



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

CURSO DE BIOMEDICINA

DIEGO RAMOS DE MOURA

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA COMO FERRAMENTA DE VALIDAÇÃO
DE ISOLADOS DE LEVEDURAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA DO GÊNERO
*Candida***

RECIFE

2023

DIEGO RAMOS DE MOURA

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA COMO FERRAMENTA DE VALIDAÇÃO
DE ISOLADOS DE LEVEDURAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA DO GÊNERO
*Candida***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito para a obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Rejane Pereira
Neves

Coorientador: Dr. Cícero Pinheiro Inácio

RECIFE

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Moura, Diego Ramos de .

Caracterização Polifásica como Ferramenta de Validação de Isolados de
Leveduras de Importância Médica do Gênero Candida / Diego Ramos de
Moura. - Recife, 2023.

53 : il., tab.

Orientador(a): Rejane Pereira Neves

Cooorientador(a): Cícero Pinheiro Inácio

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. Candida. 2. Caracterização polifásica. 3. Leveduras. 4. Taxonomia. I.
Neves, Rejane Pereira. (Orientação). II. Inácio, Cícero Pinheiro. (Coorientação).
III. Título.

610 CDD (22.ed.)

DIEGO RAMOS DE MOURA

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA COMO FERRAMENTA DE VALIDAÇÃO
DE ISOLADOS DE LEVEDURAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA DO GÊNERO
*Candida***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito para a obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 26/04/2023

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr^a Rejane Pereira Neves
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Micologia Médica

Dr^a Maria Daniela Silva Buonafina Paz
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Micologia Médica

Dr. Franz de Assis Graciano dos Santos
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Micologia Médica

*"I wish I could extrapolate some
small intention or maybe get your
attention for a minute or two. Will I die?
Or will I get to that ten-year mark?
Where I beat the extinction of
telomers?"*

Fingertips – Lana del Rey

Primeiramente, agradeço à minha orientadora, Prof. Dr^a. Rejane Pereira Neves pelo apoio e incentivo desde o meu terceiro período da graduação. Ao meu coorientador, Cícero Pinheiro Inácio, que desde o meu PIBIC, durante a pandemia, me auxiliou durante todas as etapas do meu projeto dentro do laboratório. Agradeço também a todos os colaboradores do laboratório Sylvio Campos, Departamento de Micologia Médica e da Micoteca URM da UFPE. Ao Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra por me abrir grandes oportunidades me apresentando o grande mundo da hematologia clínica.

À FACEPE, meu agradecimento pelo fomento à minha pesquisa de iniciação científica durante a graduação. À UFPE e ao Centro de Biociências, bem como ao Prof. Dr. Carlos Taborda do Departamento de Micologia do ICB USP pelo constante apoio.

Aos meus queridos amigos Clara, Thaisa, Luanne e familiares, aos quais devo a vida, por todo suporte, apoio e resiliência durante toda essa jornada. Dois é sempre maior que um, não importa a circunstância. E a *Dieu* por nunca falhar no que Ele faz.

RESUMO

As leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota humana colonizando o trato gastrointestinal e geniturinário. Quando ocorrem desequilíbrios na microbiota do hospedeiro, seja de ordem imunológica ou física, o fungo se propaga causando a candidemia. O presente trabalho objetivou revalidar isolados de leveduras da Coleção de Cultura da Micoteca URM, da Universidade Federal de Pernambuco através da taxonomia polifásica. Foram utilizados três métodos para identificação das espécies, através do meio presuntivo cromogênico, com o uso do CHROMAgar™ *Candida*, onde as colônias produzem colorações típicas para cada espécie através de reações enzimáticas com a hidrólise de hexosaminases. Também através de uso do VITEK 2 COMPACT, que utiliza um sistema automatizado com base em métodos fenotípicos de assimilação para a identificação de espécies de leveduras, e pela identificação genômica através da extração e sequenciamento da região 28S do rDNA fúngico. Os 21 isolados de leveduras obtidos na Micoteca URM da UFPE foram identificadas como pertencentes às espécies *Candida albicans* (9), *C. tropicalis* (7), *C. parapsilosis* (4) e *C. krusei* (1). Espécies de *Candida* crescidas em meio cromogênico CHROMAgar™ *Candida* podem apresentar alterações nas colorações espécie-específica indicadas pela fabricante, isso causado pela produção de enzimas similares entre diferentes espécies de *Candida*. O uso do VITEK 2 COMPACT® como método de identificação de isolados de *Candida não-C. albicans* pode imprimir resultados discrepantes em relação ao padrão ouro, uma vez que se utiliza de uma identificação fenotípica baseada na assimilação de testes bioquímicos fluorescentes. A Identificação genômica, embora mais sensível e específica, é mais custosa em relação às demais plataformas de uso laboratorial aqui elucidadas. Além de requerer maior expertise técnica em sua manipulação. Conclui-se, então, que alternativas como o uso de meios de cultura presuntivos, técnicas de automação, assim como técnicas genômicas podem auxiliar na identificação de isolados fúngicos, uma vez que, sejam utilizados como vias de complemento.

Palavras-chave: Automação. Meio Cromogênico. Taxonomia Polifásica

MOURA, Diego Ramos de. **POLYPHASIC CHARACTERIZATION AS A TOOL FOR VALIDATING ISOLATES OF CLINICAL IMPORTANT YEASTS OF THE GENUS *Candida***. 2023. 53. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Yeasts of the genus *Candida* are part of the human microbiota colonizing the gastrointestinal and genitourinary tracts. When imbalances occur in the host microbiota, either immunologically or physically, the fungus spreads causing candidemia. The present work aims to revalidate yeast isolates from the Culture Collection of the MICOTECA URM from Federal University of Pernambuco (UFPE), through polyphasic taxonomy. Three methods were used for species identification, through the chromogenic presumptive medium, with the use of CHROMAgar™ *Candida*, where the colonies produce typical colorations for each species through enzymatic reactions with the hydrolysis of hexosaminases. Also, through use of VITEK 2 COMPACT®, a tool which uses an automated system based on phenotypic assimilation methods for yeast species identification, and by genomic identification through extraction and sequencing of the 28S region of the fungal rDNA. The 21 yeast isolates obtained from the Micoteca URM were identified as belonging to *Candida albicans* (9), *C. tropicalis* (7), *C. parapsilosis* (4) and *C. krusei* (1) species. *Candida* species grown on CHROMAgar™ *Candida* chromogenic medium may show changes in the species-specific stains indicated by the manufacturer, this can be caused by similar enzyme production among different *Candida* species. The use of VITEK 2 COMPACT® as an identification method for non-*C. albicans* *Candida* isolates may give discrepant results compared to the gold standard, since it uses a phenotypic identification based on the assimilation of fluorescent biochemical tests. Genomic identification, although more sensitive and specific, is more costly compared to the other platforms for laboratory use. It also requires more technical expertise in its manipulation. It is concluded that alternatives such as the use of presumptive culture media, automation techniques, as well as genomic techniques can help in the identification of fungal isolates, once they are used as complementary pathways.

Keywords: Automation. Chromogenic media. Polyphasic Taxonomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Análise morfológica dos isolados de <i>Candida</i>	30
FIGURA 2 - Meio CHROMAgar TM <i>Candida</i> evidenciando cores na identificação presuntiva de espécies de <i>Candida</i>	33
FIGURA 3 - Montagem do cassete YST do VITEK 2 COMPACT® na rack do equipamento para identificação de leveduras	34
FIGURA 4 - Amplificação da região 28S do rDNA de isolados de <i>Candida</i> com os amplicons obtido visualizados em transiluminador	37
FIGURA 5 - Análise filogenética dos isolados de <i>Candida</i> estudados	39

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - Comparação entre apresentações Macro e Microscópicas dos isolados de <i>Candida</i> em meio agar Sabouraud	31
QUADRO 2 - Taxa de correlação entre a identificação genômica e CHROMAgar™ <i>Candida</i>	32
QUADRO 3 - Amplificação da região 28S do rDNA de isolados de <i>Candida</i> com os amplicons obtido visualizados em transiluminador	38
QUADRO 4 - Identificação genômica de isolados de leveduras	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC1	Gene envolvido na resistência antifúngica
CTAB	Brometo de Cetrimônio (Detergente)
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxynucleoside triphosphates
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERG11	Sterol 14-demethylase, also known as CYP51
GLB	Marcador de reação de PCR
GlcNAc	N-acetylglucosamine
GlcNAcases	β -N-Acetylglucosaminidases
HSP90	Heat Shock Protein 90kDa
ITS	Internal Transcribed Spacer
ITS1	Internal Transcribed Spacer 1
ITS2	Internal Transcribed Spacer 2
LSU	Large Subunit
NCBI	National Center of Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
rDNA	Ribossomal Deoxyribonucleic Acid
rRNA	Ribossomal Ribonucleic Acid
SDA	Sabouraud Dextrose Agar

SSU	Small subunit
TAE	Tampão TRIS-Acetato-EDTA
TRIS	Solução tampão
URM	University Recife Mycologia - UFPE
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
YST	Levedura, do inglês <i>yeast</i> .

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	17
3	RESUMO BIBLIOGRÁFICO	18
3.1	LEVEDURAS	18
3.2	<i>Candida</i> spp.	18
3.2.1	<i>Candida albicans</i>	20
3.2.2	<i>Candida tropicalis</i>	20
3.2.3	<i>Candida parapsilosis</i>	21
3.2.4	<i>Candida krusei</i>	21
3.3	CANDIDEMIA	22
3.4	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>CANDIDA SPP</i>	22
3.4.1	MEIOS CROMOGÊNICOS	23
3.4.2	IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS UTILIZANDO MÉTODO DE AUTOMAÇÃO	24
3.4.3	IDENTIFICAÇÃO POR FERRAMENTAS MOLECULARES	25
4	METODOLOGIA	27
4.1	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	27

4.2	IDENTIFICAÇÃO PELO MÉTODO CROMOGÊNICO UTILIZANDO O MEIO DE CULTURA CHROMAGAR™ <i>Candida</i>	27
4.3	IDENTIFICAÇÃO POR AUTOMAÇÃO VIA VITEK 2 COMPACT®	27
4.4	IDENTIFICAÇÃO POR MEIO DA EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO DE ISOLADOS	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	OBTENÇÃO DE LEVEDURAS E ANÁLISE MORFOLÓGICA	30
5.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5.3	AVALIAÇÃO DO MEIO CROMOGÊNICO	31
5.4	IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS POR MEIO DO VITEK 2 COMPACT®	34
5.5	IDENTIFICAÇÃO GENÔMICA DOS ISOLADOS	36
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

As espécies de leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota humana, colonizando o trato gastrointestinal e geniturinário. Quando ocorrem perturbações na microbiota ou lesões nas barreiras intestinais, seja após uma cirurgia gastrointestinal ou acometimento em indivíduos imunocomprometidos, o fungo se propaga para a cavidade abdominal e invade a corrente sanguínea provocando a infecção conhecida como candidemia (TSCHERNER *et al.*, 2019; PAPPAS *et al.*, 2018). As estruturas fúngicas observadas por Bernhard von Langenbeck em 1839, hoje conhecidas como blastoconídeos de *Candida albicans* através da elucidação de Robin Berkhout em 1923 estabeleceu o início dos estudos acerca das leveduras pertencentes ao gênero *Candida* (SIDRIM & ROCHA, 2004).

A capacidade dos fungos do gênero *Candida* em colonizar as mãos dos profissionais de saúde, e conseqüentemente, os dispositivos médico-invasivos, como cateteres intravasculares, aumenta a incidência de candidemia nos centros cirúrgicos, sobretudo pela capacidade de algumas espécies desse gênero produzir biofilmes, aumentando a resistência antifúngica (SILVA *et al.*, 2019). A transição da forma da levedura de agente comensal para oportunista é causada, sobretudo, por interação dos fatores predisponentes como longos esquemas de antibioticoterapia, imunossupressão iatrogênica e resistência antifúngica (PAPPAS *et al.*, 2018; PITARCH *et al.*, 2018).

Nos casos de candidemia elucidados, as espécies mais prevalentes causadoras dessa infecção são *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. pelliculosa*, *C. haemulonii*, e mais recentemente, *C. auris* (CLANCY *et al.*, 2017; McCARTY *et al.*, 2021). As infecções causadas por espécies de *Candida* correspondem a cerca de 90% dos casos de infecções hematogênicas (KOTEY *et al.*, 2021; McCARTY *et al.*, 2021).

A identificação das espécies vem sendo realizada por meio métodos cromogênicos, como o CHROMAgar™ *Candida*, que tem se mostrado essencial para a rápida identificação das leveduras, uma vez que se utiliza de características espécie-específica onde as colônias produzem colorações

típicas para cada espécie através de reações enzimáticas como a hidrólise de substratos cromogênicos. O uso de meios presuntivos reduz o tempo de espera dos resultados e são fáceis de manipular, entretanto, possuem baixa especificidade na identificação presuntiva de espécies de *Candida não-C. albicans* WILLINGER *et al.*, 1999; SANKARI *et al.*, 2019). O uso do VITEK 2 COMPACT®, que utiliza um sistema de métodos fenotípicos e colorimétricos para a identificação automatizada de espécies de *Candida*, no entanto, necessita de profissionais capacitados para sua operação aliado ao elevado custo do equipamento. Todavia, seu uso está atrelado a laboratórios de referência na identificação de espécies de leveduras (AMBARAGHASSI *et al.*, 2019). Paralelamente, a identificação através da extração do rDNA fúngico e sequenciamento do conteúdo genômico é potencialmente mais sensível e específico para a identificação de leveduras, uma vez que a amplificação de DNA com *primers* fúngicos universais aumentam a sensibilidade de detecção de espécies de *Candida*. Não obstante, seu elevado custo de manutenção, aliado a uma necessidade de pessoal treinado, eleva seu custo na rotina laboratorial (SANKARI *et al.*, 2019).

Com base nisso, o presente estudo buscou realizar a validação de leveduras clínicas obtidas na Coleção de Cultura da Micoteca URM da UFPE através da caracterização polifásica, a fim de elucidar a interação dos resultados entre a identificação presuntiva e de automação com os métodos considerados padrão ouro, visando uma rápida e precisa identificação de espécies fúngicas na rotina laboratorial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar revalidação de espécies de *Candida* de importância médica por meio de abordagem polifásica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter isolados de leveduras clínicas mantidas na Coleção de Cultura Micoteca URM;
- Confirmar a identificação das espécies de leveduras através de abordagem polifásica com uso de meio cromogênico, automação e genômica.

3 RESUMO BIBLIOGRÁFICO

3.1 LEVEDURAS

As leveduras são fungos que apresentam um núcleo por célula, se dividem por brotamento simples, fissão binária ou por brotamento-fissão a partir de uma célula mãe (SIDRIM e ROCHA, 2004). Possuem um arcabouço de mucopolissacarídeos que as confere proteção contra a fagocitose por macrófagos (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Além da parede de sacarídeos, estes microrganismos possuem componentes metabólicos como mitocôndria, ribossomos e retículo endoplasmático, vacúolos e granulações no citoplasma. São reproduzidos de forma assexuada, sendo a mais conhecida das espécies de leveduras é a *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada no processo de fermentação de alimentos (NITZKE e BIEDRZYCKI, 2004). Das leveduras que acometem os humanos, as mais prevalentes são as do gênero *Candida* (SILVA *et al.*, 2021).

O método clássico de identificação de leveduras se dá pela análise da morfologia celular além da avaliação da cultura para testes bioquímicos e fisiológicos (ARAÚJO *et al.*, 2006). Uma forma de identificação das leveduras, é a utilização de meios cromogênicos a fim de avaliar a hidrólise de substratos cromogênicos como o meio CHROMAgar™ *Candida* na identificação macroscópica (SILVA *et al.*, 2021). Também são usadas provas bioquímicas como testes de redução do nitrato e testes de hidrólise da ureia a fim de conectar as características morfofisiológicas encontradas das leveduras com equipamentos como o VITEK 2 Compact. Além das técnicas de extração e sequenciamento do DNA ribossomal fúngico através de reações de cadeia polimerase (PCR) (PAPPAS *et al.*, 2018).

3.2 *Candida* spp.

Espécies de leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota humana (DA ROCHA, 2021). As primeiras documentações científicas dessas leveduras se deram em 1839 por Bernhard von Langenbeck, onde foram observadas e isoladas estruturas microscópicas hoje conhecidas como

blastoconídeos de *Candida albicans*, apenas elucidado como espécie desse gênero por Robin Berkhout em 1923 (SIDRIM, 2004). *Candida albicans* é a espécie mais predominante causando infecções em humanos (BRANCO *et al.*, 2023).

Taxonomicamente, o gênero *Candida* está incluído no filo *Ascomycota*, os quais possuem afinidades com ascomicetos e basidiomicetos, na classe *Saccharomycetes*, na família *Debaryomycetaceae* (TAKASHIMA, SUGITA; 2022). Análises multigenes filogenéticas indicam que espécies pertencentes ao gênero *Candida* podem ser divididas em mais de 10 diferentes clados, além de ocasionais mudanças em nomes e subdivisões intra-espécie, à exemplo da *Candida krusei*, previamente elucidada como *Issatchenkia orientalis* (TAKASHIMA, SUGITA; 2022).

Do ponto de vista microscópico, essas leveduras podem apresentar característica asporogênica com formação de blastoconídeos, hifas e pseudo-hifas (McCULLOUGH *et al.*, 1996). Espécies de *C. krusei* podem se apresentar nas formas de levedura e pseudo-hifa assim como as espécies de *C. tropicalis*, que além das formas de blastosporos (leveduras) pseudo-hifa, podem apresentar formações de hifa verdadeira. No caso da *C. albicans* e da *C. parapsilosis*, ambas podem formar leveduras e pseudo-hifas por serem espécies pleomórficas e polimórficas, à exceção da *C. parapsilosis* que não formam hifas verdadeiras (PITARCH *et al.*, 2018). Na macroscopia, a maioria dessas espécies apresentam-se numa coloração branca a creme numa consistência cremosa e algodoadosa em meio Sabouraud Dextrose Agar, o qual contém um baixo pH e uma alta concentração de glicose em sua composição (SILVA *et al.*, 2021).

Espécies do gênero *Candida* possuem vários atributos de virulência que auxiliam na invasão de tecidos nos hospedeiros, como aderência, produção de proteases, a formação de hifas e de biofilmes os quais auxiliam na evasão das defesas imunitárias do hospedeiro (CHAI *et al.*, 2010).

O dimorfismo celular característico das espécies de *C. albicans*, faz com que essas leveduras tenham maior capacidade de aderência aos tecidos do hospedeiro, ora em forma de blastoconídeos, ora como hifa. A forma de pseudo-hifa é encontrada na reprodução da levedura por brotamento, uma vez que essas novas projeções surgem da célula mãe inicial e não se separam

formando uma estrutura semelhante à de uma hifa (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010; SAXENA *et al.*, 2021).

As infecções causadas por espécies de *Candida* correspondem a cerca de 90% dos casos de enfermidades hematogênicas e um total de 25 mil casos são registrados todos os anos nos Estados Unidos (RAMOS *et al.*, 2018 KOTÉY *et al.*, 2021). No Brasil, estudos de GOULART (2016) constataram uma frequência de *Candida spp.* de 30% na população mato-grossense. *C. albicans* é a espécie mais prevalente causadora dessa infecção. Entretanto, é observado o aumento de infecções de outras espécies de *Candida* em seres humanos como a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. pelliculosa*, *C. haemulonii*, e mais recente, a *C. auris* (CLANCY *et al.*, 2021).

3.2.1 *Candida albicans*

Candida albicans se destaca como o agente etiológico mais relatado no mundo. Comensal de membranas mucosas gastrointestinais e do trato geniturinário, em sua maioria, são fontes de infecções oportunistas nos hospedeiros (MAGEE *et al.*, 2005; CHAKRABARTI, 2023). A habilidade da *C. albicans* em mudar sua forma entre levedura unicelular e hifa e pseudo-hifa multicelular promove ainda mais a infecção no hospedeiro. Essa versatilidade morfológica tem por finalidade uma resposta do fungo aos fatores ambientais ao qual está inserido, garantindo sua sobrevivência. Produzem e secretam fatores que auxiliam na infecção, como aspartil-proteases e fosfolipases, promovem invasão tecidual e danos aos órgãos do hospedeiro (XU *et al.*, 2000; PAPPAS *et al.*, 2019).

3.2.3 *Candida tropicalis*

É a segunda espécie de *Candida* mais prevalente no Brasil e na América Latina, e costuma vigorar em territórios de clima mais tropical. Infecções são mais prevalentes em indivíduos neutropênicos ou que sofreram tratamento antimicrobiano de amplo espectro por longo tempo. Possui uma alta taxa de morbimortalidade em pacientes internados em UTI devido a maior resistência

antifúngica e são resistentes aos mais comuns azóis e a anfotericina B. Partilha de semelhanças patogênicas com a *C. albicans*, como proteases, formação de biofilme e formações hialinas (CHAKRABARTI, 2023; CHAI *et al.*, 2010). As cepas de *C. tropicalis* possuem uma tendência em secretar maiores quantidades de SAP5 e SAP9, proteinases aspárticas que são encontradas nas paredes celulares fúngicas e em macrófagos invadidos após fagocitose das leveduras (PAPPAS *et al.*, 2018).

3.2.3 *Candida parapsilosis*

O poder evolutivo das espécies de *Candida* contribuiu com a reclassificação taxonômica de algumas espécies de leveduras do gênero, conferindo a *C. parapsilosis* a subdivisão em três novas espécies: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (TAKASHIMA, SUGITA; 2022). O potencial da *C. parapsilosis* de aderir intrinsecamente à superfícies abióticas e aparatos médicos como cateteres, linhas centrais e sondas é crucial para a formação do biofilme e colonização do paciente. O potencial em acometer recém nascidos prematuros de baixo peso internados em Unidades de Terapia Intensiva - UTIs neonatais também é grande, onde se aloja via sonda parenteral (BRANCO, MIRANDA, RODRIGUES, 2023). Possui baixa resistência a antifúngicos de primeira escolha, e é causadora da menor taxa de morbimortalidade entre as espécies de *Candida* (CHAKRABARTI, 2023). No Brasil, é a terceira maior causadora de mortes em pacientes diagnosticados com *Candida* (BRANCO, MIRANDA, RODRIGUES, 2023).

3.2.4 *Candida krusei*

Candida krusei é a menos prevalente das espécies que pertencem ao gênero *Candida*. É frequentemente encontrada em pacientes que decorrem de doenças hematológicas as quais foram submetidos à profilaxia com uso do fluconazol devido a sua forte resistência aos antifúngicos de primeira escolha. A redução da afinidade ao gene ERG11 e a pouca expressão do gene ABC1 levam o paciente a uma resistência aos azóis mais comuns (PAPPAS *et al.*, 2018; CHAKRABARTI, 2023).

3.3 CANDIDEMIA

É sabido que infecções por fungos do gênero *Candida* acontecem por caráter oportunista, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. 50% dos casos de Candidemia diagnosticada em UTIs de hospitais provém de translocação da *Candida* comensal do trato gastrointestinal através da contaminação por catéteres urinários, intravenosos, válvulas mecânicas de coração e próteses intradérmicas nas articulações (CLANCY, NGUYEN, 2018; NOBILE, JOHNSON, 2015). As infecções invasivas por fungos do gênero *Candida* são chamadas de Candidemia, sendo as espécies encontradas com maior frequência em amostras de sangue venoso de pacientes com comorbidades em hospitais são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (CHANG *et al.*, 2008). Doenças autoimunes não tratadas, imunossupressão, pacientes com uso de cateteres endovenosos em UTIs, idade extrema e diabetes são fatores de risco do hospedeiro para desenvolvimento de infecções fúngicas invasivas (PAPPAS *et al.*, 2003; NOBILE, JOHNSON, 2015).

Informações epidemiológicas acerca da candidemia nos países em desenvolvimento como o Brasil, Índia e África do Sul, integrantes dos BRICS, são defasadas. Embora com elevada taxa de morbimortalidade, o estudo de MONI *et al.*, na Índia em 2022, relatou uma taxa de sucesso do tratamento da candidemia de 64,7% dos pacientes.

Com o diagnóstico tardio, a prevenção ineficaz, e o atraso no início da terapia antifúngica, os países em desenvolvimento também enfrentam questões de falta de infraestrutura que colocam em xeque as práticas adequadas para o controle e prevenção das infecções. Junto com a falta de profissionais capacitados, laboratórios e todo o apoio humano por trás do diagnóstico (MONI *et al.*, 2022). Aliado a isso, uma grande limitação no tratamento é o aumento de resistência das espécies de *Candida* aos antifúngicos, ao qual se atribui ao uso indiscriminado de medicamentos sem acompanhamento clínico, antibioticoterapia de amplo espectro e imunossupressão (PAPPAS *et al.*, 2018).

3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *CANDIDA SPP.*

A identificação de espécies de *Candida* dá-se primariamente pela avaliação macroscópica do fungo, através do uso de meios de cultura adequados como o meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA), que propicia nutrientes e um ambiente favorável para o crescimento do fungo, concomitantemente com a avaliação microscópica desse agente através do exame direto. Do ponto de vista macroscópico, o crescimento das espécies de *Candida* se dá pela presença de colônias de aspecto cremoso e brilhante, de coloração branca a creme em meio de cultura SDA mantidos à temperatura ambiente. As leveduras crescem em um intervalo de 24 a 48 horas em meio SDA e podem apresentar um crescimento filamentoso em algumas espécies, formando hifas e pseudohifas. Na vertente microscópica, podem ser encontradas estruturas de blastoconídios, clamidoconídios, artroconídeos, hifas e pseudohifas (MIDGLEY, CLAYTON, HAY, 1998).

Em meio cromogênico, obtém-se a identificação presuntiva e seletiva das espécies de *Candida* através da avaliação da impressão de cores das colônias e a textura produzida através da hidrólise dos substratos cromogênicos pelas leveduras (NADEEM *et al.*, 2010).

A identificação genômica ocorre através da reação PCR, utiliza-se da amplificação de uma sequência alvo específica de uma região do genoma da *Candida*. O DNA é amplificado e detectado utilizando corantes fluorescentes que se ligam ao DNA à medida em que ocorre a reação de amplificação (FREITAS *et al.*, 2022), e seu uso está atrelado como uma ferramenta de diagnóstico mais sensível frente às demais formas de diagnóstico laboratorial convencionais como o exame direto microscópico e a cultura de fungos (INÁCIO *et al.*, 2021).

Já na identificação por automação, utiliza-se da metodologia colorimétrica com uso do cartão YST, ao qual permite a identificação de leveduras através de 47 testes bioquímicos como a avaliação metabólica das leveduras com fontes de carbono, nitrogênio e atividades enzimáticas. Estes, incluem a assimilação de arilamidases, detecção de oxidases, ácidos orgânicos

e hidratos de carbono em um intervalo de duração de aproximadamente 18 horas (OCHIUIZZI *et al.*, 2014).

3.4.1 MEIOS CROMOGÊNICOS

O primeiro uso de meios cromogênicos para identificação de espécies de *Candida* é datado de 1994, onde ODDS e BERNAERTS avaliaram um novo método de identificação de espécies fúngicas através da evidência da enzima hexosaminase das leveduras e da atividade da fosfatase alcalina, que em contato com o meio de cultura, imprimiram colorações específicas (SCHARMANN *et al.*, 2020).

Um substrato cromogênico ideal deve ser hidrolisado para liberar um produto de cor que se concentra no local de inoculação do espécime (WOHLMEISTER *et al.*, 2017). Isso permite uma diferenciação clara entre os fungos que produzem a enzima alvo e os que não produzem. Sendo assim, importante quando se pesquisa espécies de leveduras específicas dentro de culturas polimicrobianas (J. D. PERRY, FREYDIÈRE, 2007).

A síntese de uma série de fenólicos prolongados foi relatada por AAMLID *et al.*, em 1990, onde se tornou elucidado que os meios cromogênicos que possuem glucosaminidase têm sido aplicados para a detecção de espécies de *Candida* (COOKE *et al.*, 2002).

O meio CHROMAgar™ *Candida* usa o substrato cromogênico da beta-glucosaminidase ou indolil-glucosaminidase os quais são metabolizados pelas leveduras dando a coloração esverdeada para a *C. albicans*, azulada para as colônias de *C. tropicalis*, rosácea para as de *C. krusei* e branca a creme para as leveduras de *C. parapsilosis* (COOKE *et al.*, 2002; CHAI *et al.*, 2010; PITARCH *et al.*, 2018). A presença do substrato de beta-hexosaminidase nos meios cromogênicos ajuda na identificação e diferenciação de espécies de *C. albicans*, mais frequentes, com espécies de leveduras *Candida* não-*C. albicans* (FREYDIÈRE *et al.*, 2001).

3.4.2 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS UTILIZANDO MÉTODO DE AUTOMAÇÃO

A análise das espécies fúngicas realizado pelo cartão YST do VITEK 2 COMPACT® acontece no final das reações de transmitância óptica, quando se obtêm um valor que é comparado com o banco de dados do equipamento para avaliação de concordância e discriminação, gerando somas quantitativas que são então classificadas em 3 variáveis: a primeira, que imprime baixa discriminação, a segunda, com bom nível de confiança (entre 60 e 99.9% de probabilidade) e a terceira, onde não há a identificação do espécime (PITARCH *et al.*, 2018). Em algumas situações onde não há a identificação da espécie, além de ser requerida uma atualização do banco de dados para uma melhor acurácia na identificação das espécies, o sistema provê de uma lista de duas a três espécies mais próximas ao táxon através de cálculos de probabilidade acerca dos resultados bioquímicos do perfil metabólico das espécies de *Candida*, como testes de utilização de fonte de carbono como glucose, frutose e maltose, testes de utilização do nitrogênio como fonte de metabolismo avaliando amônia e ureia. Do ponto de vista enzimático, o sistema avalia esterases, fosfatases e lipases produzidas pelas leveduras de *Candida*, assim como testes de susceptibilidade antifúngica. O banco de dados do sistema provê a identificação de 200 espécies de leveduras e fungos, porém é limitado no quesito de investigação de múltipla infecção por leveduras de *Candida* em uma única amostra (STEFANIUK, *et al.*, 2016; KAUR *et al.*, 2016; SAXENA *et al.*, 2021).

3.4.3 IDENTIFICAÇÃO POR FERRAMENTAS MOLECULARES

Considerado o padrão ouro do diagnóstico molecular em amostras clínicas, as reações de amplificação e sequenciamento de DNA da PCR provêm especificidade e a genotipagem das espécies de *Candida* (SOBEL, AKINS, 2015). CRAMPIN & MATTHEWS primeiro elucidaram o uso da ferramenta como forma de diagnóstico de infecções por *Candida* em 1993 ao amplificar o gene HSP90, uma chaperona que facilita o dobramento e formação de novas proteínas, assim como confere resistência antifúngica às espécies de *C. albicans* (SOBEL, AKINS, 2015; O'MEARA *et al.*, 2017).

Regiões ITS, conhecidas como “código de barras” do fungo, são espaços do DNA fúngico usados como alvo para análise e identificação das

espécies de *Candida*. Estão localizados entre a subunidade menor SSU e a subunidade grande LSU do gene rRNA. (BELLEMAIN *et al.*, 2010). Seu tamanho é de aproximadamente 550bp e varia de acordo com as linhagens das espécies. É composto por duas variáveis ITS1 e ITS2 no gene ribossomal 5.8S e 26S (NILSSON *et al.*, 2015). Diversos kits comerciais foram desenvolvidos para a detecção de DNA fúngico em espécimes como sangue, soro e plasma. Esses testes identificam alvos específicos do DNA fúngico através de genes de *Candida* já conhecidos fazendo uma reação em cadeia com diversas cópias do rDNA em sequências ribossomais específicas, tais como as regiões 5.8S, 18S e 28S (PITARCH *et al.*, 2018).

O sequenciamento das regiões menos conservadas, ITS1 e ITS2 da subunidade grande LSU do gene 28S do rDNA são usadas como alvo para identificação de isolados fúngicos. Os espaços transcritos internos 1 e 2 estão localizados entre os genes do rDNA (GUIMARÃES 2016; MARCOS-ARIAS *et al.*, 2020).

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Os isolados de leveduras foram obtidos a partir da Coleção de Cultura da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. Utilizou-se o meio ágar Sabouraud para reativação, cultivo e manutenção das espécies.

A análise micromorfológica dos isolados foi realizada através de cultivo em lâmina contendo ágar Sabouraud, com isolados crescidos em 7 dias em temperatura de 37°C. As lâminas foram coradas com azul de Amann (lactofenol blue) e posteriormente, analisadas em microscópio. A análise macroscópica dos isolados foi realizada após a inoculação dos isolados em meio ágar Sabouraud a 37°C por 7 dias.

4.2 IDENTIFICAÇÃO PELO MÉTODO CROMOGÊNICO UTILIZANDO O MEIO DE CULTURA CHROMAGAR™ *Candida*

Foram preparadas suspensões em água destilada estéril com as amostras de leveduras a serem identificadas. A turbidez foi ajustada para concentração correspondente ao padrão 2 da escala de McFarland e posteriormente, as referidas suspensões foram semeadas em meio de cultura CHROMAgar™ *Candida* (CHROMAgar *Candida*, France) contendo 10 g de Extrato de peptona, 20 g de Glucose, 15 g de Agar, 0.5 g de Cloranfenicol, 2 g de Chromogenic ix em pH 6.1 contido em placas, as quais foram incubadas à 37°C durante 48 horas segundo COL *et al.*, (2009). A leitura das placas seguiu as recomendações determinados pela fabricante com a análise de cores, tamanhos e texturas das colônias onde espécies de *C. albicans* se apresentam em tons esverdeados, as de *C. tropicalis* em cor azul a azul metálico e as espécies de *C. krusei* imprimem uma coloração rosácea.

4.3 IDENTIFICAÇÃO POR AUTOMAÇÃO VIA VITEK 2 COMPACT ®

Foram preparadas suspensões de acordo com MONDELLI *et al.*, (2012), através da transferência de colônias das leveduras para 3,0 ml de solução salina (solução aquosa a 0,45% a 0,50% de NaCl, pH 4,5 a 7,0) estéril. A turvação foi ajustada de acordo com a escala (1,80 - 2,20) de McFarland e posteriormente, as suspensões das leveduras foram adicionadas ao cassete junto com os respectivos cartões de identificação e colocadas no aparelho de vácuo integrado. Foram realizados 21 testes no aparelho VITEK 2 COMPACT® (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Em seguida, o cassete YST contendo as suspensões foi colocado manualmente na câmara de vácuo e logo após o acionamento do vácuo e o ar introduzido, a suspensão da levedura foi pressionada através do tubo de transferência para dentro dos micro canais preenchendo todos os poços de teste presentes nos cartões. Os cartões inoculados e vedados foram incubados a $35,5 \pm 1,0$ °C. Cada cartão foi então removido do carrossel da incubadora em intervalos de 15 minutos cada, sendo transportados para o sistema óptico de reação de leituras e retornando para a incubadora. Os dados foram coletados em intervalos de 15 minutos durante todo o período de incubação.

4.4 IDENTIFICAÇÃO POR MEIO DA EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO DE ISOLADOS

Para a extração de DNA, as culturas foram crescidas em meio Sabouraud Dextrose Agar e incubadas a 37°C por 24h. O DNA foi extraído de acordo com INÁCIO *et al.*, (2016), onde as amostras biológicas foram transferidas para tubos de extração contendo pérolas de vidro e 500µL de tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,5 M, 100mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 1% de polivinilpirrolidona) aquecidos a 65°C. As células foram rompidas por agitação (5.5 m/s por 60s) em FastPrep® (BIO 101, Farmingdale, New York, USA) e incubadas a 65°C por 10min. Em seguida, foram adicionados a cada tubo, 500 µL de Clorofórmio álcool-isoamílico (24:1) e o material centrifugado a 13000g por 10min. O sobrenadante foi transferido para tubos limpos, sendo então adicionados à mesma proporção de isopropanol e 20µL de acetato de sódio (0,3 M, pH 6). Em seguida, a amostra foi centrifugada (13000g por

10min), onde o pellet de DNA lavado com etanol 70% e seco a 30°C por 10min. Ao final do processo, o DNA foi ressuspensionado em 50µl de água ultrapura e mantido a 4°C até o momento das análises.

Os primers utilizados neste estudo são espécie-específicos para *Candida albicans* (CA, 5'- TCAACTTGTCACAGATTATT-3'), *C. tropicalis*, (CT, 5'- AAGAATTTAACGTGGAACTTA-3'), *C. krusei* (CK, 5'- GATTTAGTACTACACTGCGTC A-3'), *C. glabrata* (CGLA, 5'-CAC GAC TCG ACA CTT TCT AAT T-3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') como primer reverso. Para os isolados de leveduras que não apresentaram primers espécie-específico correspondente, foi adotado o sequenciamento parcial do domínio D1/D2 da região LSU 28S do rDNA utilizando os primers NL1 (5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3') e NL4 (5' – GGTCCGTGTTTCAAGACGG - 3'). Nas reações de PCR foram obtidos volumes finais de 12,5 µL contendo 7,45µL de ddH₂O, 1µL de cada primer (5 pmol), 1,25 µL do tampão da PCR, 0,5 µL de MgCl₂ (50mM), 0.25 µL de dNTP (10mM), 0.05 µL de Taq DNA polymerase 5U (Invitrogen, Brasil) e 1µL de DNA molde. Seguindo os parâmetros estabelecidos por (LI *et al*, 2003) e por (ASADZAEH *et al*, 2009) nas reações de PCR, consistindo na desnaturação inicial à 95 °C por 5 min, realizada em 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, 11 anelamentos à 57°C por 30s, extensão à 72 °C por 30s e extensão final à 72°C por 10 min. Ao fim do processo, os produtos de DNA foram montados em parafilme (5µL do produto de extração, 2µL GLB e 2µL GelRed), usando o marcador de DNA Lambda como padrão. O DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo o tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE), com voltagem de 100v por 20 min. Posteriormente, o DNA foi analisado quanto à qualidade e quantidade em um transiluminador. Os produtos da PCR foram purificados com o uso do kit GenJET PCR Purification (Fermentas, UK) e sequenciadas na Plataforma de sequenciamento LABCEN/CCB (UFPE) segundo protocolos padronizados. Após os ensaios, as sequências consenso serão obtidas por meio do programa Sequencher 4.7. As sequências de nucleotídeos foram submetidas a ferramenta BLAST do GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para busca por similaridade. As novas sequências foram alinhadas com as sequências de confiança depositadas no banco de dados e analisadas filogeneticamente com o auxílio do programa MEGA X.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS LEVEDURAS E ANÁLISE MORFOLÓGICA

Foram obtidos 21 isolados clínicos de leveduras da MICOTECA URM da Universidade Federal de Pernambuco. Para a manutenção dos isolados, foram realizados repiques em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e os tubos mantidos à temperatura ambiente. Os isolados foram reativados em cultura crescida em meio inclinado com uso de óleo mineral esterilizado (BRAZ *et al.*, 2009). Após sucessivos repiques, os isolados foram analisados quanto a sua consistência macroscópica e em lâmina, corados com corante azul de Amann (Lactofenol Blue) e suas estruturas microscópicas evidenciadas. (**Quadro 1**).

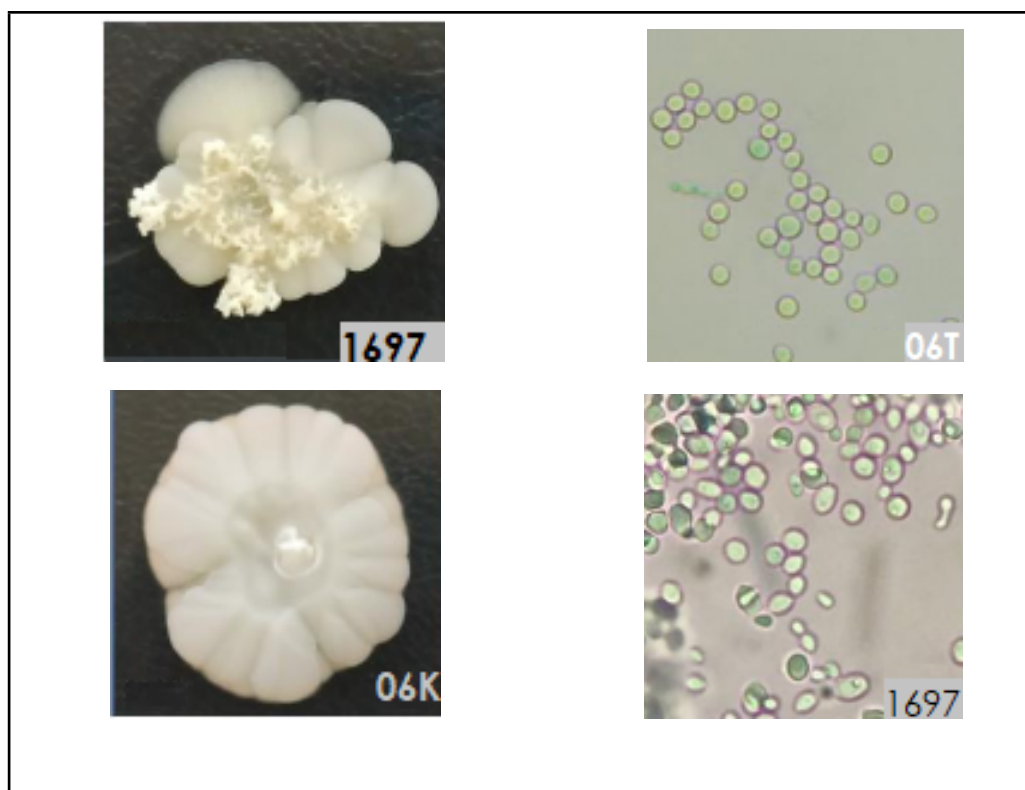
Quadro 1 - Comparação entre apresentações Macro e Microscópicas dos isolados de *Candida* em meio agar Sabouraud.

Espécie	Estruturas Microscópicas em lâmina	Características Macroscópicas em meio SDA
<i>Candida albicans</i>	Levedura, hifa e pseudo-hifa	Aspecto úmido, branco a creme e consistência cremosa
<i>C. parapsilosis</i>	Leveduras em formas convexas e circulares, pseudo-hifa	Aspecto úmido, de branco a bege claro

<i>C. tropicalis</i>	Levedura e pseudo-hifa	Consistência cremosa, Aspecto creme a rosáceo
<i>C. krusei</i>	Levedura e pseudo-hifa	Circular, bege leve. Aspecto mucoide e brilhoso

Segundo KURTZMAN e colaboradores (2011), as leveduras podem apresentar diferentes morfotipos celulares, dentre elas, globosa, elipsoidal, cilíndrica, ovalada e alongada. Os isolados 1697 e 06T apresentaram, em microscopia, leveduras cilíndricas e globosas com presença de brotamentos, sobretudo no isolado 1697. Na observação macroscópica, foram evidenciadas colorações que variavam de branco a creme; com aspecto viscoso e aveludado, variando também entre características rugosas, como no isolado 1697 e cerebriforme, como no isolado 06K (**FIGURA 1**).

FIGURA 1 - Análise morfológica dos isolados de *Candida*



Fonte: O autor

5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados das identificações dos isolados clínicos foi feita a partir de médias e percentuais. Os dados foram armazenados em uma planilha do Excel (Microsoft Corporation), após esse armazenamento, uma análise dos dados foi realizada. Essa análise consistiu na leitura flutuante do conjunto de informações obtidas, seguida da interpretação dessas informações.

Os percentuais de concordância foram obtidos pelo número de isolados positivos no meio cromogênico, no sequenciamento genômico e no método de automação vezes 100. O percentual de discordância dos resultados foi feito a partir da subtração do percentual de concordância obtido por cem.

5.3 AVALIAÇÃO DO MEIO CROMOGÊNICO

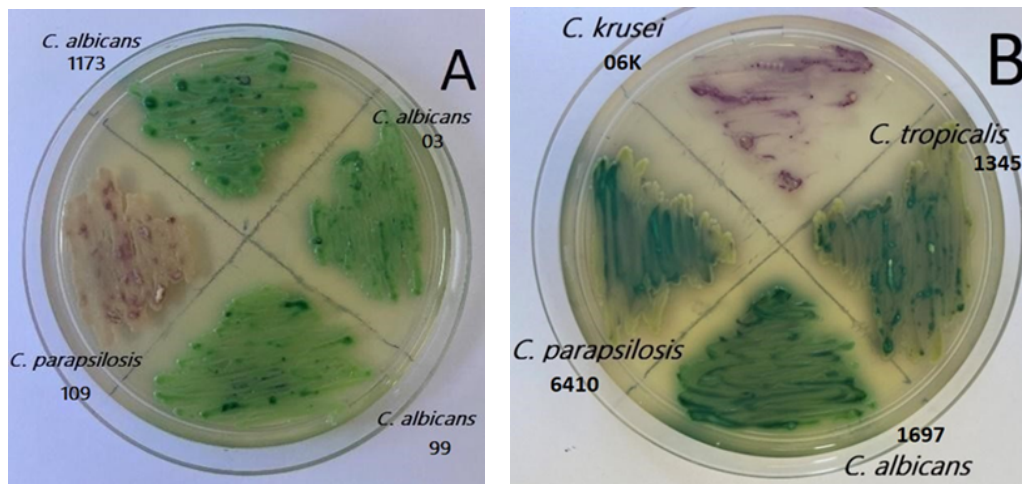
Dos 21 isolados clínicos estudados, 100% (9) dos isolados de *Candida albicans* imprimiram coloração verde em meio CHROMAgar™ típica para a espécie. Entretanto, houve uma discordância em torno de 28,56% (2) dos isolados de *C. tropicalis* entre o meio cromogênico e a identificação genômica, onde deveriam ser observadas colônias de coloração azul a azul metálico, como informados pela fabricante (**Quadro 2**). No caso, o isolado 1347 imprimiu uma coloração verde e em pontos, bege escuro, destoando do padrão sugestivo de cor azul. O mesmo foi identificado nas colônias de *C. parapsilosis*, onde 25% (1) diferiram do resultado indicado. O isolado 6410 imprimiu um mix de cores entre o verde e o amarelo claro. Isso pode ocorrer devido a produção de enzimas similares entre espécies de *Candida* próximas de clado.

Quadro 2 - Taxa de correlação entre a identificação genômica e CHROMAgar™ *Candida*

Espécie	Coloração no meio CHROMAgar™ <i>Candida</i> , segundo informações do fabricante	Concordância de resultados entre sequenciamento e meio cromogênico	Discordância de resultados entre sequenciamento e meio cromogênico
<i>Candida albicans</i> (9)	Verde a verde metálico	9 (100%)	0 (0%)
<i>C. parapsilosis</i> (4)	Rosa a creme, lisa	3 (75%)	1 (25%)
<i>C. tropicalis</i> (7)	Azul a azul metálico	5 (71,44%)	2 (28,56%)
<i>C. krusei</i> (1)	Rosáceo a roxo, rugoso	1 (100%)	0 (0%)

O crescimento de um isolado com coloração creme rosácea, identificado pelo padrão ouro como *Candida parapsilosis* foi impresso com uma mistura de colorações que, segundo a fabricante, identificariam espécies de *C. krusei* e *C. glabrata* (**Figura 2**). O potencial de sensibilidade do meio frente a identificação dessa espécie é inferior comparado aos isolados de *Candida albicans* em meio cromogênico.

Figura 2 - Meio CHROMagar TM *Candida* evidenciando cores na identificação presuntiva de espécies de *Candida*.



Placa de Petri contendo meio CHROMagar evidenciando colorações impressas das espécies de *Candida*.

Fonte: O autor

A detecção de diferentes espécies de leveduras no meio cromogênico se utiliza da variação de pigmentação dos substratos secundários que reagem com as enzimas secretadas pelas leveduras (NADEEM *et al.*, 2010). Isolados de *C. albicans* produzem a β -N-Acetylglucosaminidases (GlcNAcases), um substrato cromogênico de hexosaminidase que é incorporado diretamente no meio de cultura e os isolados de *C. albicans* são identificados por crescerem em colônias verdes com a clivagem do substrato de esterase. Essas enzimas possuem a função de quebrar grandes complexos de carboidratos e estão envolvidas em processos de remodelação da parede celular fúngica, formação de biofilme e em interações hospedeiro-patógeno. As GlcNAcases podem ser produzidas pelas espécies de *Candida* nas formas endo e exo-GlcNAcases. Essas enzimas possuem substratos específicos e clivam resíduos de GlcNAc de diferentes posições das moléculas de carboidrato (ZHANG *et al.*, 2018; MULET BAYONA *et al.*, 2022). As reações de enzima-substrato não são exclusivas de apenas uma espécie de *Candida*, levando a produção de cores similares entre outras espécies (SANKARI *et al.*, 2019).

Fenotipicamente, é difícil distinguir as espécies de *Candida* entre si. *Candida auris*, em meio CHROMAgar™ *Candida*, por exemplo, imprime a mesma coloração rosa-arroxeadada que *C. krusei*. No entanto, em meio cromogênico, teoricamente, haveria uma distinção de cores graças às secreções de enzimas e substratos específicos dessas espécies. Ambos os isolados carregam características genéticas semelhantes (RUIZ-GAITÁN *et al.*, 2023). Uma possível forma presuntiva de diferenciação entre *C. krusei* e *C. auris* em meio cromogênico seria a de inocular ambos os isolados com altas doses de fluconazol.

O meio presuntivo, entretanto, mostrou-se altamente sensível às espécies de *C. albicans*. Em torno de 100% (9) das amostras analisadas imprimiram uma coloração verde, mostrando sua capacidade de contribuição em um diagnóstico presuntivo rápido e prático. Entretanto, devido a discrepância de resultados em colônias de *Candida* não-*C. albicans*, torna-se necessário a concatenação desses dados fenotípicos com outros métodos de identificação. O uso do novo meio CHROMAgar™ *Candida* Plus (CHROMAgar™, France), evidenciado por MULET BAYONA e colaboradores (2020), mostrou ter uma maior sensibilidade na impressão das colorações de colônias de *C. não-C. albicans*. O tempo de crescimento das colônias também diminuiu para 36h.

Espécies de *Candida albicans* identificadas em meio CHROMagar *Candida* são mais sensíveis a ação da β -N-Acetylglucosaminidases, utilizada para a evidenciação da coloração típica verde. Seu alto índice de especificidade se faz essencial para o uso do meio cromogênico como triagem na rotina laboratorial em casos de suspeitas de infecções nosocomiais por *Candida*, uma vez que a espécie é a mais prevalente de todas elucidadas em casos de infecções em UTIs (MULET BAYONA *et al.*, 2022; KIDD *et al.*, 2023). Em contrapartida, espécies de *C. não-C. albicans* podem sofrer interferências em seus resultados no meio cromogênico sendo necessário o uso de ferramentas complementares de identificação.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS POR MEIO DO VITEK 2 COMPACT®

O sistema VITEK 2 COMPACT® identifica e estabelece o padrão de suscetibilidade de vários microrganismos. O cartão YST (**Figura 3**) permite a identificação de leveduras e organismos clinicamente importantes relacionados através de 47 testes bioquímicos fluorescentes, que incluem assimilação de carboidratos e ácidos orgânicos e detecção de oxidases e arilamidases. O uso do VITEK 2 COMPACT® auxiliou na identificação dos isolados de colônias de *Candida albicans* mostrando uma alta sensibilidade e especificidade.

Figura 3 - Montagem do cassete YST do VITEK 2 COMPACT® na rack do equipamento para identificação de leveduras



Fonte: o autor

Na identificação de isolados de *Candida* não-*C. albicans*, o equipamento imprimiu resultados diferentes do padrão ouro, como no isolado 07AM, identificado pelo equipamento como *C. parapsilosis* com 89% de nível de discriminação e na genômica como *C. albicans*. Isso pode acontecer devido a dificuldades na distinção de espécies de *Candida* pelo equipamento VITEK 2 COMPACT® em versões iguais ou prévias a 8.01 (STEFANIUK *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2018; MULET BAYONA *et al.*, 2020). A versão atualizada do software do VITEK 2 COMPACT® provê uma maior acurácia na distinção de espécies fúngicas, especialmente as mais próximas evolutivamente, O isolado

06K, identificado pela genômica como *Candida krusei*, recebeu pelo VITEK 2 COMPACT® um índice de baixa discriminação indicando probabilidade de 50% ser um isolado de *C. ciferrii* e 50% de ser um isolado de *C. famata*. **(Quadro 4)** Isso pode ocorrer devido a uma deficiência de informações no banco de dados do aparelho (STEFANIUK *et al.*, 2016), ou pelas formas que essa espécie pode ser detectada, na forma teleomorfa como *Pichia kudriavzevii*, ao qual se reproduz sexuadamente, ou como era previamente identificada como *Issatchenkia orientalis* (KIDD *et al.*, 2023).

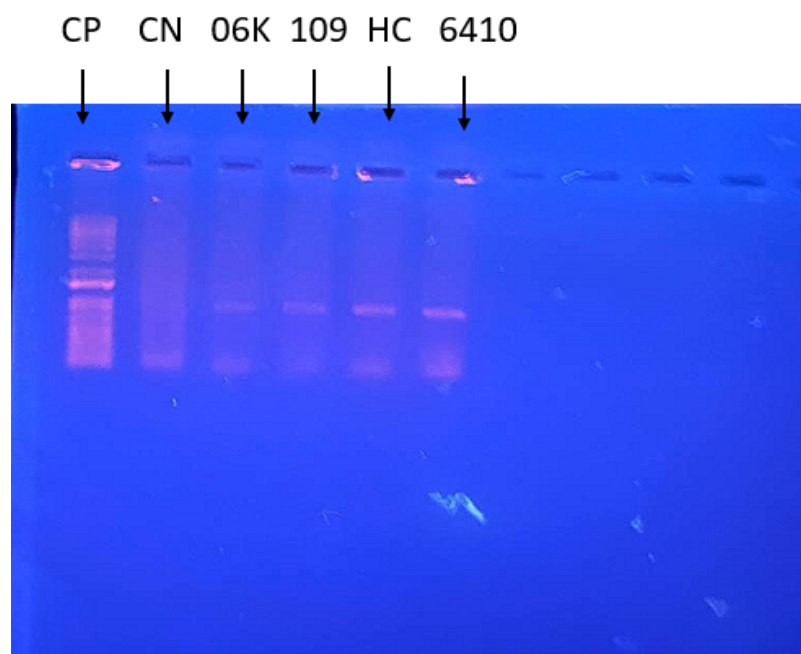
Quadro 3 - Quadro de correlação entre a identificação genômica e o VITEK 2 COMPACT®

Espécie	Concordância de resultados entre sequenciamento e VITEK 2 COMPACT®	Discordância de resultados entre sequenciamento e VITEK 2 COMPACT®
<i>Candida albicans</i> (9)	8 (88,89%)	1 (11,11%)
<i>Candida</i> não- <i>C.albicans</i> (12)	6 (50%)	6 (50%)

5.5 IDENTIFICAÇÃO GENÔMICA DOS ISOLADOS

A identificação genômica dos isolados de leveduras se deu pela amplificação do DNA com *primers* de fungos universais e se mostrou potencialmente mais sensível e específica na detecção de espécies de *Candida* (WAHYUNINGSIH *et al.*, 2000; JAFARI *et al.*, 2017). Após as reações de PCR, foram observados amplicons de isolados de *Candida* por meio de um transiluminador evidenciando um fragmento com tamanho de aproximadamente 900bp (**Figura 4**). Na primeira pista, foi utilizado o marcador 1Kb Plus DNA Ladder e na segunda, o controle negativo.

Figura 4 - Amplificação da região 28S do rDNA de isolados de *Candida* com os amplicons obtido visualizados em transiluminador.



Fonte: O autor

Na primeira coluna (CP), há o marcador 1Kb Plus DNA Ladder de 900bp, na segunda, o controle negativo (CN). As subseqüentes colunas indicam os diferentes isolados de *Candida*. Da esquerda para direita, respectivamente: 06K, 109, HC e 6410.

Após a busca por similaridade nas plataformas BLAST do Genbank das sequências consenso obtidas após os ensaios de PCR e sequenciamento, as leveduras foram identificadas como pertencentes às espécies *Candida albicans* (9), *Candida tropicalis* (7), *Candida parapsilosis* (4) e *Candida krusei* (1). (Quadro 5).

Quadro 4 – Identificação genômica de isolados de leveduras.

ISOLADO	CÓDIGO MICOTECA URM/GENBANK	ESPÉCIE
---------	--------------------------------	---------

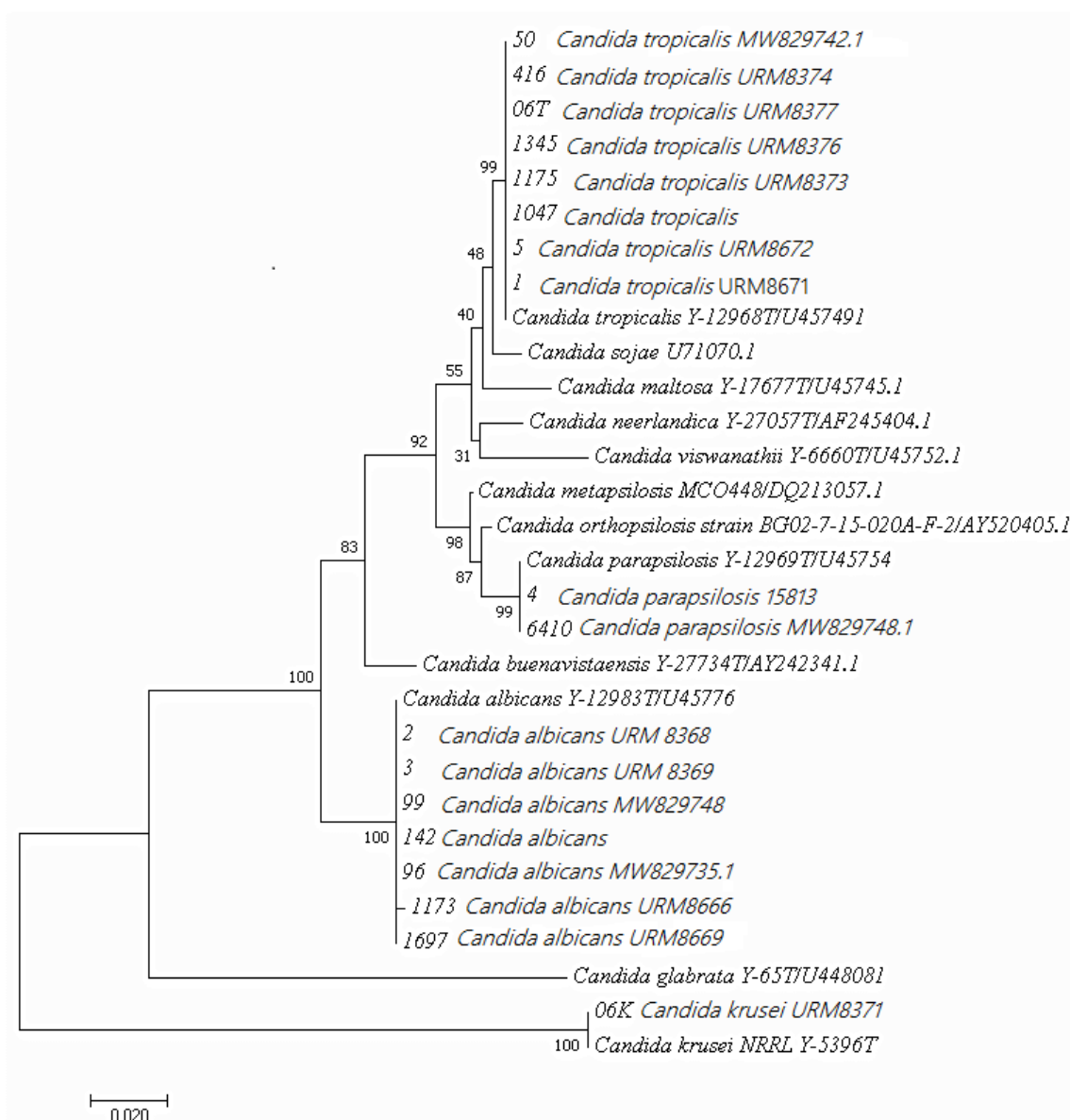
6410	MW829748.1	<i>Candida parapsilosis</i>
142	-	<i>C. parapsilosis</i>
96	MW829735	<i>C. albicans</i>
1173	URM8666	<i>C. albicans</i>
03	URM8369	<i>C. albicans</i>
1697	URM8669	<i>C. albicans</i>
1345	URM8376	<i>C. tropicalis</i>
416	URM8374	<i>C. tropicalis</i>
50	URM8670	<i>C. tropicalis</i>
02AM	URM8368	<i>C. albicans</i>
HC	-	<i>C. albicans</i>
1657	URM8667	<i>C. albicans</i>
1175	URM8373	<i>C. tropicalis</i>
06T	URM8377	<i>C. tropicalis</i>
109	-	<i>C. parapsilosis</i>
04AM	URM15813	<i>C. parapsilosis</i>
01AM	URM8671	<i>C. tropicalis</i>

07AM	URM8668	<i>C. albicans</i>
05	URM8672	<i>C. tropicalis</i>
06K	URM8371	<i>C. krusei</i>
99	MW829748	<i>C. albicans</i>

- : isolado sem código de depósito

A análise do sequenciamento a partir do software MEGA X permitiu inferir relações evolutivas resultando em uma árvore com valores de bootstrap de 100% para identificação dos isolados estudados, com uma taxa de confiança de 0,02. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 replicatas) são mostrados ao lado dos ramos. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Kimura (NISHIMAKI *et al*, 2019) e estão nas unidades do número de substituições de bases por sítio. A análise envolveu 30 sequências de nucleotídeos. As posições de códon incluídas foram 1º + 2º + 3º + Não-codificante. Todas as posições contendo lacunas e dados ausentes foram eliminadas. Havia um total de 469 posições no conjunto de dados final (**Figura 5**).

Figura 5 - Análise filogenética dos isolados de *Candida* estudados.



A partir do cladograma obtido através do sequenciamento genômico dos isolados, podemos inferir a presença de dois grandes grupos, um deles, de *Candida tropicalis*, sendo o mais filogeneticamente evoluído. Espécies de *C. tropicalis* possuem maior taxa de resistência a antifúngicos de primeira escolha como o azóis e anfotericina B. Mesmo sendo de grande distância evolutiva com as espécies de *C. albicans*, compartilham de semelhanças patogênicas como síntese de proteases, formação de biofilme e formações hialinas (CHAKRABARTI, 2023).

Os isolados de *Candida parapsilosis* aparecem próximos à *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Como sugerido por TAKASHIMA & SUGITA (2022), houve uma reclassificação taxonômica na qual três novas espécies de

Candida foram elucidadas a partir de uma evolução de cepas da *C. parapsilosis*, sendo agora dividida em três espécies (Complexo *C. parapsilosis*).

Filogeneticamente mais distante, o isolado de *C. krusei* aparece ao fim da árvore filogenética, é a forma anamorfa da espécie *Pichia kudriavzevii*, um importante fungo utilizado na indústria. Sua taxonomia foi primeiro elucidada por KURTZMAN e colaboradores na década de 1980, onde foi comprovado que ambas são espécies colineares, porém uma causa doença em humanos, outra é usada na indústria de bioenergias (DOUGLASS *et al.*, 2018). Sua grande distância com outras espécies de *Candida* na análise filogenética do rDNA fez com que sua classificação taxonômica fosse alterada e a espécie seja pertencente ao gênero *Pichia*, na família *Pichiaceae* (DOUGLASS *et al.*, 2018; CHAKRABARTI, 2023).

6 CONCLUSÃO

Portanto, conclui-se que o meio cromogênico foi sensível e específico na discriminação das espécies de *Candida albicans*. Entretanto, foi pouco sensível na diferenciação das espécies de *Candida* não-*C. albicans*. É um meio barato, de fácil manipulação e que imprime resultados em até 48 horas, acelerando o processo de identificação presuntiva na rotina laboratorial.

O uso do VITEK 2 como método de identificação de isolados de *Candida* não-*C. albicans* pode imprimir resultados discrepantes em relação ao padrão ouro em versões anteriores a 8.01, entretanto, seu custo benefício é grande, sobretudo no uso laboratorial, por ser um maquinário capaz de identificar espécies e imprimir testes de susceptibilidade a antifúngicos.

A identificação genômica das espécies oferece uma alta especificidade em relação aos demais métodos de identificação. Entretanto, seu alto custo de manutenção e potencial laboral, diminuem a sua utilização na rotina laboratorial.

Alternativas como uso de meios de cultura presuntivos, automação e genômica auxiliam na identificação de espécies.

REFERÊNCIAS

- AMBARAGHASSI G, DUFRESNE PJ, DUFRESNE SF, VALLIÈRES É, MUÑOZ JF, CUOMO CA, BERKOW EL, LOCKHART SR, LUONG ML. Identification of *Candida auris* by Use of the Updated VITEK 2 COMPACT® Yeast Identification System, Version 8.01: a Multilaboratory Evaluation Study. **J Clin Microbiol**. v. 57, n. 11, p. e00884-19, 2019.
- ASADZADEH, M. et al. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. **Journal of Medical Microbiol**. v. 58, n.1, p. 745-752, 2009.
- BELLEMAIN, E., CARLSEN, T., BROCHMANN, C. et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. **BMC Microbiol** 10, v.189, 2010.
- BRANCO J, MIRANDA IM, RODRIGUES AG. *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. **J Fungi (Basel)**, v.9, p.1-80, 2023.
- BRAZ SCM, MOTTA CMS, MASSA DML, NEVES RP, MAGALHÃES OMC. Viabilidade, confirmação taxonômica e detecção enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas University Recife Mycology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p.63, 2009.
- CASTANHEIRA, M., MESSER, S. A., RHOMBERG, P. R., & PFALLER, M. A. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.85, p. 200-204, 2016.

CATALDI OM, GUELFAND S, MALDONADO L, ARECHAVALA I, ALICIA. Evaluación del sistema VITEK 2 COMPACT® para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 46, p. 107–110, 2014.

CHAI ANN, YI LOUIS, DENNING W, DAVID W, WARN, PETER. *Candida tropicalis* in human disease. **Crit Rev Microbiol**. v. 36, p.282–298, 2010.

CHAKRABARTI, SHARMA M. A. Candidiasis and Other Emerging Yeasts. **Curr Fungal Infect Rep**. v.17, p.15-24, 2023.

CHANG, M. R. et al. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, v. 50, p. 265-8, 2008.

CLANCY, CORNELIUS J.; NGUYEN, M. HONG. Diagnosing invasive candidiasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 5, p. e01909-17, 2018.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Emergence of *Candida auris*: an international call to arms. **Clin. Infect. Dis.**, v. 64, p. 141–143, 2017.

COL, A. P., SAVI, D. C., ONOFRE, S. B. Identificação das leveduras do gênero *Candida* pelo método cromógeno CHROMAgar™ *Candida* obtidas de pacientes com infecção das vias urinárias. **Rev. Brás. Anal. Clin.** v.1, n 4, p. 279-281, 2009.

COOKE, V. M.; MILES, R. J.; PRICE, R. G.; MIDGLEY, G.; KHAMRI, W.; RICHARDSON, A. C. New Chromogenic Agar Medium for the Identification of *Candida* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3622-3627, 2002.

CRAMPIN AC, MATTHEWS RC. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment. **J Med Microbiol**. v.39, n.3, p.233-238, 1993.

DA ROCHA, WILMA RAIANNY VIEIRA et al. Gênero *Candida*-Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research**,

Society and Development, v. 10, n. 4, p. e43910414283-e43910414283, 2021.

DE ARAUJO, C. R., MIRANDA, K. C., PASSOS, X. S., SOUZA, L. K. H., LEMOS, J. de A., ABBAS KHRAIS, C. H., COSTA, C. R., SILVA, M. do R. R., & FERNANDES, O. de F. L. identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMAgar™ *Candida*. **Revista De Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, v. 34, n.1, 2007.

DE ARAUJO, C. R.; MIRANDA, K. C.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; LEMOS, J. de A.; ABBAS KHRAIS, C. H.; COSTA, C. R.; SILVA, M. do R. R.; FERNANDES, O. de F. L. IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* POR MÉTODOS MANUAIS CONVENCIONAISE PELO MÉTODO CROMÓGENO CHROMAGAR *CANDIDA*. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, Goiânia, v. 34, n. 1, 2007. Acesso em: 10 abr. 2023.

DE MELO CC, DE SOUSA BR, DA COSTA GL, OLIVEIRA MME, DE LIMA-NETO RG. Colonized patients by *Candida auris*: Third and largest outbreak in Brazil and impact of biofilm formation. **Front Cell Infect Microbiol**. v. 23, n.13, 2023.

DOUGLASS AP, OFFEI B, BRAUN-GALLEANI S, COUGHLAN AY, MARTOS AAR, ORTIZ-MERINO RA, BYRNE KP, WOLFE KH. Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names. **PLoS Pathog**. v.14, n.7, p.e1007138, 2018.

FREDERICKS DN, SMITH C, MEIER A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. **J Clin Microbiol**, v.43, n.10, 2005.

FREITAS BL, LEACH L, CHATURVEDI V, CHATURVEDI S. Reverse Transcription-Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR) Assay for the Rapid Enumeration of Live *Candida auris* Cells from the Health Care Environment. **J Clin Microbiol**, 2022.

FREYDIÈRE, A.M., Guinet, R. and Boiron, P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory, phenotypical methods. **Med Mycol** v.39, p. 9–33, 2001.

GIOLO, MURIEL PADOVANI; SVIDZINSKI, TEREZINHA INEZ ESTIVALET *Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 46, n. 3, p. 225–234, 2010.

GOULART, LETÍCIA S. *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility to vulvovaginal *Candida spp.* in southern Mato Grosso State, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 52, p. 233-237, 2016.

GUIMARÃES, MATILDE. **DIVERSIDADE E AFILIAÇÃO FILOGENÉTICA DE LEVEDURAS ASSOCIADAS À PLANTAS DE SORGO SACARINO [*Sorghum bicolor* (L.) MOENCH] CULTIVADAS NO CERRADO**. Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel. 2016. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Sete Lagoas, 2016. Disponível em: [https://www.ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/ppgca/Dissertacao%20Matilde%20%2015_2_16\(4\).pdf](https://www.ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/ppgca/Dissertacao%20Matilde%20%2015_2_16(4).pdf). Acesso em: 06 mar. 2023.

HULIMANE S, MALUVADI-KRISHNAPPA R, MULKI S, RAI H, DAYAKAR A, KABBINAHALLI M. Speciation of *Candida* using CHROMAgar™ in cases with oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **J Clin Exp Dent**. v. 1, n. 10, p. 657-660, 2018.

INÁCIO, C. P.; BESERRA, F. G.; SOARES, C. R. P.; ROMAGUERA, L. M. D.; ARAÚJO, P. S. R. de; BUONAFINA, M. D. S.; ARAÚJO NETO, L. N.; SANTOS, D. C. DOS; NEVES, R. P. Epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Candida* species in tertiary hospitals: Update on regional trends. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e59810414462, 2021.

J.D. PERRY; A.M. FREYDIÈRE. The application of chromogenic media in clinical microbiology. **J Appl Microbiol**. v.103, p.2046–2055, 2007.

JAFARI Z, MOTAMEDI M, JALALIZAND N, SHOKOOHI GR, CHARSIZADEH A, MIRHENDI H. Comparison of CHROMagar, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, and polymerase chain reaction-fragment size for the identification of *Candida* species. **Curr Med Mycol.** v.3, n.3, p. 10-15, 2017.

KAUR R, DHAKAD MS, GOYAL R, HAQUE A, MUKHOPADHYAY G. Identification and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species: A Comparison of Vitek-2 System with Conventional and Molecular Methods. **J Glob Infect Dis.** v. 8, n. 4, p. 139-146, 2016.

KIDD SE, ABDOLRASOULI A, HAGEN F. Fungal Nomenclature: Managing Change is the Name of the Game. **Open Forum Infect Dis.** v.10, p.1, 2023.

KURTZMAN, C.P, FELL, W.F, BOEKHOUT, T. and ROBERT V. *Methods for isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts.* In C.P. Kurtzman, J.W Fell, T. Boekhout. **The Yeasts. A taxonomic study.** v. 1, p. 87-107, 2011.

KOTEY FC, DAVIE NT, TETTEH-UARCOO PB, DONKOR ES. *Candida* Bloodstream Infections: Changes in Epidemiology and Increase in Drug Resistance. **Infect Dis (Auckl).** v. 14, p. 117863372110269, 2021.

LI, Y. L., LEAW, S. N., CHEN, J. H. et al. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 22, p. 693, 2003.

MAGEE BB, R PT. Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol.** v. 22, p.187–193, 2005.

MARCOS-ARIAS C, MATEO E, JURADO-MARTÍN I, PENA-FERNÁNDEZ N, CANTÓN E, PEMÁN J, QUINDÓS G, ERASO E. Utility of two PCR-RFLP-based techniques for identification of *Candida parapsilosis* complex blood isolates. **Mycoses.** v.65, n. 5, p. 461-470, 2020.

MCCARTY TP, WHITE CM, PAPPAS PG. Candidemia and Invasive Candidiasis. **Infect Dis Clin North Am.** v. 35, n. 2, p. 389-413, 2021.

McCULLOUGH, M. J., Ross, B. C., & Reade, P. C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 25. p.136–144, 1996.

MIDGLEY, GILLIAN; CLAYTON, Yvonne M.; HAY, Roderick J.. **Diagnóstico em cores da Micologia Médica**. São Paulo: Manole Ltda, 1998.

MONDELLI, A. L., NIÉRO-MELO, L., BAGAGLI, E. et al. *Candida* spp.: manual identification (reference method) and automated identification (VITEK system platform). **J. Ven. Anim. Tox. Trop. Dis.** v.18, n.3, p.335-339, 2012.

MONI M, SIDHARTHAN N, SUDHIR S, PRABHU B, NAMPOOTHIRI V, JAMES J, PHILIP JM, THOMAS J, ANTONY R, MOHAMED ZU, KUMAR A, PRASANNA P, EDATHADATHIL F, SINGH S, SATHYAPALAN D. A quality improvement initiative to improve the appropriateness of candidemia management by the implementation of a comprehensive candidemia care bundle at a tertiary care hospital in South India: Results of a quasi-experimental study. **Medicine (Baltimore)**. v. 101, (p).e- 28906, 2022.

MULET BAYONA JV, SALVADOR GARCÍA C, TORMO PALOP N, GIMENO CARDONA C. Evaluation of a novel chromogenic medium for *Candida* spp. identification and comparison with CHROMAgar™ *Candida* for the detection of *Candida auris* in surveillance samples. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 98, n.4 p.(e)115168, 2020.

MULET BAYONA JV, SALVADOR GARCÍA C, TORMO PALOP N, VALENTÍN MARTÍN A, GONZÁLEZ PADRÓN C, COLOMINA RODRÍGUEZ J, PEMÁN J, GIMENO CARDONA C. Novel Chromogenic Medium CHROMAgar™TM *Candida* Plus for Detection of *Candida auris* and Other *Candida* Species from Surveillance and Environmental Samples: A Multicenter Study. **J Fungi (Basel)**. v. 8, p. 281, 2022.

NADEEM SG, HAKIM ST, KAZMI SU. Use of CHROMAgar™ *Candida* for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. **Libyan J Med.** v.5, p.1–6, 2010.

NILSSON RH, TEDERSOO L, RYBERG M, KRISTIANSSON E, HARTMANN M, UNTERSEHER M, PORTER TM, BENGTSSON-PALME J, WALKER DM, DE SOUSA F, GAMPER HA, LARSSON E, LARSSON KH, KÖLJALG U, EDGAR RC, ABARENKOV K. A Comprehensive, Automatically Updated Fungal ITS Sequence Dataset for Reference-Based Chimera Control in Environmental Sequencing Efforts. **Microbes Environ.** v. 30, n. 2, p. 145-50, 2015.

NISHIMAKI T, SATO K. An Extension of the Kimura Two-Parameter Model to the Natural Evolutionary Process. **J Mol Evol.** v. 87, n. 1. p. 60-67, 2019.

NOBILE CJ, JOHNSON AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annu Rev Microbiol.** v. 69, p. 71-92, 2015.

OCHIUZZI MARIA E, CATALDI MARIA SILVANA S., GUELFAND LILIANA, MALDONADO IVANA, ARECHAVALA ALICIA. Evaluación del sistema VITEK 2 COMPACT® para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*. **Revista Argentina de Microbiología.** v. 46, n. 2, p. 107-110, 2014.

ODDS FC, BERNAERTS R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J Clin Microbiol.** v. 32, p. 1923-1929, 1994.

O'MEARA TR, ROBBINS N, COWEN LE. The Hsp90 Chaperone Network Modulates *Candida* Virulence Traits. **Trends Microbiol.** v. 10, p. 809-819, 2017.

PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES DR, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.**, v. 62, p.e1-e50, 2016.

PAPPAS, P. G. et al. The NIAID Mycoses Study Group: a prospective observational study of candidemia, epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clin Infect Dis**, v. 37, p. 634-43, 2003.

PAPPAS, PETER G.; LIONAKIS, MICHAEL S.; ARENDRUP, MAIKEN CAVLING; OSTROSKY-ZEICHNER, LUIS; KULLBERG, BART JAN. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers.** 2018.

PITARCH A, NOMBELA C, GIL C. Diagnosis of Invasive Candidiasis: From Gold Standard Methods to Promising Leading-edge Technologies. **Curr Top Med Chem.** v. 18, n. 16, 2018.

RAMOS R, CACERES DH, PEREZ M, GARCIA N, CASTILLO W, SANTIAGO E, BORACE J, LOCKHART SR, BERKOW EL, HAYER L, ESPINOSA-BODE A, MORENO J, JACKSON BR, MORAN J, CHILLER T, DE VILLARREAL G, SOSA N; Red nacional de vigilancia epidemiológica en microbiología clínica, vallabhaneni s. Emerging multidrug-resistant *Candida duobushaemulonii* infections in panama hospitals: importance of laboratory surveillance and accurate identification. **J clin microbiol.** v. 25, n. 56, e00371-18, 2018.

RUIZ-GAITÁN A, SIGONA-GIANGRECO I, PÉREZ-ROYO JM, GARCIA-BUSTOS V, GARCÍA-HITA M, VALENTÍN-GÓMEZ E, ALMARAZ SG, DE GROOT PWJ, PEMÁN J. Usefulness of Chromogenic Media with Fluconazole Supplementation for Presumptive Identification of *Candida auris*. **Diagnostics (Basel).** v. 13, n. 2, p. 231, 2023.

SANKARI LEENA S, MAHALAKSHMI K, NAVEEN KUMAR V. Chromogenic medium versus PCR-RFLP in the speciation of *Candida*: a comparative study. **BMC Res Notes.** v. 12, n. 1, p. 681, 2019.

SANKARI, LEENA S, MAHALAKSHMI K, NAVEEN KUMAR V. Chromogenic medium versus PCR-RFLP in the speciation of *Candida*: a comparative study. **BMC Res Notes.** v. 12, p. 681, 2019.

SAXENA A, NAGI R, SANDEEP T, PATIL DJ, CHOUDHARY R, KAUR A. Identification of *Candida albicans* and non*albicans Candida* resistant species in tobacco users and oral squamous cell carcinoma patients: Comparison of HiCrome agar and automated VITEK 2 COMPACT® system. **J Oral Maxillofac Pathol.** v. 25, p. 551-552, 2021.

SCHARMANN U, KIRCHHOFF L, CHAPOT VLS, DZIOBAKA J, VERHASSELT HL, STAUF R, BUER J, STEINMANN J, RATH PM. Comparison of four commercially available chromogenic media to identify *Candida albicans* and other medically relevant *Candida* species. **Mycoses.** v. 63, p. 823-831, 2020.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 261, 266.

SILVA, C. M.; PARAHYM, A. M. R. C.; MACEDO, D. P. C.; **INÁCIO, CICERO PINHEIRO**; DE LIMA-NETO, REGINALDO GONÇALVES; NEVES, REJANE PEREIRA. IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DO COMPLEXO *Candida Parapsilosis*. In: Benedito Rodrigues da Silva. (Org.). **Principais grupos e aplicações biotecnológicas dos fungos**. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019, v. 1, p. 30-40.

SILVA, Kassia Gabriela Vieira et al. Morfologia, epidemiologia e virulência de espécies do gênero *Candida*. **Tópicos nas ciências da saúde**. v. 7, p. 42-58, 2021.

SOBEL JD, AKINS RA. The Role of PCR in the Diagnosis of *Candida* Vulvovaginitis-a New Gold Standard? **Curr Infect Dis Rep**. v. 17, n. 6, 2015.

STEFANIUK, ELŻBIETA, BARANIAK, ANNA, FORTUNA, MONIKA and HRYNIEWICZ, WALERIA. "Usefulness of CHROMagar Candida Medium, Biochemical Methods – API ID32C and VITEK 2 COMPACT® Compact and Two MALDI-TOF MS Systems for *Candida* spp. Identification" **Polish Journal of Microbiology**. v. 65, n. 1, p. 111-114, 2016.

TAKASHIMA M, SUGITA T. Taxonomy of Pathogenic Yeasts *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, and *Trichosporon*. **Med Mycol J**. v. 63, n. 4, 2022.

TSCHERNER M, TOBIAS W. Giessen, LAURA Markey, CAROL A. KUNAMOTO, and PAMELA A. Silver. A Synthetic System That Senses *Candida albicans* and Inhibits Virulence Factors. **ACS Synthetic Biology** v. 8, n. 2, p. 434-444, 2019.

WAHYUNINGSIH, R., FREISLEBEN, H. J., SONNTAG, H. G., & SCHNITZLER, P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. **Journal of clinical microbiology**. v. 38, p. 3016–3021, 2000.

WILLINGER B, MANAFI M. Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. **Mycoses**. v. 42, n. 1-2, p. 61-65, 1999.

WOHLMEISTER D, VIANNA DRB, HELFER VE, CALIL LN, BUFFON A, FUENTEFRIA AM, CORBELLINI VA, PILGER DA. Differentiation of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei* by FT-IR and chemometrics by CHROMAgar™ Candida. **J Microbiol Methods**. v. 141, p. 121-125, 2017.

XU, J., RAMOS, A.R., VILGALYS, R., MITCHELL, T.G. Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. **J Clin Microbiol**. v. 38, p. 1214–1220, 2000.

ZHANG R, ZHOU J, SONG Z, HUANG Z. Enzymatic properties of β -N-acetylglucosaminidases. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 102, p. 93-103, 2018.