143) showed only one site of cleavage at position 474, *C. orthopsilosis* (ATCC 96141) two sites at positions 474 and 778, while *C. parapsilosis sensu stricto* (ATCC 22019) showed no *EcoRI* digestion sites (Fig. 2c, *FKS1-EcoRI*). Based on the *FKS1* restriction profile, nine clinical isolates were identified as *C. parapsilosis sensu stricto* and two (248 and 276) as *C. orthopsilosis* (Fig. 2c, *FKS1-EcoRI*). DNA sequencing of the *D1/D2* region of the 28S *rRNA* gene was subjected to a nucleotide

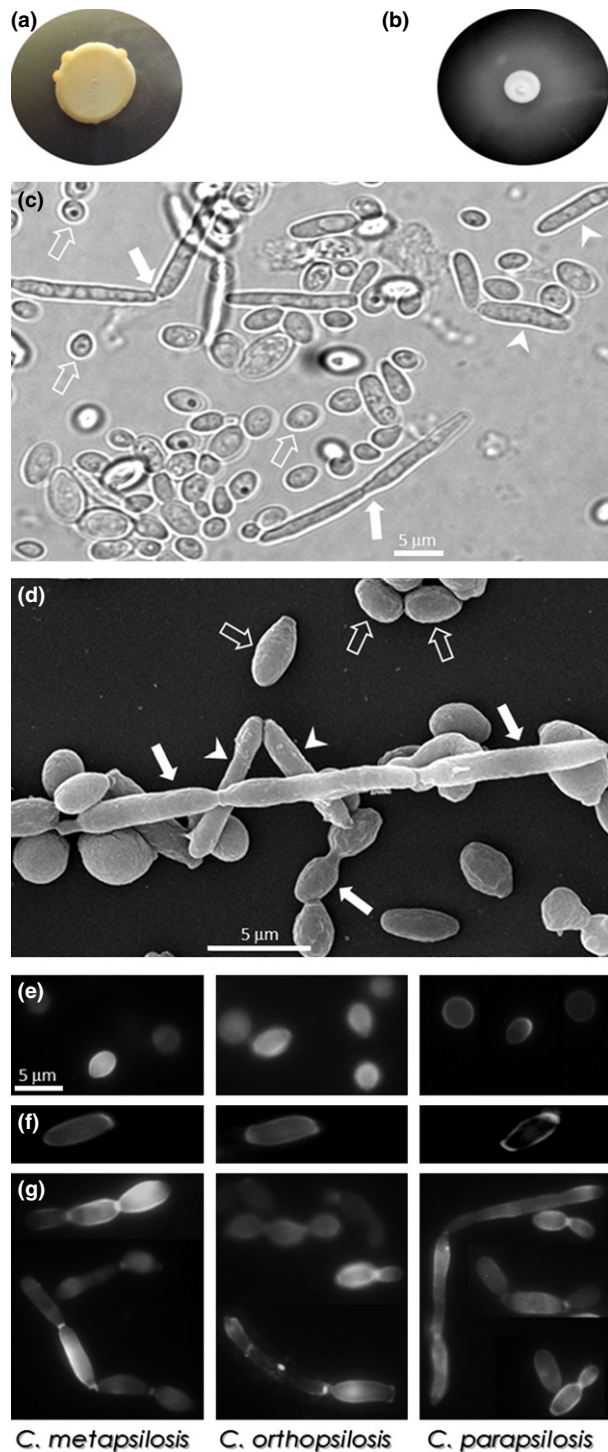


Fig. 1. Macroscopic and microscopic aspects of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex. Macroscopic colony cultured for 48 h at 37 °C on CHROMagar Candida medium (a) and YCB-BSA (b). Note in (b) a clearance zone around the colony, due to albumin hydrolysis by fungal secreted aspartic-type proteases. In the present study, all the *C. parapsilosis* complex strains exhibited smooth phenotypes cultured on both culture media. For this reason, only representative images of *C. parapsilosis sensu stricto* are shown. Microscopy structures observed when fungal strains were cultured in YCB-BSA medium (c–g). Light (c) and scanning electron (d) microscopies were performed to visualize the different morphotypes of *C. parapsilosis* complex, including oval/rounded yeasts (open white arrows), elongated cells (white arrowheads), and pseudohyphae (closed white arrows). All these macroscopic colonial aspects as well as the microscopic structures were identical in the three species belonging to the *C. parapsilosis* complex (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis*); consequently, it was showed only representative images concerning these morphological characteristics. To corroborate these findings, it was presented the epifluorescence photocomposition of the different morphological growth forms of *C. parapsilosis* complex stained with calcofluor white to visualize chitin along the surface of all morphotypes: oval/rounded yeasts (e), elongated cells (f), and pseudohyphae (g). The panels (e–g) were photographed at the same magnification.

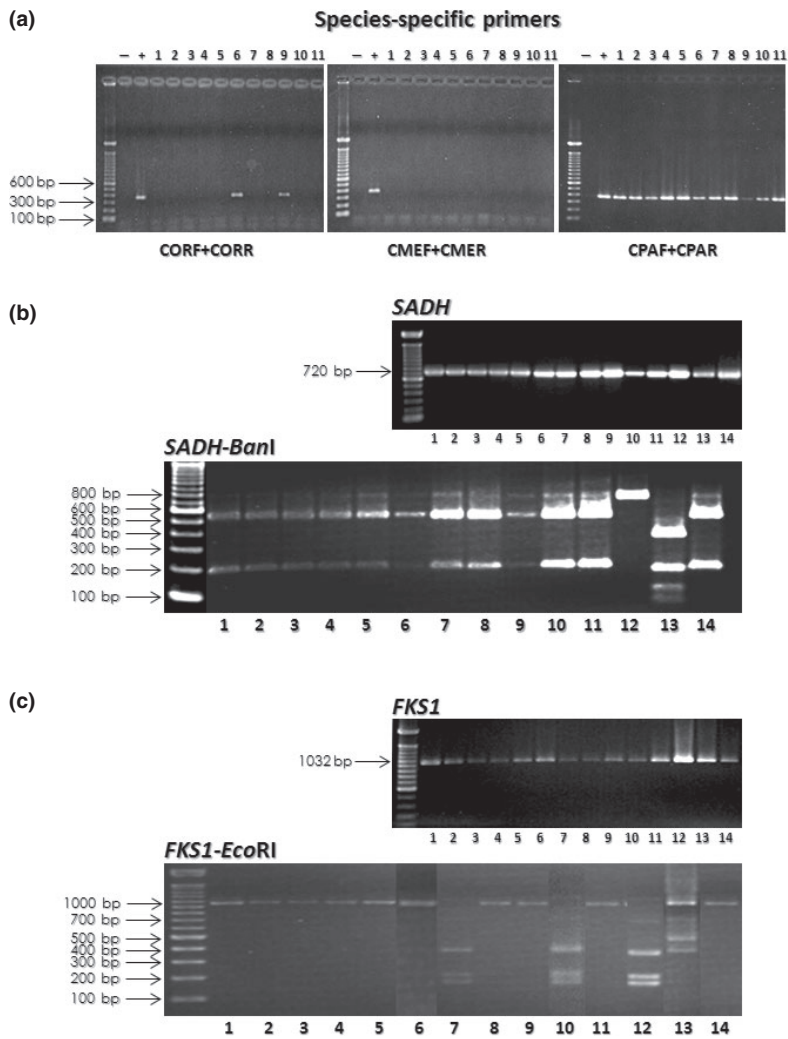


Fig. 2. Molecular discrimination of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex. (a) Agarose gel showing the PCR-amplified products obtained from 11 clinical isolates and three reference strains amplified with species-specific primers from *C. parapsilosis* (CPAF+CPAR), *C. orthopsilosis* (CORF+CORR), and *C. metapsilosis* (CMEF+CMER). Note that the first lane of each gel represents the 100-bp ladder; (-), negative control (PCR mix with no fungal DNA); (+), positive control (reference strain specific for each pair of primers); and clinical strains (1–11). Lanes: (1) 222, (2) 225, (3) 229, (4) 234, (5) 235, (6) 248, (7) 241, (8) 251, (9) 276, (10) 275, (11) 454. (b) Amplification of a 720-bp *SADH* gene fragment from the genomic DNA of fungal strains and BanI digestion of the *SADH*-PCR product obtained from clinical isolates (1–11) and reference strains (12–14). (c) Amplification of a 1032-bp *FKS1* gene fragment from the genomic DNA of fungal strains and EcoRI digestion of the *FKS1*-PCR product obtained from clinical isolates (1–11) and reference strains (12–14). Note that in (b) and (c), the lanes represent the following strains: (1) 222, (2) 225, (3) 229, (4) 234, (5) 235, (6) 241, (7) 248, (8) 251, (9) 275, (10) 276, (11) 454, (12) *C. orthopsilosis* ATCC 96139, (13) *C. metapsilosis* ATCC 96143, (14) *C. parapsilosis* ATCC 22019.

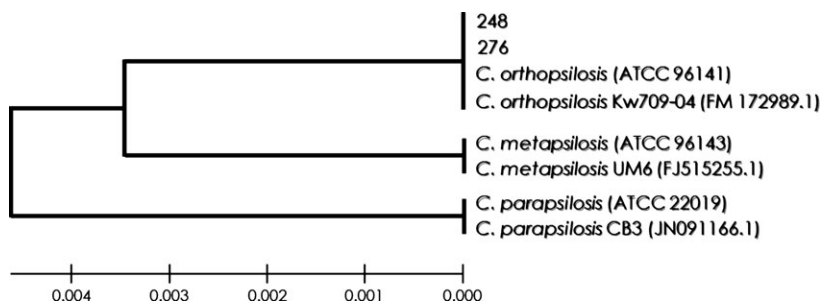


Fig. 3. Phylogenetic neighbor-joining dendrogram generated from a genetic similarity matrix based on comparison of *D1/D2* region of the *28S rRNA* gene sequences from two cutaneous clinical strains (designated as 248 and 276) and six type strains belonging to the *Candida parapsilosis* complex, which sequences were obtained from GenBank.

BLAST search and sequence analysis, which resulted in identification of the strains 248 and 276 as *C. orthopsilosis* due to 100% sequence similarity in comparison with the *D1/D2* sequence of two reference strains (FM172989.1 and ATCC 96141) of *C. orthopsilosis* deposited at the GenBank database (Fig. 3).

After employing all these methodologies, among 11 presumed *C. parapsilosis* clinical isolates examined, nine were identified as *C. parapsilosis sensu stricto* and the remaining two isolates were found to belong to the cryptic species *C. orthopsilosis*. No *C. metapsilosis* was found in the clinical isolates analyzed in this study.

Table 2. Hydrolytic enzyme production by clinical strains belonging to the *Candida parapsilosis* complex

Species/Code	Protease*	Phytase*	Esterase*	Hemolysis*	Catalase†
<i>C. parapsilosis</i>					
ATCC 22019	0.310 ± 0.020	0.530 ± 0.033	0.670 ± 0.022	0.849 ± 0.030	0.248 ± 0.056
222	0.262 ± 0.050	0.363 ± 0.015	0.438 ± 0.005	0.877 ± 0.034	0.457 ± 0.025
225	0.285 ± 0.031	1	0.414 ± 0.020	0.851 ± 0.052	0.183 ± 0.010
229	0.302 ± 0.025	1	0.456 ± 0.017	0.806 ± 0.036	0.232 ± 0.003
234	0.295 ± 0.031	0.420 ± 0.020	0.434 ± 0.018	0.926 ± 0.080	0.593 ± 0.013
235	0.292 ± 0.038	0.480 ± 0.003	1	0.911 ± 0.028	0.048 ± 0.015
241	0.228 ± 0.025	0.392 ± 0.013	0.448 ± 0.013	0.858 ± 0.034	0.367 ± 0.006
251	0.330 ± 0.041	0.450 ± 0.002	0.446 ± 0.011	0.857 ± 0.025	0.183 ± 0.021
275	0.335 ± 0.030	0.467 ± 0.013	0.476 ± 0.009	0.875 ± 0.028	0.047 ± 0.018
454	0.333 ± 0.024	0.433 ± 0.015	0.456 ± 0.017	0.866 ± 0.039	0.513 ± 0.024
<i>C. orthopsilosis</i>					
ATCC 96141	0.480 ± 0.026	1	0.870 ± 0.022	0.927 ± 0.019	0.370 ± 0.029
248	0.324 ± 0.018	0.480 ± 0.002	0.336 ± 0.023	0.776 ± 0.076	0.144 ± 0.002
276	0.352 ± 0.033	0.473 ± 0.012	0.364 ± 0.011	0.846 ± 0.068	0.384 ± 0.012
<i>C. metapsilosis</i>					
ATCC 96143	0.350 ± 0.019	0.530 ± 0.008	0.720 ± 0.021	0.844 ± 0.064	0.031 ± 0.012

*The protease, phytase, esterase, and hemolysis activities were measured by the formation of a clear halo around the colony and expressed as *Pz* value as previously proposed by Price *et al.* (1982). The *Pz* value was scored into four categories: *Pz* of 1.0 was evaluated as negative; high *Pz* between 0.999 and 0.700; moderate *Pz* between 0.699 and 0.400; low *Pz* between 0.399 and 0.100.

†The catalase activity was determined by monitoring the removal of H₂O₂ at 240 nm and expressed as ΔA₂₄₀/min mg⁻¹ of protein.

Production of hydrolytic enzymes

All the 14 fungal isolates were able to secrete protease after 7 days of growing in YCB-BSA medium. Except for the reference strain *C. orthopsilosis* (ATCC 96141), all the remaining isolates presented low *Pz* values ranging from 0.352 to 0.228, characterizing them as excellent protease producers (Table 2). Weak hemolytic activity was detected in all fungal strains (mean *Pz* of 0.862 ± 0.042; Table 2). Regarding the phytase activity, 11 strains (78.6%) were able to solubilize phosphate when incubated for 7 days in calcium phytate agar, while the following strains ATCC 96141 (*C. orthopsilosis*), 225, and 229 (*C. parapsilosis*) showed no activity for phytase (Table 2). Almost all phytase-producing strains (9/11) had moderate *Pz* values varying from 0.530 to 0.420 (Table 2). Esterase activity was detected in 92.9% (13/14) of fungal strains. Curiously, the three ATCC reference strains produced considerable ($P < 0.05$) lower amount of esterase activity than the other esterase-producing clinical isolates (Table 2). The activity of catalase was measured in all the studied strains ranging from 0.031 to 0.593 (Table 2). In contrast, any fungal strain with ability to produce phospholipase was not observed.

Expression of surface glycoconjugates and cell surface hydrophobicity

Glycoconjugates containing units of mannose/glucose were found in the surface of all fungal strains in similar propor-

tions (regarding the percentage of fluorescent cells of each fungal population, mean of 89.8 ± 4.6) and comparable amounts (regarding the mean of fluorescence intensity of each fungal population, mean of 109.9 ± 12.8; Table 3). Also, *N*-acetylglucosamine was evidenced in all fungal strains, presenting a proportion of fluorescent cells around 44–58% (mean of 52.6 ± 3.9), exception with the reference strains ATCC 22019 (*C. parapsilosis*) and ATCC 96141 (*C. orthopsilosis*) that presented higher proportion of this monosaccharide (Table 3). Sialic acids were expressed in low percentage at the surface of fungal cells varying from 0.3% to 21% (Table 3). The partition of cells in water-octane solution revealed a high cell surface hydrophobicity in all the fungal strains (mean of 95.3 ± 4.3; Table 3).

Adhesion to abiotic substrates

The ability to adhere to abiotic substrates was performed using glass and polystyrene. All the fungal strains were able to bind to both inert surfaces with a marginally predilection to the plastic substrate (Table 4). Interestingly, the number of total fungi adhered to both substrates was immensely varied, showing a typical strain-specific adhesion property (Table 4). For instance, the number of fungi adhered to glass and plastic fluctuated from 4 to 127 and 8 to 300 cells per microscopic field, respectively (Table 4). In the adhesion experiments, yeasts and pseudohyphae were regularly observed in all studied fungal strains, which led us to quantify the number of these

Table 3. Surface properties of clinical strains belonging to the *Candida parapsilosis* complex

Code	Mannose/Glucose*		N-acetylglucosamine*		Sialic Acid*		Hydrophobicity†
	% FC	MFI	% FC	MFI	% FC	MFI	
<i>C. parapsilosis</i>							
ATCC 22019	83.7 ± 9.8	139.4 ± 12.3	84.1 ± 0.5	96.8 ± 2.6	2.5 ± 0.4	134.1 ± 1.5	95.9 ± 4.2
222	96.0 ± 0.3	108.2 ± 0.8	55.1 ± 0.1	102.5 ± 4.2	0.4 ± 0.1	122.4 ± 6.3	99.7 ± 3.3
225	92.6 ± 1.4	107.0 ± 0.3	53.9 ± 0.2	123.7 ± 0.9	1.6 ± 0.5	126.9 ± 4.4	99.9 ± 2.0
229	91.1 ± 0.1	104.3 ± 0.2	57.1 ± 0.2	116.4 ± 2.0	8.4 ± 1.0	125.7 ± 1.1	90.9 ± 5.7
234	84.4 ± 2.0	107.5 ± 0.2	54.3 ± 4.4	121.5 ± 1.1	2.6 ± 1.2	156.8 ± 6.7	97.2 ± 2.0
235	90.4 ± 4.0	105.3 ± 0.1	51.0 ± 1.0	127.2 ± 2.0	20.9 ± 2.3	124.0 ± 3.4	99.1 ± 2.6
241	95.8 ± 0.1	98.4 ± 1.2	43.8 ± 6.5	126.8 ± 2.5	1.8 ± 0.1	144.0 ± 1.6	94.7 ± 4.8
251	93.0 ± 0.9	102.2 ± 0.2	54.0 ± 1.6	111.8 ± 2.2	0.9 ± 0.4	113.5 ± 5.4	92.1 ± 7.8
275	89.4 ± 6.1	106.9 ± 1.6	47.0 ± 5.3	121.9 ± 4.5	1.3 ± 0.8	130.3 ± 2.3	94.4 ± 9.0
454	88.6 ± 1.6	104.5 ± 0.3	52.5 ± 13.3	115.2 ± 3.5	2.4 ± 0.9	57.6 ± 4.0	84.9 ± 12.8
<i>C. orthopsilosis</i>							
ATCC 96141	86.0 ± 0.4	136.2 ± 4.2	79.0 ± 0.2	127.2 ± 19.0	8.1 ± 1.2	131.6 ± 7.3	92.0 ± 5.6
248	96.5 ± 0.1	98.7 ± 1.3	52.8 ± 0.1	122.3 ± 2.8	0.3 ± 0.1	117.4 ± 11.1	95.9 ± 1.7
276	83.6 ± 5.7	100.9 ± 1.5	57.5 ± 2.2	123.6 ± 0.8	11.7 ± 1.4	160.4 ± 0.8	99.2 ± 3.3
<i>C. metapsilosis</i>							
ATCC 96143	85.5 ± 5.4	118.4 ± 8.9	52.4 ± 0.7	116.6 ± 4.9	12.5 ± 1.4	121.0 ± 0.3	98.9 ± 1.5

*The results were expressed as percentage of fluorescence cells (FC) as well as mean of fluorescence intensity (MFI).

†The results were expressed as percentage of hydrophobicity.

Table 4. Adhesion to abiotic substrates by clinical strains belonging to the *Candida parapsilosis* complex

Species/Code	Glass*	Polystyrene*	Biofilm†	
			Biomass	Viability
<i>C. parapsilosis</i>				
ATCC 22019	23.8 ± 1.3	104.0 ± 11.3	0.792 ± 0.006	0.122 ± 0.004
222	16.0 ± 1.6	40.9 ± 3.9	0.732 ± 0.017	0.124 ± 0.023
225	52.8 ± 4.7	114.6 ± 10.2	0.788 ± 0.006	0.125 ± 0.004
229	17.4 ± 2.4	62.0 ± 3.6	0.686 ± 0.030	0.120 ± 0.007
234	142.8 ± 5.7	105.1 ± 12.9	0.822 ± 0.004	0.122 ± 0.010
235	30.6 ± 3.9	21.9 ± 2.0	0.801 ± 0.018	0.116 ± 0.024
241	27.7 ± 2.4	27.9 ± 1.9	0.789 ± 0.003	0.100 ± 0.001
251	4.3 ± 0.9	12.4 ± 1.4	0.766 ± 0.015	0.102 ± 0.005
275	11.9 ± 1.0	8.6 ± 0.3	0.758 ± 0.023	0.118 ± 0.011
454	13.4 ± 0.8	52.3 ± 4.0	0.781 ± 0.005	0.118 ± 0.011
<i>C. orthopsilosis</i>				
ATCC 96141	63.7 ± 3.4	300.4 ± 37.3	0.560 ± 0.003	0.134 ± 0.030
248	25.5 ± 1.3	21.6 ± 0.6	0.804 ± 0.012	0.125 ± 0.010
276	76.7 ± 3.7	17.9 ± 1.3	0.741 ± 0.015	0.136 ± 0.019
<i>C. metapsilosis</i>				
ATCC 96143	126.6 ± 7.8	244.9 ± 29.9	0.524 ± 0.004	0.126 ± 0.017

*The results were expressed as number of fungal cells per microscopic field.

†The biomass and viability of biofilm were measured by crystal violet incorporation at 540 nm and XTT reduction at 492 nm, respectively.

two distinct morphotypes. The number of pseudohyphae exceeded 50% in 8 (57.1%) and 13 (92.9%) fungal strains, respectively, during the interaction with glass and polystyrene for 2 h (Table 5). In general, the percentage of pseudohyphae was higher during the interaction with polystyrene than glass in all fungal strains, with the exception of *C. metapsilosis* (ATCC 96143; Table 5).

Biofilm formation

The formation of biofilm by fungal strains of *C. parapsilosis* complex on polystyrene was quite similar regarding either biomass (mean of 0.772 ± 0.038), except for the reference strains *C. metapsilosis* (ATCC 96143) and *C. orthopsilosis* (ATCC 96141), or viability (mean of 0.121 ± 0.010 ; Table 4). As no significant

Table 5. Cell differentiation of clinical strains belonging to the *Candida parapsilosis* complex

Species/code	Glass*		Polystyrene*	
	Yeasts (%)	Pseudohyphae (%)	Yeasts (%)	Pseudohyphae (%)
<i>C. parapsilosis</i>				
ATCC 22019	6.9 ± 1.3 (36.5)	12.0 ± 0.5 (63.5)	22.5 ± 11.3 (22.7)	76.7 ± 5.2 (77.3)
222	3.8 ± 0.6 (23.6)	12.2 ± 1.4 (76.4)	6.7 ± 3.0 (16.3)	34.3 ± 1.5 (83.7)
225	24.0 ± 4.0 (45.5)	28.8 ± 5.2 (54.5)	22.2 ± 4.8 (19.4)	92.4 ± 5.4 (80.6)
229	7.9 ± 0.8 (45.1)	9.6 ± 1.0 (54.9)	11.4 ± 0.4 (18.4)	50.6 ± 1.7 (81.6)
234	106.0 ± 6.8 (74.3)	36.8 ± 3.8 (25.7)	11.3 ± 3.3 (10.7)	95.3 ± 11.1 (89.3)
235	24.2 ± 6.5 (79.0)	6.4 ± 1.2 (21.0)	4.9 ± 0.8 (22.3)	17.0 ± 2.0 (77.7)
241	9.6 ± 1.5 (34.5)	18.1 ± 2.8 (65.5)	6.5 ± 0.6 (23.2)	21.5 ± 2.3 (76.8)
251	1.7 ± 1.0 (40.0)	2.6 ± 0.8 (60.0)	4.4 ± 0.7 (35.7)	8.0 ± 1.8 (64.3)
275	7.1 ± 1.8 (60.0)	4.8 ± 0.5 (40.0)	3.1 ± 0.6 (35.9)	5.5 ± 0.9 (64.1)
454	8.0 ± 0.6 (59.8)	5.4 ± 0.8 (40.2)	3.9 ± 1.2 (7.4)	48.4 ± 4.8 (92.6)
<i>C. orthopsilosis</i>				
ATCC 96141	6.9 ± 1.3 (36.5)	12.0 ± 0.5 (63.5)	22.5 ± 11.3 (22.7)	76.7 ± 5.2 (77.3)
248	5.8 ± 0.8 (22.9)	19.7 ± 1.7 (77.1)	3.7 ± 0.3 (17.0)	17.9 ± 0.4 (83.0)
276	42.0 ± 4.2 (54.8)	34.7 ± 2.8 (45.2)	8.7 ± 0.7 (48.7)	9.2 ± 1.2 (51.3)
<i>C. metapsilosis</i>				
ATCC 96143	85.0 ± 7.8 (65.9)	44.0 ± 4.2 (34.1)	239.0 ± 37.3 (90.2)	25.8 ± 12.5 (9.8)

*The results were expressed as number of fungal cells (yeasts or pseudohyphae) per microscopic field.

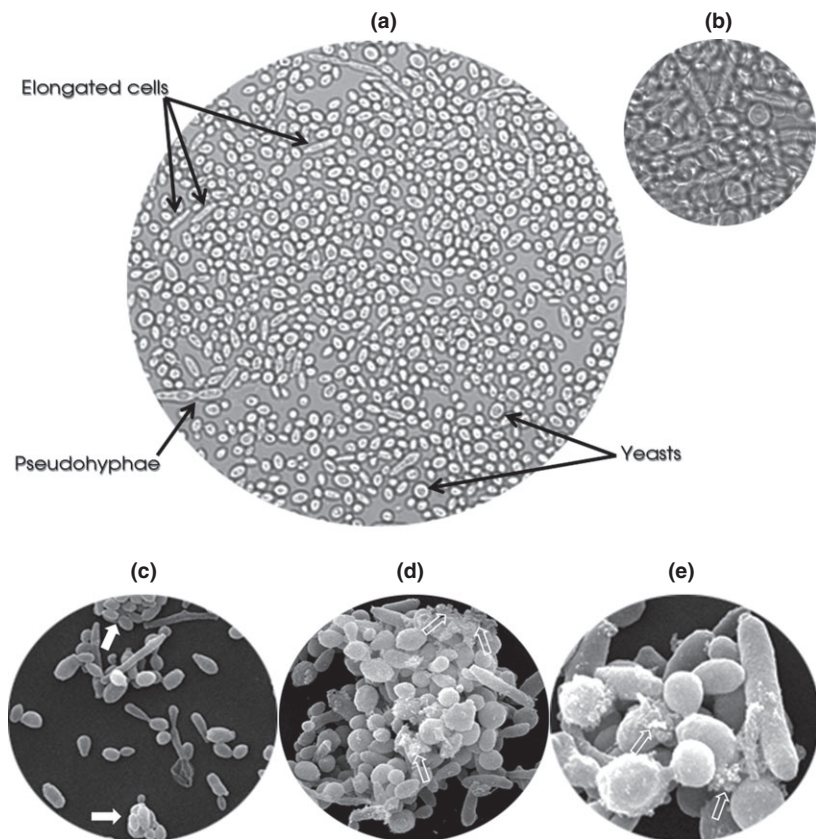


Fig. 4. Biofilm architecture of species of *Candida parapsilosis* complex. Light micrographs showing the *in vitro* biofilm formation of *C. parapsilosis sensu stricto* on polystyrene substrate after 24 h (a) and 48 h (b). Note in (a) the presence of single-type cells (oval/rounded yeasts and elongated cells) and filamentous forms (pseudohyphae). Scanning electron microscopy images (c–e) showing the biofilm of *C. parapsilosis sensu stricto* on glass after 24 h (c) and 48 h (d and e). Note that early-phase biofilm (c) presented clustered cells of yeast-shaped morphology (white arrows) as well as elongated cells and pseudohyphae. A typical mature biofilm was observed after 48 h of adhesion (d and e), consisting of a dense network of yeast-like and pseudohyphal elements as well as a thin and irregular extracellular matrix (open white arrows) that appears in micrographs as a fibrous network between fungal cells. Similar biofilm architectures were observed in *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* (data not shown).

differences were observed in the biomass and viability, we showed representative images of biofilm formed by strains belonging to the *C. parapsilosis* complex on

polystyrene substrate after 24 h (Fig. 4a) and 48 h (Fig. 4b). On light microscopy, the biofilm architecture was comprised by a homogeneous layer of yeasts as

Table 6. Interaction of clinical strains of *Candida parapsilosis* complex with mammalian cells

Species/code	L929*			RAW 264.7*		
	Association index	Adhered fungi (%)	Internalized fungi (%)	Association index	Adhered fungi (%)	Internalized fungi (%)
<i>C. parapsilosis</i>						
ATCC 22019	74.7 ± 2.3	12.9	87.1	99.3 ± 2.0	17.5	82.5
222	41.8 ± 2.5	58.2	41.8	56.8 ± 0.1	42.4	57.6
225	45.5 ± 2.7	38.2	61.8	67.3 ± 1.2	33.3	66.7
229	45.3 ± 5.8	50.1	49.9	72.9 ± 0.5	28.0	72.0
234	63.0 ± 2.0	17.4	82.6	81.6 ± 0.1	18.8	81.2
235	67.5 ± 2.1	28.3	71.7	75.7 ± 2.5	25.4	74.6
241	66.8 ± 3.9	42.0	58.0	39.0 ± 1.0	60.3	39.7
251	63.8 ± 3.9	27.4	72.6	53.8 ± 3.8	47.1	52.9
275	68.2 ± 0.7	32.0	68.0	56.0 ± 0.6	44.6	55.4
454	50.9 ± 1.2	58.3	41.3	62.7 ± 1.6	38.6	61.4
<i>C. orthopsilosis</i>						
ATCC 96141	78.8 ± 3.6	16.2	83.8	97.8 ± 0.3	22.7	77.3
248	64.5 ± 3.5	46.8	53.2	67.0 ± 2.2	33.9	66.1
276	65.9 ± 0.2	40.3	59.7	76.6 ± 3.0	24.1	75.9
<i>C. metapsilosis</i>						
ATCC 96143	95.3 ± 1.4	12.0	88.0	99.6 ± 1.7	17.1	82.9

*Association index represents the total number of fungi interacted with animal cells.

well as by some elongated and pseudohyphal forms (Fig. 4a). Cells were distributed widely on the polystyrene surface; however, some gaps can be observed during the first 24 h (Fig. 4a). The ultrastructure of biofilms developed on glass initially (24 h) consisted of irregular clusters of yeast-like cells and short filamentous forms (Fig. 4c). Mature biofilms (48 h) showed a tridimensional layer containing yeasts and pseudohyphae, exhibiting minimal visible extracellular matrix material (Fig. 4d and e).

Interaction with cell lineages

In these set of experiments, two distinct cell lineages were used: a nonprofessional (fibroblast) and a professional phagocytic cell (macrophage). The association indexes among fungi and both cell lineages were very dissimilar, varying immensely according to each studied strain. However, as a whole, the interaction process was marginally enhanced to macrophages when compared to fibroblasts (Table 6). Also, the majority of fungal cells were detected inside the fibroblasts and macrophages in almost all fungal strains (Table 6).

Correlations

Statistically significant correlations were found to exist among the surface *N*-acetylglucosamine residues, protease production or pseudohyphae formation in species belonging to the *C. parapsilosis* complex and the adherence to the polystyrene. When the data on adhesion of glass were

correlated with data from expression of mannose-/glucose-rich surface glycoconjugates or pseudohyphae formation, significant positive relationships were observed between these parameters. The biofilm formation was positively correlated with the production of protease and negatively related with the fungal cell size. The adhesion to fibroblast cells was positively correlated with the expression of glycoconjugates containing mannose/glucose units as well as production of esterase by species belonging to the *C. parapsilosis* complex. The expression of surface residues of mannose/glucose, *N*-acetylglucosamine, and esterase production was positively correlated with the adhesion to macrophages. All correlations are shown in Table 7.

Discussion

Invasive candidiasis is a leading cause of mycosis-associated morbidity and mortality (Pfaller & Diekema, 2007). Among the *Candida* species causing human infections, *C. parapsilosis* accounts for a significant proportion of nosocomial infections, with an increasing prevalence in clinic settings due its propensity to easily colonize hospital environments including medical devices and hands of healthcare workers (Trofa et al., 2008; van Asbeck et al., 2009). Early reports demonstrated that *C. parapsilosis* strains are more heterogeneous than other *Candida* spp. In this line of thinking, Tavanti et al. (2005) proposed the creation of three related species named *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* based on significant genetic differences. Since then, an increased

Table 7. Correlations between potential fungal virulence attributes and adhesion to different structures/cells

Parameters	Surface molecules/properties, <i>P</i> (<i>r</i>)				Hydrolytic enzymes, <i>P</i> (<i>r</i>)				Morphological characteristics, <i>P</i> (<i>r</i>)			
	Man/Glu	NAG	Sialic acid	CSH	Protease	Esterase	Catalase	Phytase	Hemolysis	Size	Granularity	Filamentation
Polystyrene	0.0900 (-0.469)	0.0491* (0.534)	0.5969 (-0.154)	0.9736 (0.009)	0.0137* (-0.640)	0.0619 (-0.511)	0.9511 (0.0180)	0.0644 (0.524)	0.2687 (0.317)	0.0859 (0.475)	0.9867 (-0.004)	0.0019* (0.752)
Glass	0.0267* (-0.589)	0.8999 (0.037)	0.1945 (-0.368)	0.1664 (0.391)	0.4793 (-0.206)	0.6695 (-0.125)	0.4937 (0.199)	0.9162 (-0.031)	0.2657 (0.319)	0.1001 (0.457)	0.1892 (0.372)	< 0.0001* (0.861)
Biofilm (biomass)	0.2881 (0.305)	0.3389 (-0.276)	0.4779 (0.206)	0.9297 (0.025)	0.0150* (0.633)	0.1384 (0.416)	0.4930 (0.200)	0.1426 (0.412)	0.8181 (-0.067)	0.0435* (-0.545)	0.8586 (-0.052)	0.2608 (-0.322)
Fibroblast	0.0564* (0.562)	0.3846 (0.252)	0.6895 (0.117)	0.8068 (-0.071)	0.0717 (0.495)	0.0495* (-0.533)	0.1795 (-0.380)	0.7495 (-0.093)	0.5995 (0.153)	0.0524 (-0.527)	0.6332 (-0.140)	ND
Macrophage	0.0018* (0.755)	0.0042* (0.713)	0.5061 (0.194)	0.4023 (-0.243)	0.1130 (0.442)	0.0368* (-0.561)	0.7596 (-0.092)	0.2883 (0.305)	0.5505 (0.174)	0.5792 (-0.162)	0.8480 (0.056)	ND

**P* < 0.05 denotes significance; *r*, Pearson's correlation coefficient.

Man, mannose; Glu, glucose; NAG, N-acetylglucosamine; CSH, cell surface hydrophobicity; ND, non-determined.

interest has flourished in the studies focused on epidemiology, biochemical/metabolic properties, antifungal susceptibilities, virulence factors' expression and pathogenesis of the three species belonging to the *C. parapsilosis* complex.

Identification of fungal pathogens from clinical specimens at species level, particularly clinical isolates, is important to improve antifungal therapy and patient assistance. The 11 clinical isolates used in the present study were first identified based on morphological and physiological criteria as *C. parapsilosis*. As expected, the three species belonging to the *C. parapsilosis* complex were not distinguished by either morphological or physiological levels. Consequently, molecular methodologies must be applied to solve this problem. A PCR-based strategy using species-specific primers failed to correctly identify all the 11 clinical strains, because two of them (designated as 248 and 276) were indiscriminately amplified by two distinct pairs of primers. With this result in hands, we tested two PCR-based restriction endonuclease analysis centered on the amplification of (1) a *FKS1* region followed by an *EcoRI* digestion and (2) a *SADH* region followed by *BanI* digestion. Contradictory results were detected regarding the strains 248 and 276, whereas the remaining nine strains were identified as *C. parapsilosis sensu stricto*. Sequencing of the *D1/D2* gene region solved this doubt, showing 100% of sequence similarity among the clinical strains (248 and 276) and two reference strains of *C. orthopsilosis*. In time, the reference strains (*C. metapsilosis* – ATCC 96143, *C. orthopsilosis* – ATCC 96141 and *C. parapsilosis sensu stricto* – ATCC 22019) were correctly identified by all molecular methodologies applied in our study. Although the identification of *SADH*-RFLP methodology is widely used, Silva *et al.* (2009) demonstrated that this method can identify wrongly *C. metapsilosis* as *C. orthopsilosis* because of a missing *BanI* restriction site in those clinical strains. In the present work, we also showed that this approach can erroneously identify *C. orthopsilosis* as *C. parapsilosis sensu stricto*. Contrarily, the digestion of *FKS1* gene by the enzyme *EcoRI* showed 100% of concordance with sequencing of *ITS1/ITS2* region in the study conducted by Garcia-Effron *et al.* (2011) as well as herein by the two clinical strains incorrectly identify by both *SADH*-RFLP (Tavanti *et al.*, 2005) and PCR using species-specific primers (Asadzadeh *et al.*, 2009), reinforcing its promising application in the clinic arena.

Within the complex, *C. parapsilosis* remained to be the predominant species while *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* were recovered at a much lower incidence. Currently, global epidemiologic data indicate that *C. parapsilosis sensu stricto* represented 70.7–95.6% of the complex, while *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* corresponded to 4.4–20.4% and 0–9.3%, respectively (Lockhart *et al.*, 2008; Cantón *et al.*,

2011; Ge *et al.*, 2012). Despite the fact that the number of strains used was small, our data agree with the worldwide epidemiologic studies where the frequencies of isolation of these species have been found to be low (e.g. *C. orthopsilosis*) or even null (e.g. *C. metapsilosis*). Corroborating this finding, the absence of *C. metapsilosis* was reported by (1) Romeo *et al.* (2012) among 97 strains recovered from blood and venous central catheter tips, (2) Asadzadeh *et al.* (2009) among bloodstream ($n = 66$) and other clinical specimens ($n = 48$), (3) Hays *et al.* (2011) among 116 clinical strains from different anatomical sites, and (4) Tavanti *et al.* (2005, 2007) from various clinical sources ($n > 300$). The importance of *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* as human pathogens remains unknown; however, studies point to their significant involvement in human candidiasis (Lockhart *et al.*, 2008; Cantón *et al.*, 2011).

Pathogenic *Candida* species have developed a wide range of putative virulence factors to assist in their ability to colonize host tissues, cause disease, and overcome host defenses. Among them, extracellular secreted hydrolytic enzymes have gained considerable attention due to their potential roles in pathogenesis and as possible targets for future antimicrobial therapies. Proteases (Hube & Naglik, 2001; Braga-Silva & Santos, 2011), phospholipases (Ghannoum, 2000), esterases (Singh & Mukhopadhyay, 2012), phytases (Tsang, 2011), catalases (González-Párraga *et al.*, 2008), and hemolysins (Nayak *et al.*, 2013) not only facilitate the adherence, tissue/cell penetration, invasion, dissemination, and evasion of host immune responses, but also increases bioavailability of essential nutrients, which are usually in short supply. However, the molecular mechanisms of pathogenicity remain poorly explored for the species of the *C. parapsilosis* complex.

Regarding the production of hydrolytic enzymes, 100% of the strains studied herein produced extracellular protease, when cultured under aspartic protease inducible conditions (Hrusková-Heidingsfeldová *et al.*, 2009; Braga-Silva & Santos, 2011), most of which (13/14) showed very strong enzymatic activity with *Pz* values lower than 0.355. Extracellular protease production might be common for *C. parapsilosis* isolates of various clinical origins, especially those from skin (De Bernardis *et al.*, 1999). Secreted aspartic proteases (Saps) play a role in the virulence of pathogenic *Candida* spp. *C. parapsilosis* possesses three genes encoding these enzymes: *SAPP1*, *SAPP2*, and *SAPP3* (Hrusková-Heidingsfeldová *et al.*, 2009). Recently, Horváth *et al.* (2012) described that *SAPP1* gene was duplicated (*SAPP1a* and *SAPP1b*) in the genome of *C. parapsilosis* and acted as a classic virulence factor, because the deletion of both *SAPP1a* and *SAPP1b* genes significantly reduced the capacity of the fungus to grow in human serum as well as to survive inside the human macrophages. There have been contradictory findings in terms

of phospholipase and esterase activities in *C. parapsilosis*. For instance, Ge *et al.* (2012) showed that 90.5% of *C. parapsilosis* and 91.7% of *C. metapsilosis* isolates were phospholipase producers and no difference in phospholipase activity was observed between these two species. On the other hand, both species similarly displayed rare esterase activity, with only one *C. parapsilosis* and two *C. metapsilosis* isolates being positive. Shimizu *et al.* (1996) and Kantarcioglu & Yucel (2002) did not find phospholipase activity in their *C. parapsilosis* isolates. In our study, we detected differences in the frequency of lipolytic enzymes between the phospholipases and esterases of the species of the *C. parapsilosis* complex. No phospholipase-positive *C. parapsilosis* isolates were detected, while 92.9% strains were able to produce esterase. Several reasons have been postulated to explain the wide variation in the lipolytic activity of *C. parapsilosis* complex, including use of different media for enzymatic test and/or inherent biological variations among isolates (van Asbeck *et al.*, 2009; Ge *et al.*, 2012). Similarly, no consistent results were obtained concerning the hemolytic activity of clinical strains of *C. parapsilosis*. Luo *et al.* (2001) found that *C. parapsilosis* ($n = 5$ isolates) failed to demonstrate any hemolytic activity. França *et al.* (2011) reported that the source of *C. parapsilosis* isolates correlated with the ability to produce hemolytic activity, because isolates recovered from tracheal secretion had higher activity than blood isolates, but did not differ of nail/skin isolates. Overall, the majority of *C. parapsilosis* isolates ($n = 34$) produced weak hemolytic activity (França *et al.*, 2011). In accordance, all cutaneous clinical isolates tested herein showed weak ability to lysis the erythrocytes. Phytase is a phosphohydrolase that cleaves phytate in a stepwise manner to release inorganic phosphate and inositol, which are essential nutrients for all living cells (Lei & Porres, 2003). In *Candida* species, maintaining a supply of inositol and phosphate seems to be especially important for survival, propagation, and virulence (Olstorpe *et al.*, 2009; Tsang, 2011). Phytase-positive phenotype was identified in 11 of 14 strains (78.6%) belonging to the *C. parapsilosis* complex with a mean *Pz* of 0.456. Tsang reported that two of four strains (50%) of *C. parapsilosis* produced phytase with a mean *Pz* of 0.640. Catalase, which is an enzymatic scavenger of H_2O_2 , is presumed to be an important antioxidant defense in *Candida* species against neutrophils and macrophages (Lefkowitz *et al.*, 1996; Wysong *et al.*, 1998). For instance, deletion of the catalase gene in *C. albicans* was associated with increased susceptibility to leukocyte-mediated killing of organisms and to decreased virulence for mice in an experimental model of disseminated candidiasis (Wysong *et al.*, 1998). In different extents, all the *C. parapsilosis* strains used in the present study had the ability to breakdown H_2O_2 .

Other physiological factors believed to be important for fungal colonization including the physicochemical properties of the cell surface. Cell surface carbohydrates play critical roles in many fundamental fungal processes including interaction with cells and extracellular matrix components (Free, 2013). For instance, *Candida* cell surface mannan was found to participate in the adhesion to the epithelial cells, recognition by innate immune receptors, and development of pathogenicity (Shibata *et al.*, 2012). The amino sugar *N*-acetylglucosamine is the key component of chitin, a polysaccharide involved in important structural roles of cell wall. Interestingly, *N*-acetylglucosamine stimulates the human fungal pathogen *C. albicans* to induce the expression of virulence genes and a shift from growing as unicellular budding yeasts to instead forming multicellular filamentous hyphal cells (Konopka, 2012). In several fungal species, sialic acids are thought to function as antirecognition molecules eluding host immune system mechanisms (Alviano *et al.*, 1999). These multifunctional carbohydrate units, mannose/glucose, *N*-acetylglucosamine and sialic acid, were detected at the cell surface of all strains belonging to the *C. parapsilosis* complex in high ($\approx 90\%$), medium ($\approx 55\%$), and low ($\approx 7\%$) levels.

Cell surface hydrophobicity is recognized as a physical force playing a major role in the initial events leading to the adherence of *Candida* to inert surfaces (Klotz *et al.*, 1985). Studies have also shown that hydrophobic yeasts are more virulent than their hydrophilic counterparts (Hazen *et al.*, 1986). Our strains had elevated cell surface hydrophobicity with a mean of 95% as measured by a hydrocarbon assay method. In contrast, Panagoda & Samaranayake (1998) described that the relative cell surface hydrophobicity of 24 clinical isolates of *C. parapsilosis* varied considerably, ranging from 17.5% to 76.6% with a mean of 35.7%. Moreover, a strong positive correlation was observed between the cell length and the relative cell surface hydrophobicity of *C. parapsilosis* as well as the cell length and adhesion to acrylic surfaces. Also, the hydrophobic properties of *Candida* cells may depend on the changes in the glycosylation of the mannoproteins (Shibata *et al.*, 2012). Corroborating this statement, our studied fungal strains possessed elevated cell surface hydrophobicity and high expression of mannose-rich glycoconjugates.

It is well known that *C. parapsilosis* is associated with pronounced capacity to adhere to plastic surfaces and several other implanted devices and, consequently, to the development of candidemia related to catheters (Douglas, 2003). Our results revealed that the clinical strains of *C. parapsilosis* presented an immense variation regarding the ability to adhere to both polystyrene and glass, showing typical intrastain differences. Overall, the strains showed

predilection to adhere to plastic (mean of 14 strains was 81 fungi per microscopic field) compared to glass (mean of 14 strains was 45 fungi per microscopic field) as well as the number of pseudohyphae was higher than yeasts. Similarly, larger fungal cells (pseudohyphae) of *C. parapsilosis* bound more avidly to acrylic surface (Panagoda & Samaranayake, 1998). The environmental signals that trigger pseudohyphal differentiation and the signaling pathways that transduce these signals in *C. parapsilosis* are not yet well known. We also demonstrated that filamentation was positively correlated with the adhesion of *C. parapsilosis* complex strains to either polystyrene or glass substrates. Contrarily, different surface glycoconjugates must be involved in the initial (2 h) adhesive steps, because the expression of mannose-/glucose-rich glycoconjugates correlated strongly with interaction to glass as well as the expression of *N*-acetylglucosamine correlated with polystyrene adherence. However, these glycoconjugates did not influence the biofilm formation in strains belonging to the *C. parapsilosis* complex, because all of them were able to produce similar biofilm concerning both biomass and cellular viability parameters after 48 h of interaction with polystyrene. Similar biofilm architectures, consisting of different morphotypes such as oval/rounded yeasts, elongated cells, and pseudohyphae as well as a thin and irregular extracellular matrix, were clearly developed on plastic or glass in all strains of *C. parapsilosis* complex and detected by both light and scanning electron micrographies. These results concur with the findings of some authors (Kuhn *et al.*, 2002; Laffey & Butler, 2005; Oliveira *et al.*, 2010). For instance, Lattif *et al.* (2010) reported that clinical isolates of *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis* were able to form biofilm with similar surface topography and architecture on abiotic surface (silicone disks). Biofilm formation is considered a virulence factor due to the ability to confer resistance to antifungal therapy and protect the fungal cells from host immune responses (Tumbarello *et al.*, 2007). Tavanti *et al.* (2010) showed that biofilm production after 24 h of interaction with plastic substrate and protease secretion was negatively correlated in *C. parapsilosis sensu strictu* strains isolated from different geographical regions and body sites. Those authors also proposed that protease activity plays a role in detachment and release from a mature biofilm, via degradation of *C. parapsilosis* adhesins and/or extracellular matrix components. Justifying this hypothesis, our data revealed that mature biofilm formed in plastic substrate by *C. parapsilosis* strains positively correlated with protease production.

For *Candida* to persist in the host and induce infectious process, it must be able to adhere and invade to the biotic surfaces as host cells, tissues, and extracellular matrix barriers (Sundstrom, 2002). *Candida parapsilosis* was able to interact with different mammalian cell

lineages, in different extents, and in most cases in a strain-dependent manner (reviewed in Nosek *et al.*, 2009; van Asbeck *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012). To exemplify, Panagoda *et al.* (2011) demonstrated a significant ($P < 0.0001$) intraspecies variation in adherence among isolates of *C. parapsilosis* to human buccal epithelial cells ranging from 23.5 to 154.3 fungi per 50 epithelial cells. Our results corroborated these findings, because the fungal strains had the ability to interact with both fibroblasts (association indexes ranging from 45.3% to 95.3%) and macrophages (association indexes ranging from 39.0% to 99.6%). Moreover, a typical strain-dependent variation regarding the association index was clearly reported after 2 h of contact, in which most of the fungi was located inside the mammalian cells. Adding knowledge about the interaction processes between *C. parapsilosis* complex and host cells, our data revealed that surface glycoconjugates containing both mannose and glucose were relevant to adhesive events with both fibroblast and macrophage cells. Additionally, *N*-acetylglucosamine also positively favored the binding of fungal strains with macrophages. Based on the saccharide specificity of the agglutinin UEA I, Lima-Neto *et al.* (2011) suggested that L-fucose residues on cell surface glycoconjugates of *C. parapsilosis* strains ($n = 12$) represented recognition molecules for interactions between yeasts and epithelial cells ($r = 0.6985$, $P = 0.0045$). The esterase activity of *C. parapsilosis* complex was linked to interaction with both fibroblast and macrophage cells. The role of lipases (esterases and/or phospholipases) in fungi capable of causing cutaneous and subcutaneous mycoses is probably to hydrolyze fats in the subcutis and the fatty acid residues used as a nutrient source by the invading fungus. Paraje *et al.* (2008) showed that a 70-kDa extracellular lipase purified from *C. albicans* directly induced cytotoxicity and promoted the deposition of lipid droplets in the cytoplasm of macrophages and hepatocytes.

According to the studies conducted *in vitro* with reconstituted human tissue cultures derived from oral and epidermal epithelium cells, *C. orthopsilosis* isolates caused similar damage as *C. parapsilosis*, while *C. metapsilosis* was less virulent (Gacser *et al.*, 2007). In a similar way, Orsi *et al.* (2010) showed that *C. metapsilosis* isolates were more susceptible to microglia-mediated antifungal activity, as compared with those of *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis*. Also, Bertini *et al.* (2013) described that while *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* strains showed similar adhesion capabilities, *C. metapsilosis* isolates displayed a significantly lower ability to adhere to human buccal epithelial cells. Differences in virulence factors between species could not be determined at a statistically significant level because of the small numbers of the newly described isolates. However, some findings could be extrapolated

taking into account that all samples belong to the same fungal *C. parapsilosis* complex. In this sense, we reinforce the heterogeneity of these fungal complex regarding morphological, biochemical, and genetic features. Collectively, growth pattern, production of hydrolytic enzymes, expression/exposition of surface glycoconjugates, adhesion to abiotic substrates, differentiation process, biofilm formation, and interaction with mammalian cells were clearly noticed as a typical strain-specific fashion.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Brazilian Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Automated sequencing was performed using the genomic platform/DNA sequencing at Fundação Oswaldo Cruz – PDTIS/FIOCRUZ (RPT01A), Brazil.

References

- Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* **105**: 121–126.
- Aktas E, Yigit N & Ayyildiz A (2002) Esterase activity in various *Candida* species. *J Int Med Res* **30**: 322–324.
- Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, Alonso-Tarres C, Rodriguez-Tudela JL & Pahissa A (2006) Epidemiology, risk factors and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infection: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* **44**: 1681–1685.
- Alviano CS, Travassos LR & Schauer R (1999) Sialic acids in fungi: a minireview. *Glycoconj J* **9**: 545–554.
- Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N & Khan ZU (2009) Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med Microbiol* **58**: 745–752.
- Bertini A, De Bernardis F, Hensgens LA, Sandini S, Senesi S & Tavanti A (2013) Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *Int J Med Microbiol* **2**: 98–103.
- Braga-Silva LA & Santos ALS (2011) Aspartic protease inhibitors as potential anti-*Candida albicans* drugs: impacts on fungal biology, virulence and pathogenesis. *Curr Med Chem* **18**: 2401–2419.
- Braga-Silva LA, Mogami SS, Valle RS, Silva-Neto ID & Santos ALS (2010) Multiple effects of amprenavir against *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **10**: 221–224.
- Cantón E, Pemán J, Quindós G *et al.* (2011) Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular

- identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 5590–5596.
- Chaka W, Scharringa J, Verheul AF, Verhoef J, Van Strijp AG & Hoepelman IM (1995) Quantitative analysis of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by human peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* **2**: 753–759.
- Das I, Nightingale P, Patel M & Jumaa P (2011) Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. *Int J Infect Dis* **15**: e759–e763.
- De Bernardis F, Mondello F, San Millan R, Ponton J & Cassone A (1999) Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* **37**: 3481–3486.
- Douglas LJ (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **11**: 30–36.
- França EJ, Furlaneto-Maia L, Quesada RM, Favero D, Oliveira MT & Furlaneto MC (2011) Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. *Mycoses* **54**: e44–e51.
- Free SJ (2013) Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet* **81**: 33–82.
- Gacser A, Schafer W, Nosanchuk JS, Salomon S & Nosanchuk JD (2007) Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol* **44**: 1336–1341.
- Garcia-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E & Perlin DS (2011) Assessment of two new molecular methods for identification of *Candida parapsilosis sensu lato* species. *J Clin Microbiol* **49**: 3257–3261.
- Ge YP, Lu GX, Shen YN & Liu WD (2012) *In vitro* evaluation of phospholipase, proteinase, and esterase activities of *Candida parapsilosis* and *Candida metapsilosis*. *Mycopathologia* **172**: 429–438.
- Ghannoum MA (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol* **13**: 122–143.
- Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodrigues D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL & Cuenca-Estrella M (2008) Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 1506–1509.
- González-Párraga P, Sánchez-Fresneda R, Martínez-Esparza M & Argüelles JC (2008) Stress responses in yeasts: what rules apply? *Arch Microbiol* **189**: 293–296.
- Haynes K (2001) Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* **9**: 591–596.
- Hays C, Duhamel C, Cattoir V & Bonhomme J (2011) Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis. *J Med Microbiol* **60**: 477–480.
- Hazen KC, Plotkin BJ & Klimas DM (1986) Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Infect Immun* **54**: 269–271.
- Horváth P, Nosanchuk JD, Hamari Z, Vágvölgyi C & Gácsér A (2012) The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in *Candida parapsilosis* virulence. *J Infect Dis* **205**: 923–933.
- Hrusková-Heidingsfeldová O, Dostál J, Majer F, Havlíková J, Hradilek M & Pichová I (2009) Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. *Biol Chem* **390**: 259–268.
- Hube B & Naglik J (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* **147**: 1997–2005.
- Kantarcioglu AS & Yuçel A (2002) Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* **45**: 160–165.
- Klotz SA, Drutz DJ & Zajic JE (1985) Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun* **50**: 97–101.
- Konopka JB (2012) *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) functions in cell signaling. *Scientifica (Cairo)* **1**: 489208.
- Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK & Ghannoum MA (2002) Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* **70**: 878–888.
- Laffey SF & Butler G (2005) Phenotype switching affects biofilm formation by *C. parapsilosis*. *Microbiology* **151**: 1073–1081.
- Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart SR, Diekema DJ, Pfaller MA & Ghannoum MA (2010) Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol* **300**: 265–270.
- Lefkowitz SS, Gelderman MP, Lefkowitz DL, Moguilevsky N & Bollen A (1996) Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by macrophages exposed to myeloperoxidase. *J Infect Dis* **173**: 1202–1207.
- Lei XG & Porres JM (2003) Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol Lett* **25**: 1787–1794.
- Lima-Neto RG, Beltrão EIC, Oliveira PC & Neves RP (2011) Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses* **54**: 23–29.
- Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA & Diekema DJ (2008) Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* **46**: 2659–2664.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–275.

- Luo G, Samaranyake LP & Yau JY (2001) *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *J Clin Microbiol* **39**: 2971–2974.
- Nayak AP, Green BJ & Beezhold DH (2013) Fungal hemolysins. *Med Mycol* **51**: 1–16.
- Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A & Tomaska L (2009) Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet* **55**: 497–509.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A & Colombo AL (2010) Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis* **51**: 561–570.
- Oliveira MT, Specian AF, Andrade CG, França EJ, Furlaneto-Maia L & Furlaneto MC (2010) Interaction of *Candida parapsilosis* isolates with human hair and nail surfaces revealed by scanning electron microscopy analysis. *Micron* **41**: 604–608.
- Olstorpe M, Schnürer J & Passoth V (2009) Screening of yeast strains for phytase activity. *FEMS Yeast Res* **9**: 478–488.
- Orsi CF, Colombari B & Blasi E (2010) *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the ‘*C. parapsilosis*’ complex. *Med Mycol* **48**: 1024–1033.
- Panagoda GJ & Samaranyake LP (1998) The relationship between the cell length, adhesion to acrylic and relative cell surface hydrophobicity of *Candida parapsilosis*. *Med Mycol* **36**: 373–378.
- Panagoda GJ, Ellepola AN & Samaranyake LP (2011) Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* **44**: 29–35.
- Paraje MG, Correa SG, Renna MS, Theumer M & Sotomayor CE (2008) *Candida albicans*-secreted lipase induces injury and steatosis in immune and parenchymal cells. *Can J Microbiol* **54**: 647–659.
- Peeters E, Nelis HJ & Coenye T (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* **72**: 157–165.
- Pfaller MA & Diekema DJ (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133–163.
- Price MF, Wilkinson ID & Gentry LO (1982) Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* **20**: 7–14.
- Reinhart H, Muller G & Sobel JD (1985) Specificity and mechanism of *in vitro* adherence of *Candida albicans*. *Ann Clin Lab Sci* **15**: 406–413.
- Romeo O, Delfino D, Costanzo B, Cascio A & Criseo G (2012) Molecular characterization of Italian *Candida parapsilosis* isolates reveals the cryptic presence of the newly described species *Candida orthopsilosis* in blood cultures from newborns. *Diagn Microbiol Infect Dis* **72**: 234–238.
- Rüchel J, Tegeler R & Trost MA (1982) Comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* **20**: 233–244.
- Sangetha S, Zuraini Z, Suryani S & Sasidharan S (2009) *In situ* TEM and SEM studies on the antimicrobial activity and prevention of *Candida albicans* biofilm by *Cassia spectabilis* extract. *Micron* **40**: 439–443.
- Shibata N, Kobayashi H & Suzuki S (2012) Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **88**: 250–265.
- Shimizu MT, Almeida NQ, Fantinato V & Unterkircher CS (1996) Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. *Mycoses* **39**: 161–167.
- Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C & Rodrigues AG (2009) Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* **47**: 2392–2397.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW & Azeredo J (2012) *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 288–305.
- Singh AK & Mukhopadhyay M (2012) Overview of fungal lipase: a review. *Appl Biochem Biotechnol* **166**: 486–520.
- Sundstrom P (2002) Adherence in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**: 461–469.
- Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC & Odds FC (2005) *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* **43**: 284–292.
- Tavanti A, Hensgens LAM, Ghelardi E, Campo M & Senesi S (2007) Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol* **45**: 1455–1462.
- Tavanti A, Hensgens LA, Mogavero S, Majoros L, Senesi S & Campa M (2010) Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis sensu strictu* strains isolated from different geographic regions and body sites. *BMC Microbiol* **10**: 203–213.
- Trofa D, Gácsér A & Nosanchuk JD (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* **21**: 606–625.
- Tsang PW (2011) Differential phytate utilization in *Candida* species. *Mycopathologia* **172**: 473–479.
- Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM et al. (2007) Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictor of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol* **45**: 1843–1850.
- van Asbeck EC, Clemons KV & Stevens DA (2009) *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol* **35**: 283–309.
- Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW & Diamond RD (1998) Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun* **66**: 1953–1961.

Comparison of Commercial Methods and the CLSI Broth Microdilution to Determine the Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis* Complex Bloodstream Isolates from Three Health Institutions in Rio de Janeiro, Brazil

Maria Helena G. Figueiredo-Carvalho · Leonardo S. Barbedo ·
Manoel M. E. Oliveira · Fábio Brito-Santos · Rodrigo Almeida-Paes ·
Rosely M. Zancopé-Oliveira

Received: 24 January 2014 / Accepted: 1 June 2014 / Published online: 22 June 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract Two commercial methods, the Etest and Vitek 2, were compared with the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method to determine the susceptibility of *Candida parapsilosis* complex to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, voriconazole, and itraconazole. One-hundred bloodstream isolates of *C. parapsilosis* complex from three hospitals in Rio de Janeiro city, Brazil, between 1998 and 2006 were analyzed. *C. parapsilosis* sensu stricto (61 %) was the predominant species, followed by *C. orthopsilosis* (37 %) and *C. metapsilosis* (2 %). Most isolates were susceptible to the tested drugs. However, one *C. parapsilosis* sensu stricto isolate was considered resistant for amphotericin B. The essential agreement was 100 % between the methods, except for itraconazole (96.3 %). The categorical agreement varied for fluconazole and itraconazole by Etest and for amphotericin B and fluconazole by Vitek 2. This study reinforces the suitability of the commercial methods in routine clinical microbiology laboratories for antifungal susceptibility testing.

Keywords Antifungals · *Candida metapsilosis* · *Candida orthopsilosis* · *Candida parapsilosis* · Fungemia · Rio de Janeiro

Introduction

Candida parapsilosis has emerged as an important cause of invasive fungal infections, especially in neonates and immunocompromised patients, and has been associated with cases of fungemia in various parts of world in recent years [1–5]. In fact, *C. parapsilosis* is formed by a complex the three species phenotypically indistinguishable, but genetically heterogeneous named *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* [6].

The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) has standardized the broth microdilution (BMD) reference method for antifungal susceptibility testing against *Candida* spp. [7], and most recently, new species-specific clinical breakpoints (CBPs) for in vitro antimicrobial susceptibility testing and epidemiological cutoff values (ECVs) were established for 11 *Candida* species including *C. parapsilosis* sensu stricto and *C. orthopsilosis* using the CLSI BMD method in order to differentiate wild-type (WT) strains (those without mutational or acquired resistance mechanisms) from non-WT strains (those having mutational or acquired resistance mechanisms) for amphotericin B, flucytosine, the azoles (fluconazole,

M. H. G. Figueiredo-Carvalho · L. S. Barbedo ·
M. M. E. Oliveira · F. Brito-Santos ·
R. Almeida-Paes · R. M. Zancopé-Oliveira (✉)
Laboratório de Micologia, Instituto de Pesquisa Clínica
Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida
Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21045-900,
Brazil
e-mail: rosely.zancope@ipecc.fiocruz.br

itraconazole, posaconazole, and voriconazole), and echinocandins (anidulafungin, caspofungin, and micafungin) [8, 9].

Commercial methods have also been developed to optimize the antifungal susceptibility testing. They include Etest strips (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), Sensititre YeastOne (Trek Diagnostic Systems Ltd., East Grinstead, England), and the fully automated antifungal susceptibility Vitek 2 system (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) [10–12].

Knowing the profile of drugs, antifungal susceptibility to *C. parapsilosis* complex has been necessary due to the increased frequency of these isolates associated with episodes of fungemia, and especially the emergence of the phenomenon of resistance [1, 4].

Therefore, the aim of this study was to evaluate and compare two commercial antifungal susceptibility methods, the Etest and Vitek 2 system, in parallel with the CLSI BMD method and apply them to the *C. parapsilosis* complex species. To achieve this, clinical isolates of the *C. parapsilosis* complex isolated primarily from patients with fungemia were tested against amphotericin B, caspofungin, fluconazole, voriconazole, and itraconazole.

Materials and Methods

Clinical Isolates

One-hundred clinical *C. parapsilosis* complex strains were included in this study, isolated from the bloodstream of critically ill patients who had been admitted into three different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil, between 1998 and 2006. *Candida* species identification was performed using standard procedures, consisting of isolation on CHROMagar *Candida* and biochemical analysis with the Vitek 2 system or the API 20 C AUX (bioMérieux, France). The fungi then were stored at -70°C in the fungal collection of the Laboratório de Micologia/Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Reference Strains

Candida albicans (ATCC 18804), *C. tropicalis* (ATCC 13803), *C. krusei* (ATCC 6258) and *C.*

parapsilosis (ATCC 22019) were quality control strains for CHROMagar *Candida* selective medium (Difco, Becton, Dickinson and Company, USA). The latter two species were also used as controls for the antifungal susceptibility tests. *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. orthopsilosis* (ATCC 96141), and *C. metapsilosis* (ATCC 96143) were used as controls for the molecular identification method.

Molecular Identification

Yeast cells were grown on Sabouraud dextrose agar (Difco, Becton, Dickinson and Co.), and genomic DNA was extracted using the Gentra[®] Puregene[®] Yeast/Bact. Kit (Qiagen[®], MD, USA), according to the manufacturer's protocol.

The D1/D2 region of the 28S rDNA gene was sequenced. The amplified product was obtained with 50 ng of DNA, 10 pmol of each primer [NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') and NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')], at an annealing temperature of 60°C in the reaction as described previously by Asadzadeh et al. [13]. The amplicons obtained were purified with the QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen[®]) according to the manufacturer's protocol and sent to the Platform for DNA Sequencing at Fundação Oswaldo Cruz—PDTIS/Fiocruz, Brazil [14]. Sequences were edited using the Sequencher 4.9 software and compared by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) with sequences available from NCBI/GenBank.

Antifungal Agents

Amphotericin B, caspofungin, fluconazole, voriconazole, and itraconazole (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA) were tested. For the CLSI method, stock and diluted drug solutions were prepared according to the CLSI M27-A3 document [7].

Etest strips were obtained from bioMérieux SA (Marcy-l'Etoile, France) in concentrations ranging from 0.002 to 32 $\mu\text{g/ml}$ of amphotericin B, caspofungin, voriconazole, itraconazole and from 0.016 to 256 $\mu\text{g/ml}$ of fluconazole. The strips were stored at -20°C .

AST-YS06 Vitek 2 cards were obtained from bioMérieux SA. Drug concentrations in this susceptibility test card ranged from 1 to 32 $\mu\text{g/ml}$ of

amphotericin B, from 1 to 8 µg/ml of caspofungin, from 1 to 16 µg/ml of fluconazole, and from 0.5 to 8 µg/ml of voriconazole. The cards were stored at 2–8 °C until use. The AST-YS06 Vitek 2 card does not contain itraconazole.

All tests were performed in duplicate and in case of discrepancies were repeated once more.

CLSI BMD Method

The BMD reference method was performed according to the CLSI M27-A3 document [7], with some modifications: Flat-bottom 96-well plates were used (Jet Biofil, Guangdong, China), and MICs were determined using a microplate reader (Epoch, Biotek) at 530 nm after 24 h incubation at 35 °C. MIC values for caspofungin, fluconazole, voriconazole, and itraconazole were defined as the lowest concentration of antifungal agent that inhibited growth by 50 % compared with the drug-free control well. For amphotericin B, the MIC value was defined as the lowest drug concentration able to inhibit 100 % of yeast growth.

Etest

The Etest was performed according to the manufacturer's instructions (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France). The RPMI 1640 plates were incubated at 35 °C and read 24 h later. The MIC was read at the point where the border of the elliptical zone of inhibition intersected with the scale on the antifungal strip.

Vitek 2 System

The Vitek 2 system was setup according to the manufacturer's instructions (bioMérieux SA). The inoculum of each organism to be tested was placed on the instrument with a susceptibility card. MICs were measured spectrophotometrically after various incubation times, which depended on the growth control of each isolate tested, and were expressed in µg/ml.

Analysis of Results

Comparisons between methods were made using the criteria of essential agreement (EA) and categorical

agreement (CA) according to the US Food and Drug Administration (FDA). Discrepancies of more than two dilutions (two wells) among the MIC endpoints were used to calculate the EA, and the CA was considered when the MIC values were within the same interpretative categories [i.e., susceptible (S), susceptible dose dependent (SDD), Intermediate (I), or resistant (R)] because there are defined breakpoints by CLSI BMD method for antifungal agents. Errors were classified as “minor error” (MiE), “major error” (ME), or “very major error” (VME). Discrepancies were considered to be MiE if an isolate was classified as S or R by the CLSI BMD method and SDD by the Etest or Vitek 2 system, or when an isolate was SDD by the CLSI BMD method and S or R by the Etest or Vitek 2 system. The ME class occurred when an isolate was classified as S by the CLSI BMD method and R by the Etest or Vitek 2 system (false resistance). The VME class was defined as an isolate that was classified as R by the CLSI BMD method and S by the Etest or Vitek 2 system (false sensitivity). Interpretative criteria for amphotericin B have not been established, but for comparison, isolates that were inhibited by amphotericin B with MIC of ≤ 1 µg/ml were considered susceptible [7]. The new species-specific CBPs were used for caspofungin (≤ 2 µg/ml S, 4 µg/ml I, and ≥ 8 µg/ml NS), fluconazole (≤ 2 µg/ml S, 4 µg/ml SDD, and ≥ 8 µg/ml R), and voriconazole (≤ 0.12 µg/ml S, 0.25–0.5 µg/ml I, and ≥ 1 µg/ml R) for *C. parapsilosis* sensu stricto to obtain CA percentages between the MICs values determined with the Etest or Vitek system and the CLSI BMD method. CLSI has not assigned CBPs for amphotericin B and itraconazole and *C. parapsilosis* sensu stricto and recommends the ECV of 2 µg/ml and 0.5 µg/ml, respectively, to be used to differentiate WT (MIC \leq ECV) from non-WT (MIC $>$ ECV) strains of this species. Due to the lack of CBPs, the ECVs for caspofungin (0.5 µg/ml), fluconazole (2 µg/ml), and voriconazole (0.06 µg/ml) were used for *C. orthopsilosis* to categorize isolates this species as WT or non-WT [9, 15]. Descriptive statistical analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 17.0, for Windows®, to obtain the MIC range, MIC₅₀ and MIC₉₀ values, and geometric mean. The MIC₅₀ and MIC₉₀ values correspond to the minimal inhibitory concentration of the antifungal able to inhibit the growth of 50 and 90 % of all fungal isolates, respectively.

Table 1 Values of minimal inhibitory concentrations, geometric mean, and percentage of essential agreement by Etest and Vitek 2 methods compared to the CLSI broth microdilution(BMD) of 100 clinical *Candida parapsilosis* complex isolates from patients with fungemia in the city of Rio de Janeiro between 1998 and 2006 to amphotericin B and caspofungin

Species (no. of isolates)	Method	Amphotericin B ($\mu\text{g/ml}$)				Caspofungin ($\mu\text{g/ml}$)			
		MIC range	MIC ₅₀ /MIC ₉₀	GM	% EA	MIC range	MIC ₅₀ /MIC ₉₀	GM	% EA
<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto (61)	Etest	0.125–1.5	0.5/0.75	0.4	100	0.19–2	0.75/1	0.7	100
	Vitek 2	≤ 0.25 – ≤ 1	0.5/ ≤ 1	0.4	100	≤ 0.25 –2	0.5/ ≤ 1	0.6	100
	CLSI BMD	0.25–2	0.5/1	0.5		0.25–2	1/1	0.8	
<i>C. orthopsilosis</i> (37)	Etest	0.125–0.75	0.38/0.5	0.3	100	0.19–1	0.5/0.75	0.5	100
	Vitek 2	≤ 0.25 –0.5	0.5/0.5	0.4	100	≤ 0.25 –0.5	≤ 0.25 / ≤ 0.25	0.3	100
	CLSI BMD	0.25–0.5	0.5/0.5	0.4		0.25–1	0.5/1	0.5	
<i>C. metapsilosis</i> (2)	Etest	0.25–0.38	–	0.3	100	0.38–0.5	–	0.4	100
	Vitek 2	≤ 0.25 –0.5	–	0.3	100	≤ 0.25	–	0.3	100
	CLSI BMD	0.25	–	0.3		0.5	–	0.5	

MIC₅₀/MIC₉₀ minimal inhibitory concentration of the antifungal able to inhibit the growth of 50 and 90 % of fungal isolates, respectively, GM geometric mean of the minimal inhibitory concentrations values, EA essential agreement

Results

The 100 clinical isolates yielded pinkish-white colonies with a smooth texture in the chromogenic CHROMagar *Candida* medium, and contamination was not detected. The average probability of these isolates belonging to the *C. parapsilosis* complex according to their biochemical identification was 96.5 and 99.5 % for Vitek 2 and API 20C AUX, respectively. The molecular identification by DNA sequencing of the D1/D2 region of the 28S rDNA gene characterized all 100 clinical isolates: 61 isolates were identified as *C. parapsilosis* sensu stricto, 37 as *C. orthopsilosis*, and two as *C. metapsilosis*. These clinical isolates showed 98–100 % sequence similarity when compared with available sequences from NCBI/GenBank (*C. parapsilosis* sensu stricto JN091166.1; *C. orthopsilosis* FM172988.1 and FM172989.1; and *C. metapsilosis* FJ515255.1).

For the Etest and CLSI BMD methods, all isolates grew well enough to be read after 24 h, while the final results from the automated Vitek 2 system were available between 13 and 22 h.

The in vitro antifungal susceptibilities of the *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* isolates that were determined by the three methods are summarized in Table 1, for amphotericin B and caspofungin, and Table 2, for azoles. *C. parapsilosis* sensu stricto isolates exhibited higher MIC values for amphotericin B and caspofungin than

C. orthopsilosis and *C. metapsilosis* isolates. The *C. orthopsilosis* isolates presented higher MIC values for azoles than the other two species of the *C. parapsilosis* complex. *C. metapsilosis* isolates exhibited lower MIC values for all of the drugs that were tested. These observations were consistent among the three antifungal susceptibility testing methods.

Candida metapsilosis was susceptible to all five antifungal agents, as determined in the three methods. Although susceptible to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, and voriconazole, two *C. orthopsilosis* isolates exhibited MICs of 4 and 8 $\mu\text{g/ml}$ for fluconazole according to the Vitek 2 system, but MICs of 1 and 2 $\mu\text{g/ml}$ by the Etest and CLSI BMD methods. Three other *C. orthopsilosis* isolates exhibited a MIC of 1 $\mu\text{g/ml}$ for caspofungin by the Etest and CLSI BMD, but MICs of 0.25 $\mu\text{g/ml}$ by the Vitek 2 system. For itraconazole, 33 of the *C. orthopsilosis* isolates were classified as susceptible, and four exhibited dose-dependent susceptibility in the Etest method, whereas all were susceptible according to the CLSI BMD method. Overall, the *C. parapsilosis* sensu stricto isolates (61) were susceptible to voriconazole. For fluconazole, 60 of the *C. parapsilosis* sensu stricto isolates were susceptible in the three methods and a single isolate exhibited dose-dependent susceptibility by the Etest and was susceptible by CLSI BMD method. For itraconazole, 59 of the *C. parapsilosis* sensu stricto isolates were susceptible in the three methods and two isolates exhibited dose-dependent

Table 2 Values of minimal inhibitory concentrations, geometric mean, and percentage of essential agreement by Etest and Vitek 2 methods compared to the CLSI broth microdilution (BMD) of 100 clinical *Candida parapsilosis* complex isolates from patients with fungemia in the city of Rio de Janeiro between 1998 and 2006 to azoles

Species (no. of isolates)	Method	Fluconazole (µg/ml)			Voriconazole (µg/ml)			Itraconazole (µg/ml)		
		MIC range	MIC ₅₀ /MIC ₉₀	%EA	MIC range	MIC ₅₀ /MIC ₉₀	%EA	MIC range	MIC ₅₀ /MIC ₉₀	%EA
<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto (61)	Etest	0.094–4	0.25/0.5	0.3	0.006–0.064	0.012/0.016	0.01	0.016–0.25	0.094/0.125	0.08
	Vitek 2	≤1–2	≤1/2	1.1	≤0.12	≤0.12/≤0.12	≤0.12	ND	ND	ND
	CLSI BMD	0.25–2	0.5/1	0.4	0.015–0.06	0.015/0.03	0.02	0.015–0.12	0.12/0.12	0.08
<i>C. orthopsilosis</i> (37)	Etest	0.25–2	0.5/0.75	0.5	0.008–0.064	0.016/0.032	0.02	0.016–0.25	0.125/0.125	0.1
	Vitek 2	≤1–8	≤1/≤1	1.1	≤0.12	≤0.12/≤0.12	≤0.12	ND	ND	ND
	CLSI BMD	0.25–2	0.5/0.5	0.5	0.015–0.03	0.015/0.03	0.02	0.03–0.12	0.12/0.12	0.1
<i>C. metapsilosis</i> (2)	Etest	0.125–0.25	-	0.2	0.008–0.012	-	0.01	0.094	-	0.09
	Vitek 2	≤1	-	≤1	≤0.12	-	≤0.12	ND	ND	ND
	CLSI BMD	0.25–0.5	-	0.4	0.015	-	0.015	0.06	-	0.06

MIC₅₀/MIC₉₀ minimal inhibitory concentration of the antifungal able to inhibit the growth of 50 and 90 % of fungal isolates, respectively, GM geometric mean of the minimal inhibitory concentrations values, EA essential agreement, ND not done

susceptibility by the Etest and were susceptible by CLSI BMD method. The same isolate that showed dose-dependent susceptibility to fluconazole also showed dose-dependent susceptibility to itraconazole. For amphotericin B, 60 of the *C. parapsilosis* sensu stricto isolates possessed a MIC of ≤1 µg/ml and a single isolate presented a MIC of 1.5, 1, and 2 µg/ml by the Etest, Vitek 2 system, and BMD methods, respectively. All 61 of the *C. parapsilosis* sensu stricto isolates were susceptible to caspofungin, but three isolates showed a MIC of 2 µg/ml in the three methods.

In the absence of species-specific CBPs values, all isolates of *C. parapsilosis* sensu stricto were classified as WT for amphotericin B (MIC ≤ 2 µg/ml) and itraconazole (MIC ≤ 0.5 µg/ml) using ECVs. However, three of the *C. parapsilosis* sensu stricto isolates showed MIC > ECV (MIC > 1 µg/ml) and were classified as non-WT for caspofungin in the three methods. Three *C. orthopsilosis* isolates were classified as non-WT for caspofungin (MIC > 0.5 µg/ml) by the Etest and CLSI BMD. The only major discrepancy in the entire study was observed for *C. orthopsilosis* and caspofungin wherein three isolates were categorized as WT (MIC < 0.5 µg/ml) by the Vitek 2 system and as non-WT (MIC > 0.5 µg/ml) by Etest and CLSI BMD methods. All isolates of *C. orthopsilosis* were categorized as WT for voriconazole (MIC ≤ 0.06 µg/ml) based on ECVs in the three methods. For fluconazole, a major discrepancy was found which resulted from a single isolate of *C. parapsilosis* sensu stricto which was classified as non-WT for this drug (MIC > 2 µg/ml) by Etest and as WT (MIC ≤ 2 µg/ml) by the Vitek 2 system and CLSI BMD methods. A further two *C. orthopsilosis* isolates were classified as non-WT for fluconazole (MIC > 2 µg/ml) by the Vitek 2 system and as WT (MIC ≤ 2 µg/ml) by both Etest and CLSI BMD methods.

When the Etest and the Vitek 2 system’s results were compared with the results of the CLSI BMD method, *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* isolates exhibited an EA of 100 % for all drugs, except in the case of *C. orthopsilosis* for itraconazole, which by Etest possessed an EA of 96.3 %, due to a single isolate that exhibited an MIC value that was greater than two dilutions apart.

The three species possessed a CA of 100 % for caspofungin and voriconazole, when the Etest and

Vitek 2 system's results were compared with the CLSI BMD method. Results with the Etest method and *C. parapsilosis* sensu stricto isolates revealed a CA of 98.6 and 97.3 % for fluconazole and itraconazole, respectively. Consequently, an MiE of 1.4 and 2.8 % was calculated resulting from a single isolate classified as susceptible dose dependent for fluconazole and two isolates of *C. parapsilosis* sensu stricto classified as susceptible dose dependent for itraconazole by the Etest method, but susceptible by the CLSI BMD method. We also found, using the Etest method, that *C. orthopsilosis* isolates exhibited a CA of 85.2 % for itraconazole. Although no ME or VME occurred, an MiE of 14.8 % was calculated resulting from four isolates classified as susceptible dose dependent by the Etest method, but susceptible by the CLSI BMD method. Against itraconazole, *C. metapsilosis* isolates exhibited a 100 % CA, when the Etest method was compared with the CLSI BMD method. No discrepancies were observed when Etest results were compared with those of the CLSI BMD method for the three *C. parapsilosis* complex species and amphotericin B; all three exhibited 100 % CA. However, for amphotericin B, when Vitek 2 results for *C. parapsilosis* sensu stricto isolates were compared with the results obtained using the CLSI BMD method, the CA was 98.6 %, because a single isolate classified as susceptible by Vitek 2 was considered resistant by the CLSI BMD method.

Discussion

The comparison between the three methods has been performed involving 205 *Candida* spp, including *C. parapsilosis* [16]. Moreover, there are few data regarding clinical isolates of the *C. parapsilosis* complex in the municipality of Rio de Janeiro. To our knowledge, this is the first study that compare two commercial methods, the Etest and Vitek 2 systems, with the CLSI BMD reference method for in vitro antifungal susceptibility testing of clinical *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* isolates against the antifungal agents amphotericin B, caspofungin, fluconazole, voriconazole, and itraconazole, thus presenting the antifungal susceptibility of these species in Rio de Janeiro, Brazil.

All 100 isolates included in our study were first identified by morphological and biochemical methods

as members of the *C. parapsilosis* complex and then subjected to molecular analysis. *C. parapsilosis* sensu stricto was predominant (61 %), followed by *C. orthopsilosis* (37 %), and *C. metapsilosis* (2 %). The predominance of those species is in agreement with previous studies in Brazil and in other countries that characterized the *C. parapsilosis* complex [17–19]. Additionally, we believe that these species exhibit geographic distribution patterns because we previously reported the association of *C. parapsilosis* Group II with an outbreak of *C. parapsilosis* fungemia in a hospital in Rio de Janeiro State, Brazil [20]. Our data corroborate the circulation of *C. orthopsilosis* strains in our hospitals. The present study, as well as that of others [1, 13, 21], demonstrates that some clinical isolates identified as *C. parapsilosis* by biochemical methods such as the Vitek 2 system for yeast identification are, in fact, *C. orthopsilosis* or *C. metapsilosis* isolates. This is clinically relevant because it is reasonable that fungal infections caused by different species should respond to a specific treatment regimen. Thus, even if molecular methods are required to identify fungal species and then to conduct susceptibility testing such an approach has implications for the quality of care and will be of increasing importance [22]. Additionally, monitoring to detect differences in the antifungal susceptibility profiles of the *C. parapsilosis* complex isolates is fundamental because the prevalence of these species in clinical isolates has been increasing in Brazil [4, 17] and in several other countries in recent years [1, 23, 24].

In this study, the incubation time to determine the MIC values was lower for the Vitek 2 system. Comparisons between the Vitek 2 system and the Etest and CLSI BMD methods indicate that the Vitek 2 system was able to determine the MIC values of the antifungal agents after 12–18 h of incubation, with an average reading time of 15.5 h for the other *Candida* spp. [25].

According to our application of the CLSI BMD susceptibility method, no azole-resistant clinical isolates of *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* were detected. However, higher MIC values for *C. parapsilosis* sensu stricto were observed for fluconazole and itraconazole by the Etest method. Higher MIC values for *C. orthopsilosis* also were observed for fluconazole and itraconazole by the Vitek 2 and Etest methods, respectively. These

variations in the antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis* complex also were reported by other authors using the CLSI BMD method [3, 17, 21].

At present, clinical breakpoints for amphotericin B by the CLSI method are not established. However, a MIC > 1 µg/ml suggests drug resistance [7]. Thus, in this study, a single isolate of the *C. parapsilosis* sensu stricto was considered resistant to amphotericin B by both CLSI BMD and Etest methods. *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* isolates were susceptible for amphotericin B by the three methods analyzed. There are reports of *C. parapsilosis* sensu stricto isolates that could be considered resistant to amphotericin B [3, 16, 25]. *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* isolates have been described with MIC ≥ 4 µg/ml for amphotericin B [1]. The most available Brazilian studies have not found resistance to amphotericin B among the three *C. parapsilosis* complex species [4, 17, 26]. However, a study in a public hospital in São Paulo state, Brazil, also found a strain of *C. parapsilosis* sensu stricto resistant to amphotericin B [27]. Our study reinforces the presence of resistant to amphotericin B strains of *C. parapsilosis* sensu stricto in Brazil.

Despite the susceptibility of *C. parapsilosis* complex isolates to caspofungin, three isolates of the *C. parapsilosis* sensu stricto and three isolates of the *C. orthopsilosis* were classified as non-WT. Based on the ECVs, it is possible to monitor the emergence of strains with mutations that can lead to a reduced susceptibility or resistance to this antifungal agent [9, 15].

In this study, when the three species were compared using all methods, the *C. parapsilosis* sensu stricto isolates were less susceptible to amphotericin B and caspofungin than either *C. orthopsilosis* or *C. metapsilosis*. Moreover, the *C. orthopsilosis* isolates were less susceptible to the azoles, fluconazole, and itraconazole, than the other two species of the *C. parapsilosis* complex. *C. metapsilosis* was susceptible to all drugs that we tested. Similar results have also been reported by other authors using the CLSI BMD method [18, 28, 29].

Essential and categorical agreement percentages obtained by the Etest and Vitek 2 systems were lower for fluconazole, itraconazole, and amphotericin B when compared with the percentages obtained using the CLSI BMD method. Only minor errors were detected for the fluconazole and itraconazole

susceptibility of *C. parapsilosis* sensu stricto isolates using the Etest method. These data were consistent with studies that evaluated the ability of the Etest and CLSI BMD methods to determine the antifungal susceptibility of other *Candida* spp. [10, 25]. For *C. orthopsilosis*, MiE was detected for fluconazole and itraconazole by the Vitek 2 system and Etest method, respectively. For amphotericin B, a single isolate of *C. parapsilosis* sensu stricto exhibited variation when the Vitek 2 system results were compared with the results from the CLSI BMD method. This finding was similar to previous comparative studies between the Vitek 2 system and the CLSI BMD method for the same antifungal agent [16, 30].

In summary, we observed good concordance of the results obtained by the Etest and the Vitek 2 systems with the results obtained using the CLSI BMD reference method. Commercial methods yielded highly reproducible and accurate MIC results. Furthermore, the Vitek 2 system is fully automated, eliminating subjectivity inherent in the Etest and CLSI BMD methods. This study reinforces the relevance of the Etest and Vitek 2 commercial methods in clinical microbiology laboratories for antifungal susceptibility testing. Slight differences in the antifungal susceptibility profiles of *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* isolates were demonstrated which could be important in clinical treatment decisions for fungemia caused by these species.

Acknowledgments We thank Dr. Errol Reiss for his editorial assistance and Dr. Mauro M. Muniz for his comments and suggestions. Automated sequencing was performed using the genomic platform/DNA sequencing at Fundação Oswaldo Cruz—PDTIS/Fiocruz (RPT01A), Brazil. R.M.Z-O. is supported in part by CNPq Proc. 302739/2009-2.

Conflict of interest None.

References

1. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 2008;46:2659–64.
2. Dizbay M, Findan I, Kalkanci A, Sari N, Yalcin B, Kustimur S, Arman D. High incidence of *Candida parapsilosis* candidaemia in non-neutropenic critically ill patients: epidemiology and antifungal susceptibility. Scand J Infect Dis. 2010;42(2):114–20.

3. Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, Merino P, Campos-Herrero I, Marco F, de la Pedrosa EG, et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55: 5590–6.
4. Bonfietti LX, Martins Mdos A, Szeszs MW, Pukiskas SB, Purisco SU, Pimentel FC, Pereira GH, Silva DC, Oliveira L, Melhem Mde S. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. *J Med Microbiol.* 2012;6:1003–8.
5. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, Guzman-Blanco M, Santolaya ME, Thompson L, Sifuentes-Osorio J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS ONE.* 2013;8:e59373.
6. Tavanti A, Davison AD, Grow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005;43:284–92.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3rd edn. CLSI document M-27A3. Wayne, PA: CLSI; 2008.
8. Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN. Triazole and echinocandin MIC distributions with epidemiological cutoff values for differentiation of wild-type strains from non-wild-type strains of six uncommon species of *Candida*. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3800–4.
9. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol.* 2010;2012(50):2846–56.
10. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Kimberly EH, Keven JA, Perfect JR. Comparative evaluation of Etest and Sensitive YeastOne panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 2007;45:698–706.
11. Pfaller MA, Chaturvedi V, Diekema DJ, Ghannoum MA, Holliday NM, Killian SB, Knapp CC, Messer AS, Miskou A, Ramani R. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of the echinocandins against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2012;73:365–8.
12. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Comparison of the Vitek 2 yeast susceptibility system with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2013;77:37–40.
13. Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Han ZU. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med Microbiol.* 2009;58:745–52.
14. Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degraeve WM, Mendonça-Lima L, Alves-Ferreira M. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res.* 2008;7:861–71.
15. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema DJ, Fothergill A, Fuller J, Ghannoum M, Jones RN, et al. Wilde-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2040–6.
16. Bourgeois N, Dehandschoewercker L, Bertout S, Bousquet PJ, Rispaal P, Lachaud L. Antifungal susceptibility of 205 *Candida* spp. isolated primarily during invasive candidiasis and comparison of the Vitek 2 system with the CLSI broth microdilution and Etest methods. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:154–61.
17. Gonçalves SS, Amorim CS, Nucci M, Padovan AC, Briones MR, Melo AS, Colombo AL. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidemia in Brazil. *Mycology.* 2010;16:885–7.
18. Borghi E, Sciota R, Iatta R, Biassoni C, Montagna MT, Morace G. Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30:1437–41.
19. Garcia-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlin DS. Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2739–48.
20. Zancopé-Oliveira RM, James MJ, Derossi AP, Sampaio JLM, Muniz MM, Li RK, Nascimento AS, Peralta JM, Reiss E. Strain characterization of *Candida parapsilosis* fungemia by molecular typing methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:514–20.
21. Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Barcelona Candidemia Project Study Group. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis* results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1506–9.
22. Borman AM, Linton CJ, Miles S-J, Johnson EM. Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(Suppl 1):i7–12.
23. Diekema DJ, Messer SA, Boyken LB, Hollis RJ, Kroeger J, Tendolkar S, Pfaller MA. *In vitro* activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *J Clin Microbiol.* 2009;47: 3170–7.
24. Chen YC, Lin YH, Chen KW, Lii J, Teng HJ, Li SY. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2010;68:284–92.
25. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ, Rodriguez-Tudela JL. Comparison of the Vitek 2 antifungal

- susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) broth microdilution reference methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1782–6.
26. Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodriguez AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2392–7.
27. Purisco SU, Martins MA, Szeszs MW, Castro e Silva DM, Pukinkas SR, Bonfietti LX, et al. Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and the Clinical and Laboratory Standards Institute BMD method for non-*Candida albicans* and non-*C. tropicalis* bloodstream isolates from eleven tertiary hospitals in São Paulo state, Brazil. *FEMS Yeast Res* 2012; 1–7.
28. da Silva Ruiz L, Khouri S, Hahn RC, da Silva EG, de Oliveira VK, Gandra RF, Paula CR. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. *Mycopathologia.* 2013;175:231–9.
29. Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM, Quindós G. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:2315–22.
30. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference for testing amphotericin B, flucytosine and voriconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3522–8.



Revista Iberoamericana de Micología

www.elsevier.es/reviberoammicol



Note

Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis

Lívia de Souza Ramos^{a,c}, Leonardo Silva Barbedo^b, Lys Adriana Braga-Silva^c, André Luis Souza dos Santos^c, Marcia Ribeiro Pinto^a, Diana Bridon da Graça Sgarbi^{a,*}

^a Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

^b Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^c Instituto de Microbiologia Paulo de Góes and Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2013

Accepted 21 January 2014

Available online xxx

Keywords:

Candida spp.

Clinical isolates

Cutaneous candidiasis

Protease

Phospholipase

Virulence factors

ABSTRACT

Background: Cases of superficial and invasive mycoses caused by emerging species of *Candida* have been increasingly reported over the last thirty years. The production of hydrolytic enzymes plays a central role in the fungal infective process. In *Candida* infections the secretion of both proteases and phospholipases are well-known virulence attributes.

Aims: To determine the protease and phospholipase production from 58 human clinical isolates of *Candida* obtained from individuals with cutaneous candidiasis seen in the Human and Veterinary Diagnostic Mycology Sector from Universidade Federal Fluminense (UFF), Brazil, from November 2008 to August 2009.

Methods: Fungal identification was performed using biochemical tests. Proteolytic activity was detected on agar plates containing bovine serum albumin, and phospholipase production was determined on egg-yolk plates.

Results: The *Candida* species isolated were *Candida parapsilosis* (27.59%), *Candida famata* (18.96%), *Candida albicans* (15.52%), *Candida haemulonii* (12.06%), *Candida ciferri* (8.62%), *Candida guilliermondii* (6.90%), *Candida tropicalis* (5.17%) and *Candida lipolytica* (5.17%). All isolates of *C. albicans* produced both protease and phospholipase. As regards the isolates of non-*C. albicans* *Candida* species, 53.06% and 4.08% were able to produce protease and phospholipase, respectively. For example, the majority of isolates of *C. parapsilosis* (15/16) produced protease, while 40% of *C. ciferri* isolates (2/5) were phospholipase producers. This study shows, for the first time, that *C. ciferri* and *C. haemulonii* strains were able to produce protease.

Conclusions: Collectively, our results showed that different species of *Candida* isolated from cutaneous lesions were able to produce proteases and/or phospholipases, which are multifunctional molecules directly involved in the infectious process of these fungi.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Actividades proteasa y fosfolipasa en aislamientos de *Candida*. procedentes de candidiasis cutánea

RESUMEN

Antecedentes: Los casos de micosis superficiales e invasoras relacionados con las especies emergentes de *Candida* se han reportado progresivamente durante las últimas tres décadas. La producción de enzimas hidrolíticas juega un papel central en varios contextos de la patogenicidad fúngica. Con respecto a la infección por *Candida*, la secreción de proteasas y fosfolipasas son atributos de virulencia bien conocidos.

Objetivos: Determinar y comparar la producción de proteasa y fosfolipasa de 58 aislamientos clínicos humanos de diferentes especies de *Candida* obtenidas de pacientes con candidiasis cutánea, atendidos en el Sector de Diagnóstico Micológico Humano y Veterinario de la Universidad Federal Fluminense (UFF), durante el período de noviembre de 2008 a agosto de 2009.

* Corresponding author.

E-mail addresses: dbridon@id.uff.br, dsagarbi@globo.com (D.B.d.G. Sgarbi).

Métodos: La identificación de las especies de *Candida* se realizó mediante pruebas bioquímicas, la actividad proteolítica se detectó en placas de agar que contenían albúmina de suero bovino y la actividad fosfolipasa se determinó utilizando el método de la placa de yema de huevo semi-cuantitativa.

Resultados: Las especies aisladas fueron *Candida parapsilosis* (27,59%), *Candida famata* (18,96%), *Candida albicans* (15,52%), *Candida haemulonii* (12,06%), *Candida ciferri* (8,62%), *Candida guilliermondii* (6,90%), *Candida tropicalis* (5,17%) y *Candida lipolytica* (5,17%). Todos los aislamientos de *C. albicans* produjeron tanto proteasa como fosfolipasa. El 53,06% de los aislamientos de *Candida* noC. *albicans* fueron capaces de producir proteasa y el 4,08% fosfolipasa. La mayoría de los aislamientos de *C. parapsilosis* (15/16) produjo proteasa, mientras que el 40% de los aislamientos de *C. ciferri* (2/5) fueron productores de fosfolipasa. Se describe por primera vez en la literatura científica la producción de proteasas por cepas de *C. haemulonii* y *C. ciferri*.

Conclusiones: Nuestros resultados muestran el potencial que tienen los aislamientos de *Candida* provenientes de lesiones cutáneas para producir proteasas y fosfolipasas.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Superficial mycoses of the skin and its appendages are amongst the most prevalent human infectious diseases observed in clinical practice. The etiological agents comprise the dermatophytes and yeasts responsible for infections including dermatophytosis, pityriasis versicolor and candidiasis. The prevalence of these fungi tends to follow geographic variations, cultural habits and migration that can change with time.¹¹ Cases of superficial and invasive diseases related to species belonging to the *Candida* genus have been progressively reported in the last years, involving isolates of *Candida albicans*, *Candida ciferri*, *Candida dubliniensis*, *Candida famata*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida haemulonii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lipolytica*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, and *Candida tropicalis*, among others.¹⁹

Crucial steps during pathogenesis of superficial candidiasis comprise fungal adhesion, colonization and subsequent penetration of tissues. In all these phases, the production of hydrolytic enzymes is a fundamental event.^{13,14} In this sense, two major classes of enzymes have prominent and central roles: proteases and phospholipases, since proteins and phospholipids represent the major chemical constituents of the host cell membrane, which must be destroyed in order to obtain nutrients for fungal growth/development as well as to facilitate the dissemination inside the host.^{10,20}

The aim of the present study was to investigate the in vitro production of phospholipase and protease activities in different *Candida* species isolated from human cases of cutaneous candidiasis.

Materials and methods

Candida isolates

The clinical isolates ($n=58$) were obtained from patients presenting cutaneous candidiasis, who were attended during the period of November 2008 until August 2009 at the Sector of Human and Veterinary Diagnostic Mycology, Microbiology and Parasitology Department of Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. The fungal isolates were recovered from the following body location: toe nail ($n=24$), finger nail ($n=20$), sole of the foot ($n=4$) and skin ($n=10$). The study was approved by the Bioethics Committee of Hospital Universitário Antônio Pedro (CEP CMM/HUAP number 188/08 and CAAE number 0147.0.258.000-08).

Identification tests

Clinical isolates were initially tested on CHROMagar *Candida* medium (CHROMagar *Candida* Company, Paris, France). Plates

were incubated for 24–72 h at 37 °C under aerobic conditions. Metabolic properties, such as assimilation of carbon compounds and enzymatic reactions, were analyzed by VITEK 2 yeast identification system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). In addition, germ-tube tests as well as the capacity of yeasts to grow at different temperatures and salt concentrations were performed.³⁰ Growth was estimated by counting the fungal cells in a Neubauer chamber.

Protease assay

Isolates were tested for protease production by using yeast carbon base (YCB) medium (1.17%) supplemented with 0.2% bovine serum albumin (BSA). The YCB-BSA medium was adjusted to pH 5.0, sterilized by filtration and added to previously autoclaved agar (2%).²³ Aliquots (10 μ l) of 48 h-old cultured fungal cells (10^6 yeasts) were spotted onto the surface of the YCB-BSA medium and incubated at 37 °C for seven days. The proteolytic activity results in a clear zone around the colony, which corresponds to the hydrolysis of the BSA present in the medium. The colony diameter (a) and the diameter of colony plus the precipitation zone (b) were measured by a digital paquimeter.

Phospholipase assay

Phospholipase production was assayed using the egg-yolk agar plate containing 1 M NaCl, 5 mM CaCl₂ and 8% sterile egg-yolk emulsion.²¹ Suspensions of approximately 10^6 yeasts (10 μ l) of each isolate, previously cultivated on Sabouraud during two days, were inoculated onto the surface of the egg-yolk agar plate medium and incubated at 37 °C for seven days. Hydrolysis of lipid substrates present in the egg-yolk results in the formation of a calcium complex with fatty acids released by the action of the secreted enzymes, resulting in a precipitation zone around the colony. The colony diameter (a) and the diameter of the colony plus the precipitation zone (b) were measured by a digital paquimeter.

Enzymatic score and statistical analysis

The enzyme activities were expressed as Pz value (a/b) as described by Price and co-workers.²¹ According to this definition, low Pz values mean high protease or phospholipase production and, inversely, high Pz values indicate low enzymatic production. The enzymatic activity was scored into four categories: a Pz of 1.0 indicated no enzymatic activity; a Pz between 0.999 and 0.700 indicated low enzymatic activity; Pz between 0.699 and 0.400 corresponded to moderate activity; and low Pz values between 0.399 and 0.100 meant high enzymatic activity. All the experiments were repeated

at least three times and all assays were carried out in triplicate. The data were analyzed statistically using Student's *t* test. *P* values of 0.05 or less were considered statistically significant.

Results and discussion

The prevalence of superficial mycoses has tremendously risen in the last years, affecting around 20–25% of the world's population. In this scenario, skin mycoses are the most frequent forms of infection and, consequently, constitute a major public health problem worldwide.^{15,25} Our results revealed that out of 58 isolates of *Candida* from cutaneous infections, *C. parapsilosis* was the most frequently isolated species ($n=16$; 27.6%), followed by *C. famata* ($n=11$; 19%), *C. albicans* ($n=9$; 15.5%), *C. haemulonii* ($n=7$; 12%), *C. ciferri* ($n=5$; 8.6%), *C. guilliermondii* ($n=4$; 6.9%), *C. tropicalis* ($n=3$; 5.2%) and *C. lipolytica* ($n=3$; 5.2%). Considering the site of the cutaneous infections, *C. parapsilosis* (20.5%) was the most prevalent *Candida* species isolated from finger followed by *C. albicans* (18.2%), *C. famata* (18.2%), *C. haemulonii* (13.6%), *C. ciferri* (11.4%), *C. guilliermondii* (9.1%), *C. tropicalis* (4.5%) and *C. lipolytica* (4.5%), while *C. parapsilosis* (70%) was again by far the most isolated from skin followed by *C. albicans* (10%), *C. famata* (10%) and *C. tropicalis* (10%).

Epidemiological and etiological studies of superficial mycoses of the foot revealed that the major isolated causal agents were *C. parapsilosis* (25%) and *Trichophyton rubrum* (18.7%).^{5,6} *C. parapsilosis* was the leading cause of onychomycosis in a group of patients from Malta followed by *C. tropicalis* and *C. guilliermondii*.²⁷ Similarly, a study performed in Brazil reported that the leading pathogen detected in samples from infected nails ($n=200$) was *C. parapsilosis* (40.5%) followed by *C. albicans* (31.5%), *C. tropicalis* (26.0%) and *C. guilliermondii* (2.0%).⁷ Contrarily, *C. albicans* was the most common *Candida* species able to cause cutaneous/nail and vaginal candidiasis in Singapore,¹⁸ Jordan,¹ Slovakia¹² and the United States.⁸ Importantly, the increased tendency for non-*C. albicans Candida* infections poses a challenge in the disease management, since these species are often notorious to develop antifungal resistance that is correlated with routine fluconazole prophylaxis adopted in some patients and the intrinsic/acquired azole resistance of *Candida* spp.³

The production of proteases, especially secreted aspartic proteases (Saps), has been reported to be one of the most important determinants for pathogenicity of *Candida*.⁹ The cultivation of *Candida* yeasts in YCB-BSA at acidic pH is a recognized condition that induces the secretion of Saps.²⁸ Under these conditions, we showed that protease activity was detected in 35 strains of all *Candida* species tested, among which all strains of *C. albicans* and almost all strains of *C. parapsilosis* were protease producers (Table 1). All *C. albicans* isolates exhibited high Pz values, which indicate low enzymatic production; whereas the majority (66.7%) of *C. parapsilosis* isolates displayed moderate Pz and the minority (33.3%) high Pz values. However, strains of *C. famata* showed lower Pz values when compared to the other *Candida* species (Table 1). In addition, the protease activity of *C. famata* was significantly higher than that of

albicans ($P<0.001$) or *C. parapsilosis* ($P<0.03$). None of the *C. lipolytica* or *C. guilliermondii* isolates showed proteolytic activity (Table 1), under the employed experimental conditions. The analysis of the body location also revealed a significant difference ($P<0.05$) in the protease production when they were compared to the fungal isolates from skin (90% of producers) with finger nail (55%), toe nail (54.2%) or sole of the foot (50%).

Kantarcioglu and Yücel showed that 78.9% of all examined *Candida* strains ($n=95$) were protease-positive.¹⁶ Those authors also interpreted their data by different viewpoints. For example, 95% of *C. albicans* produced proteases. However, considering only the site of fungal isolation, a new profile of protease producers could be seen, as follows: oral cavity (17/22 = 77.3%), respiratory tract (37/46 = 80.4%), urogenital system (21/23 = 91.3%), and blood (0/4 = 0%).¹⁶ These discrepancies in percentages of positivity may be considered as being relevant due to the number of the different species tested as well as the site of isolation. Corroborating these findings, De Bernardis and co-workers reported that all cutaneous isolates of *C. parapsilosis* had uniformly elevated secreted protease activity, more than four times higher than the enzyme activity of the blood isolates.⁴ Additionally, the cutaneous isolates of *C. parapsilosis* were highly vaginopathic in a rat vaginitis model when compared to the blood isolates.⁴ Cassone also detected a higher proteolytic activity in vaginal *C. parapsilosis* isolates when compared with blood isolates.² Different published works revealed that 65–75% of clinical strains of *C. tropicalis* were able to yield aspartic proteases,^{17,26,29} which are in accordance with our findings ($\approx 67\%$). We reported herein that cutaneous clinical isolates of *C. famata* were the most potent protease producers. For the first time, we emphasized that some clinical strains of *C. ciferri* and *C. haemulonii* were able to secrete aspartic proteases.

Phospholipases play an active role in the invasion of host tissue by *Candida* by disrupting the epithelial cell membranes and allowing the hyphal tip to enter the cytoplasm.¹⁰ Regarding phospholipase activity, all strains of *C. albicans* and only few strains (2/5) of *C. ciferri* were capable of producing phospholipase, while the great majority (81%) of the *Candida* strains isolated from cutaneous lesions was unable to yield it (Table 1). The 2 strains of *C. ciferri* and 5 strains of *C. albicans* able to produce phospholipase activity exhibited high Pz values, while the other 4 remaining strains of *C. albicans* showed moderate Pz values. Samaranyake and co-workers screened 41 *Candida* isolates for phospholipase activity and found no strains of *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* producing extracellular phospholipases, whereas 73% of the *C. albicans* isolates screened were found to be positive.²⁴ Kumar and co-workers showed that 100% of clinical isolates of *C. albicans* isolated from HIV positive and cancer patients produced a pronounced phospholipase activity.¹⁷ The absence of protease and/or phospholipase in clinical isolates of *Candida* must be interpreted with caution. In this context, hydrolytic enzymes with activities against other substrates of relevance to human cutaneous infections, distinct to those used in the present study, can help in the detection of these enzymatic classes.

Table 1
Distribution of protease and phospholipase activities from *Candida* spp. isolated from cutaneous infections.

Species	Protease activity (%)	Range (Pz)	Mean (Pz)	Phospholipase activity (%)	Range (Pz)	Mean (Pz)
<i>C. albicans</i>	100 (9/9)	0.73–0.83	0.78 ± 0.04	100 (9/9)	0.53–0.93	0.73 ± 0.13
<i>C. ciferri</i>	20 (1/5)	0.78	0.78 ± 0.02	40 (2/5)	0.73–0.83	0.78 ± 0.07
<i>C. famata</i>	63.6 (7/11)	0.45–0.85	0.57 ± 0.15	0 (0/11)	0	0
<i>C. guilliermondii</i>	0 (0/4)	0	0	0 (0/4)	0	0
<i>C. haemulonii</i>	14.3 (1/7)	0.60	0.60 ± 0.05	0 (0/7)	0	0
<i>C. lipolytica</i>	0 (0/3)	0	0	0 (0/3)	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	93.8 (15/16)	0.57–0.90	0.69 ± 0.09	0 (0/16)	0	0
<i>C. tropicalis</i>	66.7 (2/3)	0.71–0.86	0.79 ± 0.11	0 (0/3)	0	0
Total	60.34% (35/58)			18.97% (11/58)		

The comparison between *C. albicans* and non-*C. albicans Candida* species revealed that the frequency of isolation (15.5% versus 82.5%), as well as the production of both protease (100% versus 53.1%) and phospholipase (100% versus 4.1%) activities, was significantly different ($P < 0.05$). Only 17.2% (10/58) of the *Candida* isolates produced both enzyme classes (all strains of *C. albicans* and one strain of *C. ciferri*). Previous studies also reported that proteases and phospholipases are produced at high rates in *C. albicans*, whilst non-*C. albicans Candida* species usually present low rates of these enzymes.^{16,22} In this sense, the hydrolytic enzyme profiles provide some data about the potential virulence factors produced by *Candida* strains isolated from cutaneous infection, resulting in a great variability production in non-*C. albicans Candida* species (probably strain specific), in contrast to a homogeneous production of both protease and phospholipase by clinical isolates of *C. albicans*.

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the following Brazilian Agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). The authors thank Dr. Marta Helena Branquinha (UFRJ) for critical suggestions on the manuscript.

References

1. Abu-Elteen KH. Incidence and distribution of *Candida* species isolated from human skin in Jordan. *Mycoses*. 1999;42:311–7.
2. Cassone A. Biotyping diversity of *C. parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis*. 1995;171:967–75.
3. Concia E, Azzini AM, Conti M. Epidemiology, incidence and risk factors for invasive candidiasis in high-risk patients. *Drugs*. 2009;69:5–14.
4. De Bernardis F, Mondello F, San Millán R, Pontón J, Cassone A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3481–6.
5. Djeridane A, Djeridane Y, Ammar-Khodja A. A clinicomycological study of fungal foot infections among Algerian military personnel. *Clin Exp Dermatol*. 2007;32:60–3.
6. El Fekih N, Belghith I, Trabelsi S, Skhiri-Aounallah H, Khaled S, Fazaa B. Epidemiological and etiological study of foot mycosis in Tunisia. *Actas Dermosifiliogr*. 2012;103:520–4.
7. Figueiredo VT, de Assis Santos D, Resende MA, Hamdan JS. Identification and in vitro antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp. responsible for fingernail infections. *Mycopathologia*. 2007;164:27–33.
8. Foster KW, Ghannoum MA, Elewski BE. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. *J Am Acad Dermatol*. 2004;50:748–52.
9. Fotedar R, Al-Hedaithy SSA. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*. 2005;48:62–7.
10. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13:122–43.
11. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008;51:2–15.
12. Jautová J, Virágová S, Ondrasovic M, Holoda E. Incidence of *Candida* species isolated from human skin and nails: a survey. *Folia Microbiol (Praha)*. 2001;46:333–7.
13. Jayatilake JA. A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. *Mycopathologia*. 2011;171:235–50.
14. Jayatilake JA, Samaranyake LP. Experimental superficial candidiasis on tissue models. *Mycoses*. 2010;53:285–95.
15. Jayatilake JA, Tilakaratne WM, Panagoda GJ. Candidal onychomycosis: a mini-review. *Mycopathologia*. 2009;168:165–73.
16. Kantarcioglu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 2002;45:160–5.
17. Kumar CPG, Kumar SSJ, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia*. 2006;161:213–8.
18. Kwok YK, Tay YK, Goh CL, Kamarudin A, Koh MT, Seow CS. Epidemiology and in vitro activity of antimicrobials against candidal vaginal/skin/nail infections in Singapore. *Int J Dermatol*. 1998;37:145–9.
19. López-Martínez R. Candidosis, a new challenge. *Clin Dermatol*. 2010;28:178–84.
20. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67:400–28.
21. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982;20:7–14.
22. Ribeiro MA, Miranda AE, Gambale W, Paula CR. Prevalence and exoenzyme secretion by *Candida albicans* isolates from oral and vaginal mucosae of HIV-infected women. *Mycopathologia*. 2004;157:255–61.
23. Rüchel J, Tegeler R, Trost MA. Comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982;20:233–44.
24. Samaranyake LP, Raeside JM, MaxFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia*. 1984;22:201–7.
25. Segal E. *Candida*, still number one – what do we know and where are we going from there? *Mycoses*. 2005;48:3–11.
26. Shehabi AA, Nazzal SA, Dajani N. Putative virulence factors of *Candida* species colonizing respiratory tracts of patients. *Microb Ecol Health Dis*. 2004;16:214–7.
27. Vella Zahra L, Gatt P, Boffa MJ, Borg E, Mifsud E, Scerri L, et al. Characteristics of superficial mycoses in Malta. *Int J Dermatol*. 2003;42:265–71.
28. White TC, Agabian N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol*. 1995;177:5215–21.
29. Yamamoto T, Nohara K, Uchida K, Yamaguchi K. Purification and characterization of secretory proteinase of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol*. 1992;36:637–41.
30. Yarrow D. Methods for the isolation maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW, editors. *The yeasts, a taxonomic study*. 4th ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 1998. p. 77–100.

Candida haemulonii complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil

Livia S. Ramos¹, Maria Helena G. Figueiredo-Carvalho², Leonardo S. Barbedo², Mariangela Ziccardi^{1,3}, Alessandra L. S. Chaves⁴, Rosely M. Zancopé-Oliveira², Marcia R. Pinto⁵, Diana B. G. Sgarbi⁵, Marcos Dornelas-Ribeiro⁶, Marta H. Branquinha¹ and André L. S. Santos^{1,7*}

¹Laborat rio de Investiga o de Peptidases, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ²Laborat rio de Micologia, Instituto Nacional Infectologia Evandro Chagas, Funda o Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; ³Laborat rio Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, Funda o Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; ⁴Laborat rio de Micologia, Serviço de Patologia Clínica, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brazil; ⁵Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil; ⁶Laborat rio de Bacteriologia/Micologia, Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, Brazil; ⁷Programa de Pós-Gradua o em Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author. Tel: +55-21-2562-6740; Fax: +55-21-2560-8344; E-mail: andre@micro.ufrj.br

Received 9 June 2014; returned 8 July 2014; revised 10 July 2014; accepted 19 July 2014

Objectives: The emerging fungal pathogens comprising the *Candida haemulonii* complex (*Candida haemulonii*, *Candida haemulonii* var. *vulnera* and *Candida duobushaemulonii*) are notable for their antifungal resistance. Twelve isolates with phenotypic similarity to *C. haemulonii* were recovered from patients in Brazilian hospitals. Here we aimed to identify these isolates by a molecular approach, using the current classification of this fungal complex, and to evaluate their antifungal susceptibility profiles.

Methods: The fungal isolates were rechecked to certify their authentication by mycology methodologies and then characterized by *ITS1-5.8S-ITS2* gene sequencing. A susceptibility assay was performed using the broth microdilution method published by CLSI (M27-A3/M27-S3).

Results: Based on biochemical tests, all Brazilian isolates were identified as *C. haemulonii*. After employing *ITS* sequencing, five isolates were identified as *C. haemulonii*, four as *C. duobushaemulonii* and three as *C. haemulonii* var. *vulnera*. All 12 clinical isolates were resistant to amphotericin B (MICs ranged from 2 to >16 mg/L) and fluconazole (MICs \geq 64 mg/L). One isolate of *C. haemulonii* var. *vulnera* and two isolates of *C. duobushaemulonii* were susceptible-dose dependent to itraconazole, while the remaining isolates (75%) were resistant to this antifungal. Eight out of 12 isolates (66.7%) were resistant to voriconazole (MICs \geq 16 mg/L), while all isolates were susceptible to caspofungin (MICs \leq 0.5 mg/L).

Conclusions: Our results reinforce the importance of molecular identification in differentiating species of the *C. haemulonii* complex. Moreover, the antifungal multiresistant profile of clinical isolates of the *C. haemulonii* complex represents a challenge to the treatment of such infections.

Keywords: *Candida haemulonii* complex, Brazilian hospitals, resistance, antifungal susceptibility

Introduction

Candida haemulonii has emerged as an opportunistic fungal pathogen associated with onychomycosis,¹ vaginal candidiasis,² bloodstream infections,^{3–5} catheter-related fungemia,⁶ osteitis⁷ and outbreaks in neonatal intensive care units.⁸ Although regarded as a rare *Candida* species, it deserves attention because it is considered a multidrug-resistant yeast,^{5,8,9} with clinical failure associated with resistance to amphotericin B and reduced susceptibility to azoles, resulting in difficulty in treating deep infections.^{3,10,11}

The first isolation of *C. haemulonii* from humans was reported in 1984, from the blood of a patient who died of renal failure despite therapy with amphotericin B and flucytosine.¹² Since then, several cases of infection due to this yeast have been described in the literature, varying from superficial to deep infections. Cendejas-Bueno *et al.*⁹ suggested the reclassification of *C. haemulonii* as a fungal complex formed by three genotypically distinguishable species: *C. haemulonii*, *Candida duobushaemulonii* and *C. haemulonii* var. *vulnera*, based on sequencing of *D1/D2* or *ITS* genes. Moreover, two species related to *C. haemulonii* complex

were described, *Candida pseudohaemulonii*¹³ and *Candida auris*,¹⁴ which are responsible for fungaemia and also present antifungal resistance profiles.

Despite the importance of these emergent multiresistant yeasts, little information on the occurrence and distribution of *C. haemulonii* complex in clinical specimens has been available until now. With this in mind, we obtained 12 strains of *C. haemulonii* isolated from Brazilian hospitals and performed molecular identification based on *ITS* gene sequencing to correctly classify them within the current taxonomy of this fungal complex. In parallel, we evaluated the antifungal susceptibility profile of these clinical isolates against amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole and caspofungin.

Materials and methods

Microorganisms, growth conditions and biochemical identification

In this study, we analysed 12 clinical isolates of *C. haemulonii* recovered from 12 patients attending four Brazilian hospitals between 2005 and 2013 (Table 1). Fungal isolates were grown on Sabouraud dextrose medium (37°C/48 h/200 rpm) and then phenotypically identified using CHROMagar Candida® (CHROMagar Company) and VITEK® 2 (bioMérieux) with YST card.

DNA extraction, amplification and nucleotide sequence determination

Yeasts were recovered from Sabouraud dextrose agar and used for DNA extraction with the Genra® Puregene® Yeast and G+ Bacteria Kit (Qiagen®). All isolates were identified by sequencing the *ITS1-5.8S-ITS2* gene as previously described.^{9,10} Amplicons were purified and sequences from both DNA strands were generated and edited with the Sequencher™ version 4.9 (Gene Codes Corporation), followed by alignment using Mega version 4.0.2 software.

Antifungal susceptibility assay

Susceptibility testing was performed according to the standardized broth microdilution technique described by CLSI¹⁵ in document M27-A3 and interpreted according to document M27-S3. Antifungals tested were amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole and caspofungin (Sigma-Aldrich).

Results and discussion

The fungal isolates were initially reconfirmed to certify their authentication by mycology methodologies. All isolates developed a light-to-dark violet colour after 48 h of incubation on CHROMagar Candida®; however, other *Candida* species (e.g. *C. glabrata*) also develop violet pigmentation in this chromogenic medium.¹⁶ The carbohydrate assimilation and metabolic enzymatic profiles evaluated with VITEK® 2 identified all 12 Brazilian clinical isolates as *C. haemulonii* with a probability of identity ranging from 94 to 98%; only two contradictory tests were detected: glycerol assimilation (2/12 isolates, 16.7%) and α-glucosidase (4/12 isolates, 33.3%) (Table 1).

Phenotypic methods are not sufficient to differentiate species of the *C. haemulonii* complex and the closely related species *C. pseudohaemulonii* and *C. auris*;^{3,9,10} consequently, molecular

Table 1. Biochemical/molecular identification and antifungal susceptibility profiles of the *C. haemulonii* complex isolates included in this study

Code	Source of isolate	Collection date	Institution	VITEK® 2 YST system		Sequencing of <i>ITS</i> gene		Susceptibility profile ^a						
				species	probability (confidence)	atypical biopattern	species	GenBank accession number	AMB	FLC	ITC	VRC	CAS	
LIP Ch1	finger nail	2005	IBEX	<i>C. haemulonii</i>	99% (EI)	—	<i>C. duobushaemulonii</i>	KJ476193	R	R	R	R	R	S
LIP Ch2	sole of the foot	2009	UFF	<i>C. haemulonii</i>	98% (EI)	—	<i>C. haemulonii</i>	KJ476194	R	R	R	R	S	S
LIP Ch3	toe nail	2009	UFF	<i>C. haemulonii</i>	98% (EI)	—	<i>C. haemulonii</i>	KJ476195	R	R	R	R	R	S
LIP Ch4	finger nail	2009	UFF	<i>C. haemulonii</i>	98% (EI)	—	<i>C. haemulonii</i>	KJ476196	R	R	R	R	R	S
LIP Ch5	toe nail	2009	UFF	<i>C. haemulonii</i>	98% (EI)	—	<i>C. haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>	KJ476197	R	R	SDD	S	S	S
LIP Ch6	toe nail	2009	UFF	<i>C. haemulonii</i>	97% (EI)	AGLU	<i>C. duobushaemulonii</i>	KJ476198	R	R	SDD	S	S	S
LIP Ch7	toe nail	2009	UFF	<i>C. haemulonii</i>	98% (EI)	—	<i>C. haemulonii</i>	KJ476199	R	R	R	R	R	S
LIP Ch8	blood	2010	USP	<i>C. haemulonii</i>	95% (VGI)	AGLU, GLYLa	<i>C. duobushaemulonii</i>	KJ476200	R	R	R	R	R	S
LIP Ch9	urine	2012	INCA	<i>C. haemulonii</i>	98% (EI)	—	<i>C. haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>	KJ476201	R	R	R	R	R	S
LIP Ch10	bronchoalveolar lavage	2013	INCA	<i>C. haemulonii</i>	94% (VGI)	AGLU, GLYLa	<i>C. duobushaemulonii</i>	KJ476202	R	R	SDD	S	S	S
LIP Ch11	blood	2013	INCA	<i>C. haemulonii</i>	96% (EI)	AGLU	<i>C. haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>	KJ476203	R	R	R	R	R	S
LIP Ch12	blood	2013	INCA	<i>C. haemulonii</i>	98% (EI)	—	<i>C. haemulonii</i>	KJ476204	R	R	R	R	R	S

IBEX, Instituto de Biologia do Exército (Rio de Janeiro, RJ, Brazil); UFF, Universidade Federal Fluminense (Niterói, RJ, Brazil); USP, Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brazil); INCA, Instituto Nacional do Câncer (Rio de Janeiro, RJ, Brazil); EI, excellent identification; VGI, very good identification; AGLU, α-glucosidase; GLYLa, glycerol assimilation; AMB, amphotericin B; FLC, fluconazole; ITC, itraconazole; VRC, voriconazole; CAS, caspofungin; R, resistant; SDD, susceptible-dose dependent; S, susceptible.
^aThe MIC values are shown in Table S1.

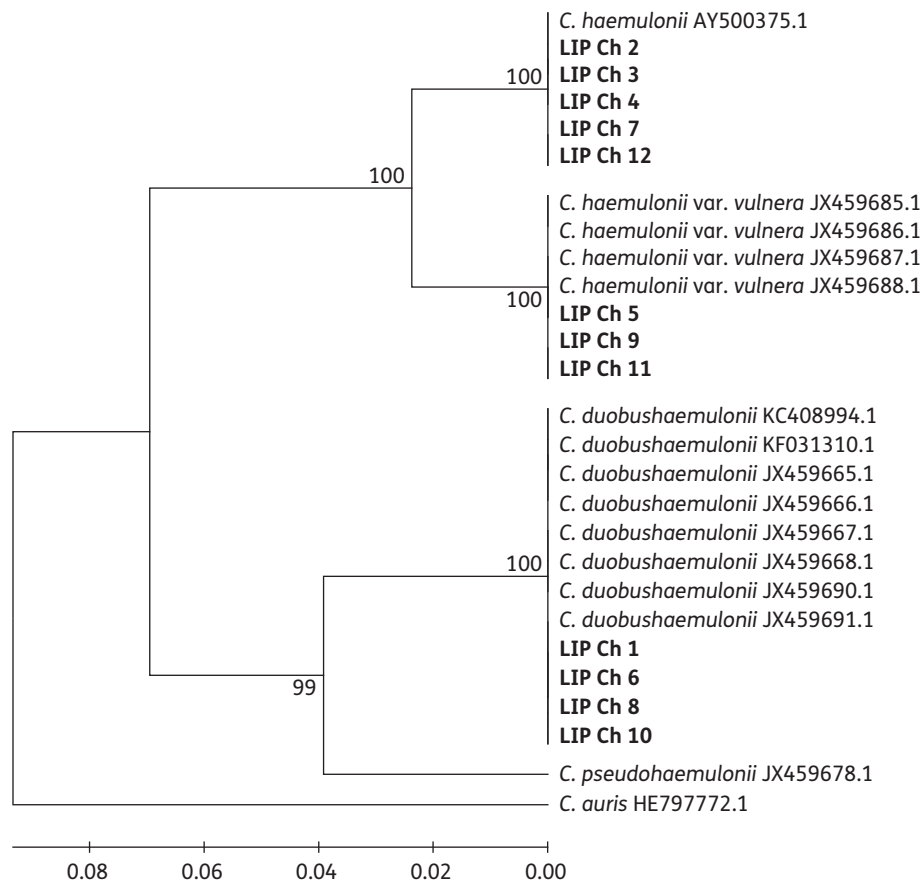


Figure 1. Phylogenetic neighbour-joining dendrogram generated from a genetic similarity matrix based on comparison of the *ITS1-5.8S-ITS2* gene sequence from 12 clinical isolates obtained in the present work (LIP Ch1 to LIP Ch12), as well as 13 sequences of isolates belonging to the *C. haemulonii* complex and two closely related species (*C. auris* and *C. pseudohaemulonii*) obtained from the GenBank database. Data consistency was tested by bootstrapping the alignments 1000 times with corrections for multiple substitutions.

identification was carried out. PCR followed by sequencing of the *ITS* gene was used as the gold standard for identification of this fungal complex.⁹ Our results revealed that among the 12 clinical isolates, five were identified as *C. haemulonii* (41.7%), four as *C. duobushaemulonii* (33.3%) and three as *C. haemulonii* var. *vulnera* (25%) (Table 1). The *ITS* sequencing alignment scores of the fungal isolates employed here exhibited 100% identity compared with corresponding *ITS* sequences from reference isolates deposited in GenBank (Figure 1). The *ITS* sequences obtained during this study were deposited in GenBank under the accession numbers listed in Table 1.

To our knowledge, this is the first report of the identification of the three species of *C. haemulonii* complex in clinical isolates from patients attending Brazilian hospitals. It is noteworthy that the isolate LIP Ch8 was previously described as *C. haemulonii*,⁴ also based on *ITS* gene sequencing; however, that study was conducted before the aforementioned reclassification of the *C. haemulonii* complex.⁹ Our data reallocated the isolate LIP Ch8 as *C. duobushaemulonii*. Additionally, *C. haemulonii*, *C. haemulonii* var. *vulnera* and *C. duobushaemulonii* were identified in both cutaneous and blood samples from Brazilian patients (Table 1). Species of *C. haemulonii* complex had already been isolated from distinct environments, including the gut of *Haemulon sciurus* (fish),

Pyrrhocoris apterus (insect) and human nails, skin, blood, bone, respiratory specimens and urine.^{7,9,11}

Concerning the antifungal susceptibility tests, all 12 isolates of the *C. haemulonii* complex were considered resistant to amphotericin B (MICs ranged from 2 to >16 mg/L) and fluconazole (MICs ≥ 64 mg/L) (Table 1 and Table S1, available as Supplementary data at JAC Online). One isolate of *C. haemulonii* var. *vulnera* and two isolates of *C. duobushaemulonii* were susceptible-dose dependent to itraconazole, while the remaining isolates were resistant to this antifungal agent (Tables 1 and S1). Four fungal isolates (*C. haemulonii* LIP Ch2, *C. haemulonii* var. *vulnera* LIP Ch5 and *C. duobushaemulonii* LIP Ch6 and LIP Ch10) were susceptible to voriconazole with MIC values ≤ 1 mg/L, while the others were resistant with MIC values ≥ 16 mg/L. In addition, all the fungal isolates were susceptible to caspofungin (Tables 1 and S1).

Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study (1997–2007) showed that infections caused by *C. haemulonii* were very infrequent (<0.01%), and at that time 11.1% of these isolates were resistant to fluconazole and itraconazole.¹⁷ A retrospective study¹⁸ showed that, of the species responsible for causing candidaemia, *C. haemulonii* was the sixth most common (1.5%) in an Indian hospital between 2001 and 2005, but no true antifungal resistance was reported. *C. haemulonii*

was the fourth most common species of *Candida* isolated from individuals with cutaneous candidiasis (12% of the total) attending the Human and Veterinary Diagnostic Mycology Sector of UFF (Niterói, RJ, Brazil).¹⁹ The emergence of *C. haemulonii* in five Korean hospitals was reported between 2004 and 2006, with genotyping results suggesting intra- and inter-hospital transmission of a clonal strain.¹⁰ *C. haemulonii* was the third most frequent species responsible for causing candidaemia in Sir Ganga Ram Hospital (New Delhi, India), representing 15.5% of the cases, following *Candida tropicalis* (29.2%) and *C. albicans* (16.8%).⁵ Impressively, the authors reported that *C. haemulonii* was first isolated in 2006 and its frequency of isolation increased from 5.45% in 2006 to 18.2% in 2008, showing resistance to amphotericin B and azoles.⁵ Interestingly, the authors also analysed the annual usage of antifungal drugs between 2000 and 2008, and observed an increase of 32% in total antifungal use.⁵ According to this analysis, fluconazole was the most frequently prescribed antifungal drug in the mentioned period, with an increase of 25% in its use, and a statistically significant correlation was observed between yearly fluconazole usage and the increase in isolation of different non-*albicans* *Candida* species.⁵

Antifungal resistance is a great concern in the management of patients with invasive candidiasis.²⁰ *In vitro* resistance to amphotericin B and fluconazole is a common phenotypic characteristic of clinical isolates of the *C. haemulonii* complex already described by several authors, and it has often been associated with clinical treatment failure and fatal outcome.^{5,8–11} Concerning the use of itraconazole, some authors have reported variable patterns of susceptibility of the *C. haemulonii* complex to this antifungal.^{3,5,8,10} In disagreement with the published literature, the majority (≈67%) of the isolates of the *C. haemulonii* complex studied here were resistant to voriconazole.

Cendejas-Bueno et al.⁹ observed a subtle difference in azole MICs among the species of the *C. haemulonii* complex, in which *C. haemulonii* showed higher MICs than the others, especially of itraconazole and voriconazole. In this regard, we demonstrated that 100% and 80% of *C. haemulonii* isolates were resistant to itraconazole and voriconazole, respectively, while 50% of *C. duobushaemulonii* and 33.3% of *C. haemulonii* var. *vulnera* were resistant to both antifungal agents. It is remarkable that three out of four isolates (75%) dose-dependently susceptible to itraconazole were also susceptible to voriconazole. Although echinocandins are highly active against *C. haemulonii* complex,^{3,10} isolates resistant to this antifungal class have been reported.^{6,9}

During recent decades, there has been a change in the epidemiology of *Candida* infections, characterized by a progressive shift from a predominance of *C. albicans* to non-*albicans* *Candida* species.²⁰ As a consequence, new *Candida* species have appeared and been recognized as potential pathogens, being described as emerging fungi, some of them innately resistant to commonly used antifungal drugs.²⁰ Therefore, rapid and correct identification of *Candida* species has become more important in deciding the appropriate starting treatment and providing optimal management of infections.²⁰ Overall, our results reinforce the importance of molecular identification in differentiating the species comprising the *C. haemulonii* complex. To date, very little is known regarding the clinical characteristics and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates of the *C. haemulonii* complex. Clinical experience with *C. haemulonii* complex infection is extremely limited; consequently, no treatment regimen for

invasive infections caused by these fungi has been clearly established. Antifungal susceptibility is a particularly relevant problem in managing invasive *C. haemulonii* complex infection due to its multidrug resistance profile, which represents a future therapeutic challenge to clinicians. Finally, continued surveillance regarding non-*albicans* *Candida* species, such as species of the *C. haemulonii* complex, both locally and on a regional and international basis, is clearly warranted.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Gilda M. B. Del Negro (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina e Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, Brazil) for donating a clinical isolate of *C. haemulonii* complex to the collection of fungi studied in this work.

Funding

This study was supported by grants from the Brazilian Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Automated sequencing was performed using the DNA sequencing platform (ABI-3730; Applied Biosystems) (PDTIS/FIOCRUZ—Rio de Janeiro, Brazil).

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

References

- 1 Gargeya IB, Pruitt WR, Meyer SA et al. *Candida haemulonii* from clinical specimens in the USA. *J Med Vet Mycol* 1991; **29**: 335–8.
- 2 Goswami R, Dadhwal V, Tejaswi S et al. Species-specific prevalence of vaginal candidiasis among patients with diabetes mellitus and its relation to their glycaemic status. *J Infect* 2000; **41**: 162–6.
- 3 Ruan SY, Kuo YW, Huang CT et al. Infections due to *Candida haemulonii*: species identification, antifungal susceptibility and outcomes. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**: 85–8.
- 4 Almeida JN Jr, Motta AL, Rossi F et al. First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. *Clinics* 2012; **67**: 1229–31.
- 5 Oberoi JK, Wattal C, Goel N et al. Non-*albicans* *Candida* species in blood stream infections in a tertiary care hospital at New Delhi, India. *Indian J Med Res* 2012; **136**: 997–1003.
- 6 Kim S, Ko KS, Moon SY et al. Catheter-related candidemia caused by *Candida haemulonii* in a patient in long-term hospital care. *J Korean Med Sci* 2011; **26**: 297–300.
- 7 Crouzet J, Sotto A, Picard E et al. A case of *Candida haemulonii* osteitis: clinical features, biochemical characteristics, and antifungal resistance profile. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**: 1068–70.
- 8 Khan ZU, Al-Sweih NA, Ahmad S et al. Outbreak of fungemia among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 2025–7.

- 9** Cendejas-Bueno E, Kolecka A, Alastruey-Izquierdo A *et al.* Reclassification of the *Candida haemulonii* complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: three multiresistant human pathogenic yeasts. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 3641–51.
- 10** Kim M, Shin JH, Sung H *et al.* *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 57–61.
- 11** Shin JH, Kim MN, Jang SJ *et al.* Detection of amphotericin B resistance in *Candida haemulonii* and closely related species by use of the Etest, Vitek-2 yeast susceptibility system, and CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 1852–5.
- 12** Lavarde V, Daniel F, Saez H *et al.* Peritonite mycosique a *Torulopsis haemulonii*. *Bull Soc Fr Mycol Med* 1984; **13**: 173–6.
- 13** Sugita T, Takashima M, Poonwan N *et al.* *Candida pseudohaemulonii* sp. nov., an amphotericin B- and azole-resistant yeast species, isolated from the blood of a patient from Thailand. *Microbiol Immunol* 2006; **50**: 469–73.
- 14** Satoh K, Makimura K, Hasumi Y *et al.* *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol* 2009; **53**: 41–4.
- 15** Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Third Informational Supplement M27-S3*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- 16** Hospenthal DR, Murray CK, Beckius ML *et al.* Persistence of pigment production by yeast isolates grown on CHROMagar *Candida* medium. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 4768–70.
- 17** Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL *et al.* Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 1366–77.
- 18** Xess I, Jain N, Hasan F *et al.* Epidemiology of candidemia in a tertiary care centre of north India: 5-year study. *Infection* 2007; **35**: 256–9.
- 19** Ramos LS, Barbedo LS, Braga-Silva LA *et al.* Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 2014; doi:10.1016/j.riam.2014.01.003.
- 20** Pfaller MA, Woosley LN, Messer SA *et al.* Significance of molecular identification and antifungal susceptibility of clinically significant yeasts and moulds in a global antifungal surveillance programme. *Mycopathologia* 2012; **174**: 259–71.

Different scenarios for *Candida parapsilosis* fungaemia reveal high numbers of mixed *C. parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* infections

Leonardo Silva Barbedo,¹ Catarina Vaz,² Célia Pais,²
 Maria Helena Galdino Figueiredo-Carvalho,¹ Mauro de Medeiros Muniz,¹
 Rosely Maria Zancope-Oliveira^{1†} and Paula Sampaio^{1†}

Correspondence

Paula Sampaio
 psampaio@bio.uminho.pt

¹Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA), Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Braga, Portugal

Nosocomial fungal bloodstream infections (BSI) are increasing significantly in hospitalized patients and *Candida parapsilosis* has emerged as an important pathogen responsible for numerous outbreaks. The objective of this study was to evaluate *C. parapsilosis sensu lato* infection scenarios, regarding species distribution and strain relatedness. One hundred isolates of *C. parapsilosis sensu lato* derived from blood cultures and catheter tips were analysed by multiplex microsatellite typing and by sequencing D1/D2 regions of the ribosomal DNA. Our results indicate that 9.5% of patients presented infections due to *C. parapsilosis* and *Candida orthopsilosis*, 57.1% due to *C. parapsilosis*, 28.3% due to *C. orthopsilosis* and 4.8% due to *Candida metapsilosis*. Eighty per cent of the *C. parapsilosis* BSIs were due to a single strain that was also identified in the catheter, but in 10% of the cases *C. parapsilosis* was identified in the catheter but the BSI was due to *C. orthopsilosis*. There is a significant probability that *C. parapsilosis* isolates collected from the same patient at more than 3 months interval are of different strains ($P=0.0179$). Moreover, several isolates were identified persistently in the same hospital, infecting six different patients. The incidence of polyfungal BSI infections with *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* is reported herein for the first time, emphasizing the fact that the species identified in the catheter is not always responsible for the BSI, thus impacting the treatment strategy. The observation that strains can remain in the hospital environment for years highlights the possible existence of reservoirs and reinforces the need for accurate genotyping tools, such as the markers used for elucidating epidemiological associations and detecting outbreaks.

Received 7 July 2014

Accepted 21 October 2014

INTRODUCTION

The incidence of candidaemia continues to increase, particularly in hospitalized patients. Due to the substantial morbidity and mortality associated with these infections it is clear that fungal diseases have emerged as important public health problems (Pfaller & Diekema, 2007). While *Candida albicans* remains the most common causative agent of candidaemia, the incidence of *Candida parapsilosis* has increased significantly, outranking *C. albicans* in some

studies, depending on the period and geographical area (Aittakorpi *et al.*, 2012; Lagrou *et al.*, 2007; Lockhart *et al.*, 2012; Maganti *et al.*, 2011; Nucci *et al.*, 2013; Parmeland *et al.*, 2013; Tragiannidis *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2011; Xess *et al.*, 2007). Candidaemia risk factors include the use of broad-spectrum antibiotics, cancer chemotherapy, immunosuppressive agents and indwelling medical devices (Tumbarello *et al.*, 2007). Nosocomial fungaemia due to *C. parapsilosis* is mainly associated with the presence of a central venous catheter, and with the use of parenteral nutrition (Barchiesi *et al.*, 2004). Although the primary reservoir in the hospital setting is unknown, *C. parapsilosis* carriage on the skin of healthy individuals, particularly on the hands of health care workers, and hospital environmental surfaces has been consistently observed (Lupetti *et al.*, 2002; Sabino *et al.*, 2011; Vaz *et al.*, 2011). Although frequently associated with neonates and the use of

†These authors contributed equally to this work

Abbreviations: BSI, bloodstream infection; DP, discriminatory power; HSE, Hospital dos Servidores do Estado; HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto; SAM, Hospital Samaritano.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the D1/D2 region of the 28S rRNA gene sequence of the isolates described in this study are KJ817066 to KJ817165.

parenteral nutrition (Dizbay *et al.*, 2008), *C. parapsilosis* has also been frequently identified in adult intensive care units, surgery and internal medicine departments (Diab-Elschahawi *et al.*, 2012). The discrimination of *C. parapsilosis* strains is fundamental not only for the rapid identification of the strains involved in the infection but also to clarify nosocomial cross-transmission and possible routes of transmission in hospital settings (van Asbeck *et al.*, 2009). Since the description of a microsatellite multiplex strategy for *C. parapsilosis* strain differentiation (Sabino *et al.*, 2010), this method has been applied in several studies mainly regarding outbreaks (Diab-Elschahawi *et al.*, 2012; Romeo *et al.*, 2013; Vaz *et al.*, 2011) and is described as the most discriminatory method for *C. parapsilosis* strain differentiation. Herein, we used this method to genotype presumed *C. parapsilosis* isolates involved in fungaemia episodes from three hospitals in Brazil and to determine the patterns of relatedness of the isolates, including the pair identified in the bloodstream/catheter.

METHODS

Strains. During the period August 2002 to April 2006 at Hospital dos Servidores do Estado (HSE), 76 strains were isolated from 42 patients and were identified as *C. parapsilosis sensu lato*. For comparison, an additional 20 strains from Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) isolated before the year 2000 were also studied, although no patient's information was available, as well as four isolates from Hospital Samaritano (SAM). In total, 100 isolates of *C. parapsilosis sensu lato* derived from blood cultures and catheter tips from patients admitted at three different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil, between 1998 and 2006, were analysed (Table 1). These isolates were stored in 40% (v/v) glycerol at -80°C at the yeast stock collection of the Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil.

Species identification. The isolates were phenotypically identified as *C. parapsilosis sensu lato* at the hospital of origin using VITEK 2 and API 20 C AUX systems (bioMérieux) following the manufacturer's instructions. Molecular identification at the species level was performed by sequencing the D1/D2 region of the 28S rRNA gene (Asadzadeh *et al.*, 2009). Sequences were edited with the Sequencer version 4.9 software package (Genes Codes Corporation), aligned with MEGA version 4.0.2 software and compared by BLAST with sequences available from NCBI GenBank.

Microsatellite multilocus PCR amplification and fragment size determination. Isolates identified as *C. parapsilosis* were further discriminated by multilocus microsatellite amplification. Cultures were grown at 30°C for 2 days on YPD agar plates. Cells for colony PCR were prepared as described by Vaz *et al.* (2011). The primers, PCR amplification conditions and the allele size determination by GENESCAN (version 3.7) analysis after a run on an ABI PRISM 310 genetic analyser (Applied Biosystems) were as described previously (Sabino *et al.*, 2010) with some modifications as described by Vaz *et al.* (2011), namely the redesign of one primer. Fragment sizes were determined automatically using GENESCAN 3.5 analysis software. The discriminatory power (DP) of the method was calculated as described by Hunter & Gaston (1988).

Data analysis. A distance matrix was generated using the Cavalli-Sforza & Edwards method (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) with

Populations software (version 1.2.28) and the dendrogram was constructed by the unweighted pair group method in NTSYSpc software (version 2.02; Applied Biostatistics). Categorical data were analysed using Fisher's exact test, unless stated in the text. Results were considered statistically significant when *P*-values were lower than 0.05.

RESULTS

Identification of *C. parapsilosis sensu lato* isolates and epidemiology

A total of 100 isolates from *C. parapsilosis sensu lato* fungaemia were analysed in this study. The majority of the isolates were derived from the HSE (76%) while 20% were derived from the HUPE and only 4% from the SAM. Isolates included 83 from blood cultures and 17 from catheter tips (Table 1). Genotyping isolates with the microsatellite multiplex failed to amplify all markers in 39 isolates. Since this multiplex strategy is specific to *C. parapsilosis sensu stricto* (Sabino *et al.*, 2010), all the isolates were sequenced. Sequencing showed that 37 strains were *Candida orthopsilosis*, two were *Candida metapsilosis* and the remaining 61 were *C. parapsilosis* (Table 1). All sequences showed 100% identity. The majority of the *C. orthopsilosis* isolates (29 isolates) derived from the HSE, while the eight isolates remaining were obtained from patients attending the HUPE. These isolates were obtained from 19 adult patients and seven children. All *C. metapsilosis* isolates were identified in patients from the HSE. Thus, considering all isolates, 61% were *C. parapsilosis*, 37% were *C. orthopsilosis* and 2% were *C. metapsilosis*.

Considering only the isolates from the HSE, we determined that 57.1% (24 from 42) of patients presented fungaemia due to *C. parapsilosis*, 28.6% (12 from 42) due to *C. orthopsilosis* and 4.8% (2 from 42) due to *C. metapsilosis*. Curiously, in the HSE *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* were isolated from the same patient in 9.5% (4 from 42) of patients. All cases of polyfungal infection were observed in male patients, but no significant difference ($P>0.05$) in species distribution was observed between the two sexes. Three of these polyfungal infections occurred in children and one in an adult patient. Likewise, no significant difference was observed ($P>0.05$) regarding species isolation considering the different years of isolation (from August 2002 to April 2006). It was not possible to perform these analyses with isolates from the HUPE since patient information was incomplete. All patients under 18 years old (nine children) were from the HUPE and 78% were infected with *C. orthopsilosis* (Table 1).

Microsatellite multiplex genotyping of *C. parapsilosis* isolates

Genotyping of all *C. parapsilosis sensu stricto* isolates with the microsatellite markers identified 39 multilocus genotypes of which 24 were observed only once (Table 1). The most prevalent genotype, MG1, was found in five isolates

Table 1. Characterization of all isolates analysed in this study

Patient no.	Isolate	Hospital	Origin	Gender	Age classification	Collection date	Species identification	GenBank accession no.	Microsatellite fragment (bp)				MG	Dendrogram code
									CP1	CP4a	CP6	B		
									all1 : all2	all1 : all2	all1 : all2	all1 : all2		
1	072	HSE	Blood	M	Adult	13/1/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817137	NA	NA	NA	NA	-	-
	074	HSE	Blood			13/1/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817139	NA	NA	NA	NA	-	-
	075	HSE	Blood			9/2/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817140	NA	NA	NA	NA	-	-
2	095	HSE	Blood	F		29/10/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817160	219 : 261	251 : 251	252 : 288	147 : 149	MG-6	095HSEb02
3	088	HSE	Blood	F	Adult	10/1/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817153	237 : 243	299 : 299	297 : 327	129 : 129	MG-9	088HSEb03
4	083	HSE	Blood	M	Adult	9/6/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817148	240 : 243	NA	273 : 303	127 : 139	MG-16	083HSEb04
	084	HSE	Blood			1/7/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817149	240 : 243	NA	273 : 303	127 : 139	MG-16	084HSEb04
5	001	HSE	Blood	F	Adult	19/12/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817066	189 : 240	236 : 236	315 : 315	165 : 167	MG-1	001HSEb05
	002	HSE	Blood			19/12/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817067	189 : 240	236 : 236	315 : 315	165 : 167	MG-2	002HSEb05
6	013	HSE	Catheter	F	Adult	6/11/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817078	189 : 240	236 : 236	315 : 315	165 : 167	MG-1	013HSEc06
	057	HSE	Blood			28/10/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817122	189 : 240	236 : 236	315 : 315	165 : 167	MG-1	057HSEb06
	058	HSE	Blood			6/11/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817123	189 : 240	236 : 236	315 : 315	165 : 167	MG-1	058HSEb06
7	089	HSE	Blood	M	Adult	10/1/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817154	NA	NA	NA	NA	-	-
8	012	HSE	Catheter	M	Adult	11/9/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817077	240 : 240	239 : 239	294 : 294	121 : 121	MG-12	012HSEc08
9	078	HSE	Blood	M	Child	5/5/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817143	NA	NA	NA	NA	-	-
	079	HSE	Blood			6/5/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817144	NA	NA	NA	NA	-	-
10	077	HSE	Blood	M	Child	9/3/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817142	243 : 243	236 : 236	300 : 300	111 : 111	MG-28	077HSEb10
11	027	HSE	Catheter	M	Child	29/10/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817092	243 : 261	242 : 242	354 : 360	129 : 129	MG-37	027HSEc11
	096	HSE	Blood			21/11/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817161	NA	NA	NA	NA	-	-
	097	HSE	Blood			5/12/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817162	NA	NA	NA	NA	-	-
	098	HSE	Blood			1/2/2006	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817163	240 : 240	236 : 236	264 : 267	145 : 145	MG-10	098HSEb11
12	006	HSE	Blood	M	Child	14/4/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817071	NA	NA	NA	NA	-	-
	017	HSE	Catheter			14/4/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817082	NA	NA	NA	NA	-	-
13	024	HSE	Catheter	M	Child	8/8/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817089	243 : 246	299 : 302	285 : 291	127 : 129	MG-35	024HSEc13
	092	HSE	Blood			8/8/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817157	NA	NA	NA	NA	-	-
	093	HSE	Blood			23/8/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817158	243 : 246	299 : 302	285 : 291	127 : 129	MG-35	093HSEb13
14	023	HSE	Catheter	M	Child	28/7/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817088	240 : 240	236 : 236	264 : 267	145 : 145	MG-10	023HSEc14
	091	HSE	Blood			28/7/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817156	NA	NA	NA	NA	-	-
15	010	HSE	Blood	M	Child	1/2/2006	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817075	240 : 243	332 : 341	270 : 303	127 : 139	MG-23	010HSEb15
	011	HSE	Blood			1/2/2006	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817076	240 : 243	332 : 341	270 : 303	127 : 139	MG-23	011HSEb15
16	056	HSE	Blood	M	Child	29/8/2002	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817121	NA	NA	NA	NA	-	-
17	018	HSE	Catheter	M	Child	2/1/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817083	NA	NA	NA	NA	-	-
	067	HSE	Blood			26/12/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817132	NA	NA	NA	NA	-	-
	068	HSE	Blood			11/2/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817133	NA	NA	NA	NA	-	-
	071	HSE	Blood			2/1/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817136	NA	NA	NA	NA	-	-
18	020	HSE	Catheter	M	Child	12/8/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817085	243 : 243	236 : 236	291 : 294	131 : 131	MG-27	020HSEc18
	085	HSE	Blood			26/7/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817150	243 : 243	236 : 236	291 : 294	131 : 131	MG-27	085HSEb18

Table 1. cont.

Patient no.	Isolate	Hospital	Origin	Gender	Age classification	Collection date	Species identification	GenBank accession no.	Microsatellite fragment (bp)				MG	Dendrogram code
									CP1	CP4a	CP6	B		
									all1 : all2	all1 : all2	all1 : all2	all1 : all2		
19	025	HSE	Catheter	M	Adult	23/8/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817090	240 : 243	332 : 341	270 : 303	127 : 139	MG-23	025HSEc19
	094	HSE	Blood			23/8/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817159	NA	NA	NA	NA	—	—
20	021	HSE	Catheter	F	Adult	12/8/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817086	207 : 240	239 : 239	312 : 312	129 : 131	MG-4	021HSEc20
21	029	SAM	Blood	M	Adult	6/9/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817094	207 : 240	236 : 236	282 : 282	131 : 133	MG-3	029SAMb21
22	065	HSE	Blood	M	Adult	10/11/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817130	NA	NA	NA	NA	—	—
23	087	HSE	Blood	M	Adult	24/9/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817152	NA	NA	NA	NA	—	—
24	064	HSE	Blood	F	Adult	17/6/2003	<i>C. metapsilosis</i>	KJ817129	NA	NA	NA	NA	—	—
25	059	HSE	Blood	F	Adult	3/2/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817124	NA	NA	NA	NA	—	—
26	099	HSE	Blood	F	Adult	3/4/2006	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817164	243 : 243	296 : 296	264 : 324	129 : 157	MG-31	099HSEb26
27	003	HSE	Blood	M	Adult	20/2/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817068	243 : 243	299 : 299	264 : 342	129 : 157	MG-32	003HSEb27
	014	HSE	Catheter			20/2/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817079	243 : 243	299 : 299	264 : 342	129 : 157	MG-32	014HSEc27
	054	HSE	Blood			29/8/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817119	240 : 240	272 : 272	273 : 273	103 : 103	MG-14	054HSEb27
	055	HSE	Blood			29/8/2002	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817120	240 : 240	272 : 272	273 : 273	103 : 103	MG-14	055HSEb27
	080	HSE	Blood	M	Adult	20/5/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817145	240 : 243	NA	267 : 270	143 : 145	MG-15	080HSEb28
29	061	HSE	Blood	M	Adult	28/2/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817126	240 : 243	269 : 302	270 : 303	127 : 127	MG-20	061HSEb29
	063	HSE	Blood			12/5/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817128	243 : 243	236 : 236	273 : 291	131 : 131	MG-26	063HSEb29
30	032	SAM	Blood	F	Adult	7/10/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817097	207 : 240	236 : 236	276 : 282	131 : 133	MG-2	032SAMb30
31	066	HSE	Blood	F	Adult	14/11/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817131	NA	NA	NA	NA	—	—
32	009	HSE	Blood	F	Adult	1/2/2006	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817074	240 : 243	332 : 332	270 : 303	127 : 139	MG-22	009HSEb32
33	019	HSE	Catheter	F	Adult	27/2/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817084	240 : 240	239 : 239	279 : 312	109 : 109	MG-11	019HSEc33
	076	HSE	Blood			27/2/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817141	240 : 240	239 : 239	294 : 312	109 : 109	MG-13	076HSEb33
34	081	HSE	Blood	F	Adult	2/6/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817146	243 : 243	290 : 290	291 : 291	131 : 131	MG-30	081HSEb34
35	004	HSE	Blood	M	Adult	20/2/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817069	NA	NA	NA	NA	—	—
	016	HSE	Catheter			28/2/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817081	NA	NA	NA	NA	—	—
	060	HSE	Blood			20/2/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817125	NA	NA	NA	NA	—	—
	062	HSE	Blood			28/2/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817127	NA	NA	NA	NA	—	—
	005	HSE	Blood	M	Adult	28/2/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817070	243 : 243	365 : 365	210 : 306	129 : 129	MG-34	005HSEb36
36	015	HSE	Catheter			28/2/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817080	243 : 243	365 : 365	210 : 306	129 : 129	MG-34	015HSEc36
	082	HSE	Blood	F	Adult	3/6/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817147	264 : 264	236 : 236	273 : 273	143 : 143	MG-39	082HSEb37
37	100	HSE	Blood	M	Adult	29/10/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817165	207 : 240	281 : 311	282 : 312	133 : 133	MG-5	100HSEb38
39	007	HSE	Blood	F	Adult	29/9/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817072	234 : 243	287 : 296	297 : 297	131 : 131	MG-8	007HSEb39
	008	HSE	Blood			29/9/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817073	234 : 243	287 : 296	297 : 297	131 : 131	MG-8	008HSEb39
	026	HSE	Catheter			29/9/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817091	234 : 243	287 : 290	297 : 297	131 : 131	MG-7	026HSEc39
40	028	HSE	Blood	F	Adult	19/12/2002	<i>C. metapsilosis</i>	KJ817093	NA	NA	NA	NA	—	—
41	022	HSE	Catheter	F	Adult	24/9/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817087	240 : 243	341 : 341	270 : 303	127 : 139	MG-24	022HSEc41
42	030	SAM	Blood	M	Adult	6/9/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817095	240 : 243	329 : 329	270 : 303	127 : 139	MG-21	030SAMb42
	031	SAM	Catheter			6/9/2005	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817096	240 : 243	332 : 332	270 : 303	127 : 139	MG-22	031SAMc42
43	053	HSE	Blood	M	Adult	29/8/2002	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817118	NA	NA	NA	NA	—	—

Table 1. cont.

Patient no.	Isolate	Hospital	Origin	Gender	Age classification	Collection date	Species identification	GenBank accession no.	Microsatellite fragment (bp)				MG	Dendrogram code
									CP1	CP4a	CP6	B		
									all1 : all2	all1 : all2	all1 : all2	all1 : all2		
44	069	HSE	Blood	M	Adult	29/12/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817134	243 : 243	251 : 251	252 : 252	145 : 161	MG-29	069HSEb44
	070	HSE	Blood			30/12/2003	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817135	243 : 243	251 : 251	252 : 252	145 : 161	MG-29	070HSEb44
	073	HSE	Blood			13/1/2004	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817138	243 : 243	251 : 251	252 : 252	145 : 161	MG-29	073HSEb44
-	086	HSE	Blood	-	Adult	-	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817151	NA	NA	NA	NA	-	-
-	090	HSE	Blood	-	Adult	-	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817155	NA	NA	NA	NA	-	-
-	033	HUPE	Blood	-	Adult	-/-/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817098	NA	NA	NA	NA	-	-
-	034	HUPE	Blood	-	Adult	2/9/1999	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817099	NA	NA	NA	NA	-	-
-	035	HUPE	Blood	-	Adult	-/-/1998	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817100	246 : 246	299 : 299	243 : 303	129 : 147	MG-38	035HUPb00
-	036	HUPE	Blood	-	Adult	-/-/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817101	NA	NA	NA	NA	-	-
-	037	HUPE	Blood	-	Adult	-/-/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817102	NA	NA	NA	NA	-	-
-	038	HUPE	Blood	-	Adult	-/-/1998	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817103	240 : 243	245 : 272	273 : 273	133 : 133	MG-19	038HUPb00
-	039	HUPE	Blood	-	Adult	23/9/1999	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817104	240 : 243	233 : 233	255 : 255	127 : 127	MG-17	039HUPb00
-	040	HUPE	Blood	-	Adult	23/9/1999	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817105	240 : 243	233 : 254	255 : 255	127 : 127	MG-18	040HUPb00
-	041	HUPE	Blood	-	Adult	2/9/1999	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817106	240 : 243	233 : 254	255 : 255	127 : 127	MG-18	041HUPb00
-	042	HUPE	Blood	-	Adult	23/9/1999	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817107	243 : 249	299 : 302	288 : 303	105 : 127	MG-36	042HUPb00
-	043	HUPE	Blood	-	Adult	2/9/1999	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817108	243 : 249	299 : 302	288 : 303	105 : 127	MG-36	043HUPb00
-	044	HUPE	Blood	-	Adult	2/9/1999	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817109	243 : 243	329 : 329	285 : 306	129 : 129	MG-33	044HUPb00
-	045	HUPE	Blood	-	Adult	-/-/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817110	NA	NA	NA	NA	-	-
-	046	HUPE	Blood	-	Adult	-/-/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817111	NA	NA	NA	NA	-	-
-	047	HUPE	Blood	-	Adult	-/-/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817112	NA	NA	NA	NA	-	-
-	048	HUPE	Blood	-	Adult	-/-/1998	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817113	243 : 243	212 : 236	303 : 303	111 : 111	MG-25	048HUPb00
-	049	HUPE	Blood	-	Adult	-/-/1998	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817114	243 : 243	212 : 236	303 : 303	111 : 111	MG-25	049HUPb00
-	050	HUPE	Blood	-	Adult	-/-/1998	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817115	243 : 243	212 : 236	303 : 303	111 : 111	MG-25	050HUPb00
-	051	HUPE	Blood	-	Adult	-/-/1998	<i>C. parapsilosis</i>	KJ817116	243 : 243	212 : 236	303 : 303	111 : 111	MG-25	051HUPb00
-	052	HUPE	Blood	-	Adult	-/-/1998	<i>C. orthopsilosis</i>	KJ817117	NA	NA	NA	NA	-	-

-, No information available; all1, allele 1; all2, allele 2; MG, multilocus genotype; NA, no amplification; adult, >18 years old; child, <18 years old.

and was retrieved from two patients. Considering only independent isolates (the first *C. parapsilosis* strain isolated from each patient), the combined DP of the multiplex was 0.99, which is in agreement with previous studies (Diab-Elschahawi *et al.*, 2012; Sabino *et al.*, 2010). In this study, isolates with the same allelic combination at all micro-satellite markers correspond to genetically similar strains and were defined as identical, while isolates with distinct allelic combinations at more than one locus correspond to genetically dissimilar strains and were considered different strains. The remaining cases, with minor changes in only one locus, were considered as micro-variations.

In order to analyse strain relatedness, the multiple isolates collected from the same patient were grouped (Table 2). First, we observed that 12 of these patients were infected exclusively with *C. parapsilosis*, five with *C. orthopsilosis* and four with both *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis*. These two species were isolated on the same day in all four patients except patient 11, so the majority of these infections may be considered polyfungal. Curiously, in patients infected only with *C. orthopsilosis* (patients 12, 17 and 35), this species was also isolated from the catheter; however, when *C. parapsilosis* was also present (patients 11, 13, 14 and 19) the species isolated from the catheter was always *C. parapsilosis*.

Analysing *C. parapsilosis* strain relatedness from patients with catheter and blood cultures isolates, we observed that five patients showed identical bloodstream and catheter strains (patients 6, 13, 18, 27 and 36), three showed micro-variations in the pair bloodstream/catheter strains (patients 33, 39 and 42) and two presented different strains (patients 11 and 27). If the identical and microvariant cases are grouped, 80% of *C. parapsilosis* bloodstream/catheter pairs showed similar strains. Indeed, there is a statistical probability ($\chi^2=4.00$, $P=0.04$) that the strain observed in the catheter will also be present in the blood culture. However, when Yates' correction was applied this association was no longer significant ($\chi^2=1.78$, $P=0.18$). Although the cases of microvariation observed in this study were associated with the presence of a catheter, the isolation dates were the same so it was impossible to determine whether microvariation occurred in the catheter strain.

Regarding the relatedness of *C. parapsilosis* strains isolated at different collection dates, regardless of the presence or absence of a catheter in patients that maintained the infecting strain (patients 4, 6, 13, 18 and 44), the collection dates were always within 1 month (Table 2). On the contrary, in all cases in which a strain replacement was observed (patients 11, 27 and 29) the collection dates were always greater than 3 months. We observed that the probability of strain replacement within 3 to 6 months was statistically significant ($P=0.0179$), suggesting that in these infections *C. parapsilosis* strains were mainly acquired from the environment. One example was patient 11: a *C. parapsilosis*-positive catheter culture was collected on day 1 with no positive blood culture, in the following 2-month period two

blood cultures were positive for *C. orthopsilosis* and a third blood culture was positive for a completely different *C. parapsilosis* strain; these two *C. parapsilosis* strains were collected 3 months apart. The presence of *C. orthopsilosis* (patients 11 and 13), did not affect this correlation.

Clustering of *C. parapsilosis* isolates

When strains were compared regardless of their origin, we observed that different patients shared similar strains (Fig. 1). Patient 6 presented a positive blood culture with isolate 057 and one month later the same strain was present in the catheter and again in the blood (Table 1). More than a month after this episode, patient 5, from the same hospital, was infected with a similar strain (001). Other patients from the same hospital, patients 14 and 11, also presented strains with the same multilocus genotype (MG-10), collected approximately 7 months apart (023 and 098). Similarly, patients 19 and 15 from the same hospital shared strains with MG-23 (010 and 025), collected almost 18 months apart (23 August 2004 and 1 February 2006). Curiously, patients 42 and 32, from different hospitals, also showed strains with the same multilocus genotype (MG-22; isolates 009 and 031) collected 5 months apart (6 September 2005 and 1 February 2006). Interestingly, MG-22 and MG-23 differ only at locus CP4a and are considered microvariants. In addition, MG-24 observed in isolate 022 from patient 41 and MG-21 in isolate 030 from patient 42 may also be considered microvariants of MG-22 and MG-23 (Table 1). These observations suggest that isolates with multilocus genotypes similar to isolate 25 (MG-23), the first to be isolated, have been persistently isolated in hospital settings over the period August 2004 to February 2006, affecting six different patients (Fig. 1). Similar cases of micro-variation in different patients from the same hospital were observed: isolate 029 from patient 21 (MG-3) and one month later in isolate 032 from patient 30 (MG-2), and isolate 062 from patient 29 (MG-26) and 14 months later the microvariant MG-27 in isolate 085 from patient 18. Considering that the patients in this study are not related, we cannot exclude the hypothesis of cross-contamination of patients by the hands of healthcare personnel, as extensively reported in other studies (Lupetti *et al.*, 2002; Vaz *et al.*, 2011). Isolates 039 and 040 or 041 are also considered microvariants. However, due to the lack of information regarding patients' identity these may not be considered as possible cross-contaminants.

DISCUSSION

The incidence of *Candida* in bloodstream infections has been reported to be higher in Brazil than in the USA or Europe, where *C. parapsilosis* has now become, respectively, the second and third most common aetiological agent of these infections after *C. albicans* (Colombo *et al.*, 1999; Dizbay *et al.*, 2008; Hajjeh *et al.*, 2004). However, more recently some European regions, including southern

Table 2. Genotypes obtained with microsatellites CP1, CP4a, CP6 and B in *C. parapsilosis* isolates from blood cultures and catheters

Patient	Hospital	Origin	Collection date	MG or species identified	<i>C. parapsilosis</i> multilocus genotype (bp) CP1, CP4a, CP6 and B (all1 : all2)
Patient with catheter and bloodstream isolates					
6	HSE	Blood	28/10/2002	MG-1	189 : 240 236 : 236 315 : 315 165 : 167
		Catheter	06/11/2002	MG-1	189 : 240 236 : 236 315 : 315 165 : 167
		Blood	06/11/2002	MG-1	189 : 240 236 : 236 315 : 315 165 : 167
11	HSE	Catheter	29/10/2005	MG-37	243 : 261 242 : 242 354 : 360 129 : 129
		Blood	21/11/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
		Blood	05/12/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
12	HSE	Blood	01/02/2006	MG-10	240 : 240 236 : 236 264 : 267 145 : 145
		Catheter	14/04/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
		Blood	14/04/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
13	HSE	Catheter	08/08/2005	MG-35	243 : 246 299 : 302 285 : 291 127 : 129
		Blood	08/08/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
		Blood	23/08/2005	MG-35	243 : 246 299 : 302 285 : 291 127 : 129
14	HSE	Catheter	28/07/2005	MG-10	240 : 240 236 : 236 264 : 267 145 : 145
		Blood	28/07/2005	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
17	HSE	Blood	26/12/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
		Catheter	02/01/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
		Blood	02/01/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
18	HSE	Blood	11/02/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
		Blood	26/07/2004	MG-27	243 : 243 236 : 236 291 : 294 131 : 131
		Catheter	12/08/2004	MG-27	243 : 243 236 : 236 291 : 294 131 : 131
19	HSE	Catheter	23/08/2004	MG-23	240 : 243 332 : 341 270 : 303 127 : 139
		Blood	23/08/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
27	HSE	Blood	29/08/2002	MG-14	240 : 240 272 : 272 273 : 273 103 : 103
		Catheter	20/02/2003	MG-32	243 : 243 299 : 299 264 : 342 129 : 157
		Blood	20/02/2003	MG-32	243 : 243 299 : 299 264 : 342 129 : 157
33	HSE	Catheter	27/02/2004	MG-11	240 : 240 239 : 239 279 : 312 109 : 109
		Blood	27/02/2004	MG-13	240 : 240 239 : 239 294 : 312 109 : 109
35	HSE	Blood	20/02/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
		Catheter	28/02/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
		Blood	28/02/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
36	HSE	Catheter	28/02/2003	MG-34	243 : 243 365 : 365 210 : 306 129 : 129
		Blood	28/02/2003	MG-34	243 : 243 365 : 365 210 : 306 129 : 129
39	HSE	Catheter	29/09/2005	MG-7	234 : 243 287 : 290 297 : 297 131 : 131
		Blood	29/09/2005	MG-8	234 : 243 287 : 296 297 : 297 131 : 131
42	SAM	Catheter	06/09/2005	MG-22	240 : 243 332 : 332 270 : 303 127 : 139
		Blood	06/09/2005	MG-21	240 : 243 329 : 329 270 : 303 127 : 139
Patients with only bloodstream isolates					
1		Blood	13/01/2003	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
		Blood	09/02/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
4		Blood	09/06/2004	MG-16	240 : 243 000 : 000 273 : 303 127 : 139
		Blood	01/07/2004	MG-16	240 : 243 000 : 000 273 : 303 127 : 139
5		Blood	19/12/2002	MG-1	189 : 240 236 : 236 315 : 315 165 : 167
9		Blood	05/05/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
		Blood	06/05/2004	<i>C. orthopsilosis</i>	ND
15		Blood	01/02/2006	MG-23	240 : 243 332 : 341 270 : 303 127 : 139
29		Blood	28/02/2003	MG-20	240 : 243 269 : 302 270 : 303 127 : 127
		Blood	12/05/2003	MG-26	243 : 243 236 : 236 273 : 291 131 : 131
44		Blood	29/12/2003	MG-29	243 : 243 251 : 251 252 : 252 145 : 161
		Blood	30/12/2003	MG-29	243 : 243 251 : 251 252 : 252 145 : 161
		Blood	13/01/2003	MG-29	243 : 243 251 : 251 252 : 252 145 : 161

MG, multilocus genotype; all1, allele 1; all2, allele 2; ND, not determined.

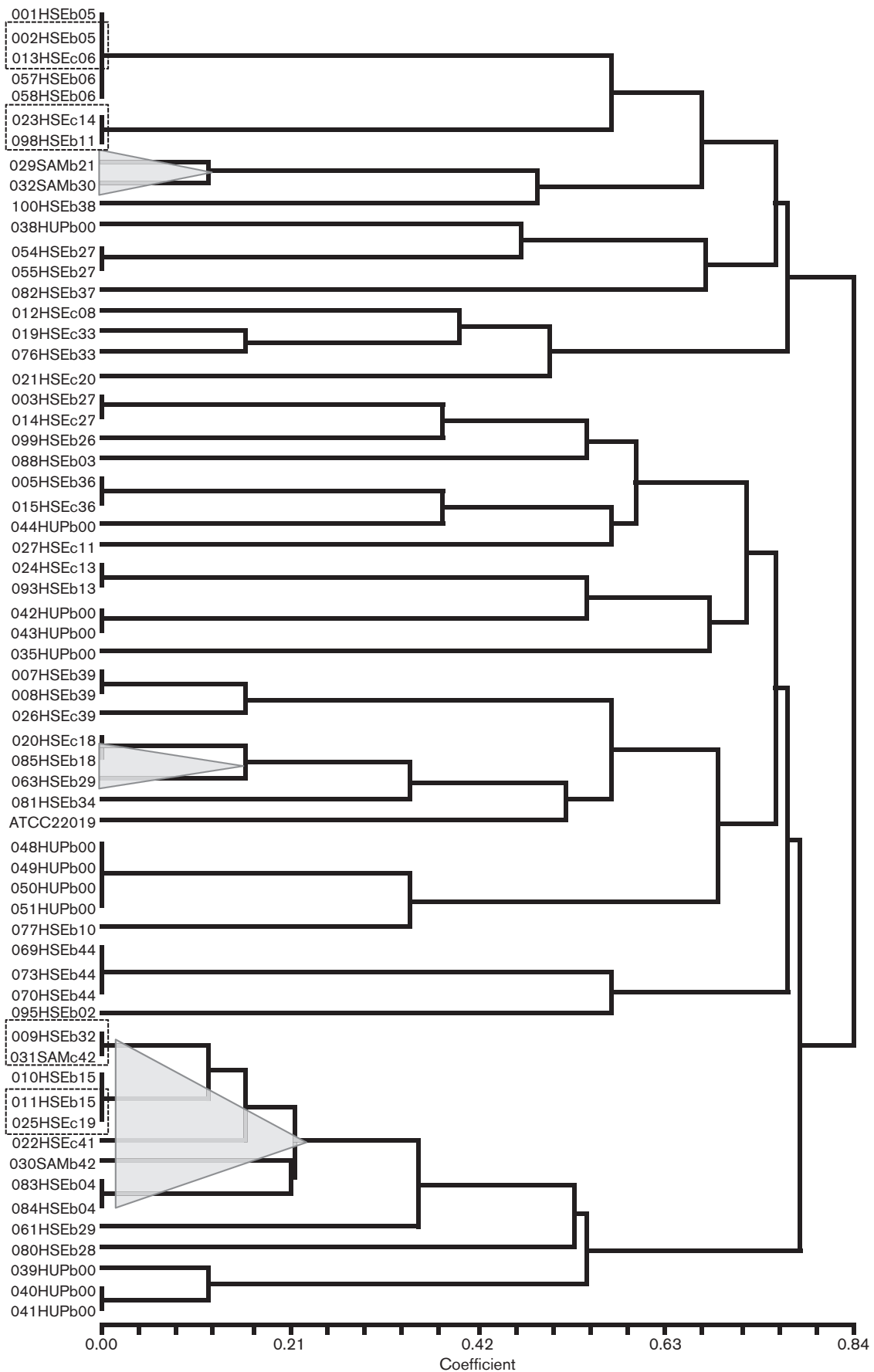


Fig. 1. Dendrogram showing relationships among 61 *Candida parapsilosis* isolates based on multilocus microsatellite genotypes. Dashed boxes represent strains from different patients sharing the same multilocus genotypes, and triangles represent microvariant strains from different patients. The isolates are represented by a code that includes the isolate number (000–100), followed by the hospital of origin (HSE, HUP or SAM), by the letter b (for blood) or c (for catheter), and finally the patient number (01–44; 00 denotes no information available).

Italy, have reported bloodstream incidences for *C. parapsilosis* infection of around 60%, similar to those observed in Brazil (Delfino *et al.*, 2014). Moreover, the distribution of *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* as agents of invasive infections has marked variability. In this study, we report an overall prevalence of 37% for *C. orthopsilosis* and 2% for *C. metapsilosis* among *C. parapsilosis sensu lato* isolates. The majority of the patients analysed in this study were from the HSE and in this hospital the incidence was 28.6% for *C. orthopsilosis* and 4.8% for *C. metapsilosis*. These values are higher than those described in a multi-centre surveillance study conducted in Brazil between 2003 and 2004 (*C. orthopsilosis* was 9% and *C. metapsilosis* was 3%; Gonçalves *et al.*, 2010), and those in a Spanish multi-centre study that reported 8.2% of *C. orthopsilosis* and 1.1% of *C. metapsilosis* (Cantón *et al.*, 2011). Our values are relatively similar to those recorded in a Spanish study in which 23.5% of *C. orthopsilosis* and 2.1% of *C. metapsilosis* were found (García-Effron *et al.*, 2012). Nevertheless, it is known that the incidence of *C. parapsilosis sensu lato* infections varies according to multiple factors, such as the age and underlying disease of patients, geographical location of the hospitals studied and climatic and socio-economic conditions.

A significant finding of this study was the observation that the same patient can simultaneously have *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis*. Indeed in 9.5% of patients from the HSE, both *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* were isolated and only in one case were the two species isolated on different dates. To our knowledge, there are few studies reporting polyfungal infections involving *C. parapsilosis sensu lato* species, and none from systemic infections. It has previously been reported that in superficial infections, 7.5% those that identified *C. parapsilosis* complex species were polyfungal (Feng *et al.*, 2012). However, all combined *C. parapsilosis* and *C. albicans* with *Candida tropicalis* or *Candida guilliermondii*. A previous study reported two cases of polyfungal infections (*C. albicans* and *Candida glabrata*) in 20 hospitalized patients with catheter-related candidaemia; however, none of the *C. parapsilosis* complex species was involved in polyfungal infections (Escribano *et al.*, 2014). It has been reported that polymicrobial BSIs are strongly associated with increased mortality (Kim *et al.*, 2013). Although there is no study to date regarding the survival of patients infected with *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis*, the identification of BSI due to more than one species is of extreme importance.

C. parapsilosis is notorious for the ability to form biofilms on catheters and other implanted devices (Tumbarello *et al.*, 2007), more so than the closely related species *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* (Lattif *et al.*, 2010). This

may explain why in all cases of polyfungal infection the species identified in the catheter was *C. parapsilosis* and never *C. orthopsilosis*. This was not due to the fact that *C. orthopsilosis* was not able to form biofilm, because when *C. orthopsilosis* was the only species present, in both blood culture and catheter, biofilm was identified in the catheter. This highlights the fact that the species identified in the catheter is not always that responsible for the BSI. In the last decade, antifungal susceptibility among *C. parapsilosis sensu lato* strains has been considered a matter of concern worldwide. The identification of one species in the catheter and another in the bloodstream gives a different perspective on the evaluation and use of antifungals. This may have been the case for our patient 11 that showed multiple BSIs due to *C. orthopsilosis* and *C. parapsilosis*, but the catheter was initially colonized with *C. parapsilosis*.

In the case where multiple isolates from the same patient were recovered, we observed that 80% of *C. parapsilosis* bloodstream/catheter pairs showed similar strains (identical and microvariants strains), indicating a high probability that the *C. parapsilosis* strain observed in the catheter will also be present in the blood culture. The occurrence of genetic changes in a strain has been described in catheter-colonizing isolates rather than in blood isolates, for *C. parapsilosis* (Romeo *et al.*, 2013) as well as for *C. albicans* (Shin *et al.*, 2004). However, regardless of their origin (blood or catheter), there was a statistically significant correlation between the identity of the isolate and the date of collection ($P=0.0179$). In samples that were collected less than 1 month apart the isolates were genetically related (identical or microvariants), while samples collected at more than 3 months' interval were genetically distinct. These observations suggest that *C. parapsilosis* BSI strains are mainly acquired from the environment. The identification in this study of genetically related isolates, persistently isolated from BSI occurring in different patients in the same hospital, sometimes over several years, further reinforces the environmental acquisition of these infections. The temporal persistence of single *C. parapsilosis* strains over long periods of time in the same hospital or ward has been described in other studies, and was also associated with outbreaks (Ásmundsdóttir *et al.*, 2008; Romeo *et al.*, 2013; Viviani *et al.*, 2006).

In conclusion, taking all our results together, five main scenarios for *C. parapsilosis* fungaemia were identified in this study: (i) monofungal infections due to all three species of the complex; (ii) polyfungal, always including *C. parapsilosis*; (iii) maintenance of the *C. parapsilosis* infecting strain when collection dates are less than three months apart;

(iv) replacement of the *C. parapsilosis* infecting strain when collection dates are more than three months apart; and (v) micro-variation in the pair bloodstream/catheter *C. parapsilosis* strains.

Although the detection of BSIs with *C. parapsilosis* should include alerts regarding security breaks in catheter care and infection control procedures, as previously reported, the identification of polyfungal infections and their consequences for treatment should also be considered an alert. The observation that strains can remain in the hospital environment for years is also an alert for the possible existence of specific reservoirs and reinforces the need for accurate genotyping tools, such as the microsatellite markers used, for both elucidating epidemiological associations and the detection of outbreaks.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support was provided by CAPES Foundation (BEX 19194/12-9), Ministry of Education of Brazil, Brasília (DF 70.040-020), by FEDER through POFC-COMPETE and by Portuguese funds from FCT (PEst-OE/BIA/UI4050/2014). R. M. Z.-O. is supported in part by CNPq (350338/2000-0) and FAPERJ E (26/103.157/2011). We are grateful to Ronaldo Rozembaum from HSE and SAM and Andréa Pussenti Derossi from HUPE for providing the *Candida* isolates and technical assistance in sampling. Automated sequencing was done using the genomic platform/DNA sequencing platform at Fundação Oswaldo Cruz, PDTIS/FIOCRUZ (RPT01A), Brazil. The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Aittakorpi, A., Kuusela, P., Koukila-Kähkölä, P., Vaara, M., Petrou, M., Gant, V. & Mäki, M. (2012). Accurate and rapid identification of *Candida* spp. frequently associated with fungemia by using PCR and the microarray-based Prove-it Sepsis assay. *J Clin Microbiol* **50**, 3635–3640.
- Asadzadeh, M., Ahmad, S., Al-Sweih, N. & Khan, Z. U. (2009). Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med Microbiol* **58**, 745–752.
- Ásmundsdóttir, L. R., Erlendsdóttir, H., Haraldsson, G., Guo, H., Xu, J. & Gottfredsson, M. (2008). Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. *Clin Infect Dis* **47**, e17–e24.
- Barchiesi, F., Caggiano, G., Falconi Di Francesco, L., Montagna, M. T., Barbuti, S. & Scalise, G. (2004). Outbreak of fungemia due to *Candida parapsilosis* in a pediatric oncology unit. *Diagn Microbiol Infect Dis* **49**, 269–271.
- Cantón, E., Pemán, J., Quindós, G., Eraso, E., Miranda-Zapico, I., Álvarez, M., Merino, P., Campos-Herrero, I., Marco, F. & other authors (2011). Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 5590–5596.
- Cavalli-Sforza, L. L. & Edwards, A. W. F. (1967). Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* **21**, 550–570.
- Colombo, A. L., Nucci, M., Salomão, R., Branchini, M. L., Richtmann, R., Derossi, A. & Wey, S. B. (1999). High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* **34**, 281–286.
- Delfino, D., Scordino, F., Pernice, I., Lo Passo, C., Galbo, R., David, A., Barberi, I., Criseo, G., Cascio, A. & Romeo, O. (2014). Potential association of specific *Candida parapsilosis* genotypes, bloodstream infections and colonization of health workers' hands. *Clin Microbiol Infect* doi: 10.1111/1469-0691.12685 [Epub ahead of print].
- Diab-Elschahawi, M., Forstner, C., Hagen, F., Meis, J. F., Lassnig, A. M., Presterl, E. & Klaassen, C. H. (2012). Microsatellite genotyping clarified conspicuous accumulation of *Candida parapsilosis* at a cardiothoracic surgery intensive care unit. *J Clin Microbiol* **50**, 3422–3426.
- Dizbay, M., Kalkanci, A., Sezer, B. E., Aktas, F., Aydogan, S., Fidan, I., Kustimur, S. & Sugita, T. (2008). Molecular investigation of a fungemia outbreak due to *Candida parapsilosis* in an intensive care unit. *Braz J Infect Dis* **12**, 395–399.
- Escribano, P., Guinea, J., Marcos-Zambrano, L. J., Martín-Rabadán, P., Fernández-Cruz, A., Sánchez-Carrillo, C., Muñoz, P. & Bouza, E. (2014). Is catheter-related candidemia a polyclonal infection? *Med Mycol* **52**, 411–416.
- Feng, X., Ling, B., Yang, G., Yu, X., Ren, D. & Yao, Z. (2012). Prevalence and distribution profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* responsible for superficial candidiasis in a Chinese university hospital. *Mycopathologia* **173**, 229–234.
- García-Effron, G., Canton, E., Pemán, J., Dilger, A., Romá, E. & Perlin, D. S. (2012). Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis sensu lato* species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. *J Antimicrob Chemother* **67**, 2739–2748.
- Gonçalves, S. S., Amorim, C. S., Nucci, M., Padovan, A. C., Briones, M. R., Melo, A. S. & Colombo, A. L. (2010). Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect* **16**, 885–887.
- Hajjeh, R. A., Sofair, A. N., Harrison, L. H., Lyon, G. M., Arthington-Skaggs, B. A., Mirza, S. A., Phelan, M., Morgan, J., Lee-Yang, W. & other authors (2004). Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* **42**, 1519–1527.
- Hunter, P. R. & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* **26**, 2465–2466.
- Kim, H. K., Park, Y. K., Wang, H. J., Kim, B. W., Shin, S. Y., Lim, S. K. & Choi, Y. H. (2013). Epidemiology and clinical features of post-transplant bloodstream infection: an analysis of 222 consecutive liver transplant recipients. *Infect Chemother* **45**, 315–324.
- Lagrou, K., Verhaegen, J., Peetermans, W. E., De Rijdt, T., Maertens, J. & Van Wijngaerden, E. (2007). Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**, 541–547.
- Lattif, A. A., Mukherjee, P. K., Chandra, J., Swindell, K., Lockhart, S. R., Diekema, D. J., Pfaller, M. A. & Ghannoum, M. A. (2010). Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol* **300**, 265–270.
- Lockhart, S. R., Iqbal, N., Cleveland, A. A., Farley, M. M., Harrison, L. H., Bolden, C. B., Baughman, W., Stein, B., Hollick, R. & other authors (2012). Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol* **50**, 3435–3442.
- Lupetti, A., Tavanti, A., Davini, P., Ghelardi, E., Corsini, V., Merusi, I., Boldrini, A., Campa, M. & Senesi, S. (2002). Horizontal transmission

- of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* **40**, 2363–2369.
- Maganti, H., Yamamura, D. & Xu, J. (2011).** Prevalent nosocomial clusters among causative agents for candidemia in Hamilton, Canada. *Med Mycol* **49**, 530–538.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Alvarado-Matute, T., Tiraboschi, I. N., Cortes, J., Zurita, J., Guzman-Blanco, M., Santolaya, M. E., Thompson, L. & other authors (2013).** Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS ONE* **8**, e59373.
- Parmeland, L., Gazon, M., Guerin, C., Argaud, L., Lehot, J. J., Bastien, O., Allaouchiche, B., Michallet, M., Picot, S., Bienvenu, A. L. & Study Group (2013).** *Candida albicans* and non-*Candida albicans* fungemia in an institutional hospital during a decade. *Med Mycol* **51**, 33–37.
- Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. (2007).** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**, 133–163.
- Romeo, O., Delfino, D., Cascio, A., Lo Passo, C., Amorini, M., Romeo, D. & Pernice, I. (2013).** Microsatellite-based genotyping of *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates reveals dominance and persistence of a particular epidemiological clone among neonatal intensive care unit patients. *Infect Genet Evol* **13**, 105–108.
- Sabino, R., Sampaio, P., Rosado, L., Stevens, D. A., Clemons, K. V. & Pais, C. (2010).** New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates. *J Clin Microbiol* **48**, 1677–1682.
- Sabino, R., Sampaio, P., Carneiro, C., Rosado, L. & Pais, C. (2011).** Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. *BMC Microbiol* **11**, 180.
- Shin, J. H., Park, M. R., Song, J. W., Shin, D. H., Jung, S. I., Cho, D., Kee, S. J., Shin, M. G., Suh, S. P. & Ryang, D. W. (2004).** Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. *J Clin Microbiol* **42**, 4025–4031.
- Tragiannidis, A., Fegeler, W., Rellensmann, G., Debus, V., Müller, V., Hoernig-Franz, I., Siam, K., Pana, Z. D., Jürgens, H. & Groll, A. H. (2012).** Candidaemia in a European Paediatric University Hospital: a 10-year observational study. *Clin Microbiol Infect* **18**, E27–E30.
- Tumbarello, M., Posteraro, B., Treccarichi, E. M., Fiori, B., Rossi, M., Porta, R., de Gaetano Donati, K., La Sorda, M., Spanu, T. & other authors (2007).** Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol* **45**, 1843–1850.
- van Asbeck, E. C., Clemons, K. V. & Stevens, D. A. (2009).** *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol* **35**, 283–309.
- Vaz, C., Sampaio, P., Clemons, K. V., Huang, Y. C., Stevens, D. A. & Pais, C. (2011).** Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. *Diagn Microbiol Infect Dis* **71**, 159–162.
- Viviani, M. A., Cogliati, M., Esposito, M. C., Prigitano, A. & Tortorano, A. M. (2006).** Four-year persistence of a single *Candida albicans* genotype causing bloodstream infections in a surgical ward proven by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* **44**, 218–221.
- Wu, J. Q., Zhu, L. P., Ou, X. T., Xu, B., Hu, X. P., Wang, X. & Weng, X. H. (2011).** Epidemiology and risk factors for non-*Candida albicans* candidemia in non-neutropenic patients at a Chinese teaching hospital. *Med Mycol* **49**, 552–555.
- Xess, I., Jain, N., Hasan, F., Mandal, P. & Banerjee, U. (2007).** Epidemiology of candidemia in a tertiary care centre of north India: 5-year study. *Infection* **35**, 256–259.