



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS

GIOVANA RODRIGUES BARROS

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Candida auris*:
Uma análise do perfil clonal e *SNPs* no gene *CDR1*

Recife
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

GIOVANA RODRIGUES BARROS

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *CANDIDA AURIS*:
Uma análise do perfil clonal e *SNPs* no gene *CDR1*

TCC apresentado ao Curso de Ciências Biológicas-Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico do Recife, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rejane Pereira Neves
Coorientador: Dr. Cícero Pinheiro Inácio

Recife

2024

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

Barros, Giovana Rodrigues.

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE CANDIDA AURIS: Uma
análise do perfil clonal e SNPs no gene CDR1 / Giovana Rodrigues Barros. -
Recife, 2024.

55 : il., tab.

Orientador(a): Rejane Pereira Neves

Coorientador(a): Cícero Pinheiro Inácio

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2024.

Inclui referências.

1. Micologia Médica;. 2. Biologia molecular. 3. Mecanismos Resistência.
4. Microsatélite. I. Neves, Rejane Pereira. (Orientação). II. Inácio, Cícero
Pinheiro. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

GIOVANA RODRIGUES BARROS

TÍTULO: Estudo da diversidade genética de *Candida auris*: uma análise do perfil clonal e *SNPs* no gene *CDR1*

TCC apresentado ao Curso de Ciências Biológicas-Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico do Recife, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Aprovado em: 02/09/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Cícero Pinheiro Inácio (Coorientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a.Bruna Rodrigues de Sousa (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Me.Claudio Antônio de Moura Pereira (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho ao meu avô e irmão, que me inspiram com força, sabedoria e coragem para que eu consiga atingir os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Universidade Federal de Pernambuco e ao CNPq, que tornaram possível a execução deste presente trabalho, e a toda equipe do Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos. Principalmente aos meus orientadores, por toda paciência e dedicação, a Alice, Daniela e Raquel que me prepararam não apenas profissionalmente, mas também para vida.

Aos melhores amigos e parceiros que eu poderia ter tido ao longo desse processo, agradeço principalmente a Julie e Isabelly que além de parceiras de trabalho, foram amigas que sempre estiveram ao meu lado. A Eriberto, Paulo, Amaury, Cláudio, Ailton, Herbet, Bruno, Caio e Tayna, amigos com os melhores conselhos e apoio possíveis.

A Everton e sua família que se tornam a minha família, dividindo alegrias e tristezas, sendo cruciais para minha formação. A meus tios Fábio e Luana, e a meu avô que não me deixaram desistir. A meu irmão Gabriel, minha motivação diária e meus pais que me deram toda a base e preparo para que eu fosse quem eu sou hoje e quem serei no futuro.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, e certamente tiveram impacto no meu aprendizado e na minha formação acadêmica.

“O maior erro que um homem pode cometer é sacrificar a sua saúde a qualquer outra vantagem.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O gênero *Candida* engloba cerca de 800 espécies, das quais, aproximadamente 20 são patógenos oportunistas que podem ocasionar infecções superficiais e invasivas com potencial para óbito. Dentre elas, *Candida auris* destaca-se por seu aumento de incidência em infecções fúngicas nos últimos anos e elevada resistência a antifúngicos, o que reflete em altas taxas de mortalidade. A identificação precisa de *C. auris* é dificultada por sua semelhança morfológica com outras espécies fúngicas, exigindo ferramentas moleculares, como o sequenciamento genômico, para uma caracterização precisa. Além disso, cepas de *C. auris* demonstram multirresistência a todas as principais classes de antifúngicos. Múltiplos genes, incluindo o gene *CDR1*, apresentaram evidências de uma possível relação com mecanismos de resistência, especialmente por meio da bomba de efluxo, que reduz a eficácia dos tratamentos de infecções fúngicas. Diante disso, o presente estudo visa analisar a similaridade genética das cepas de *C. auris* da cidade de Recife e avaliar a possível relação entre mutações no gene *CDR1* e as alterações fenotípicas associadas à bomba de efluxo, visando melhor compreender as características e mecanismos de virulência de *C. auris*. Para isso, foi realizado o sequenciamento do domínio D1/D2 da região *LSU* do DNA ribossomal, a análise do perfil clonal dos isolados por dois marcadores moleculares (*GTG5* e *T3B*), o sequenciamento e análise do gene *CDR1* e posterior avaliação das proteínas *ABC*. Dessa maneira, os resultados obtidos pelo sequenciamento da região *LSU* e marcadores confirmaram que todos os isolados são clones filogeneticamente mais próximos do clado IV de *C. auris*, enquanto que o isolado japonês está mais próximo do clado II. Além disso, as mutações encontradas não implicaram em alterações estruturais nas proteínas *ABC*. Recomenda-se, assim, a continuidade de trabalhos como este para uma melhor compreensão da estrutura populacional, diversidade genética e mecanismos de virulência de *C. auris*, sendo crucial para um melhor prognóstico e manejo de pacientes com infecções fúngicas.

Palavras-chave: Micologia Médica; Biologia molecular; Mecanismos Resistência; Microsatélite.

ABSTRACT

The genus *Candida* encompasses around 800 species, of which approximately 20 are opportunistic pathogens that can cause superficial infections with the potential for death. Among them, *Candida auris* stands out for its increased incidence of fungal infections in recent years and high resistance to antifungals, reflected in high mortality rates. Accurate identification of *C. auris* is hampered by its morphological similarity to other fungal species, requiring molecular tools, such as genomic sequencing, for accurate characterization. Furthermore, *C. auris* strains demonstrate multiresistance to all major classes of antifungals. Several genes, including the *CDR1* gene, presented evidence of a possible relationship with resistance mechanisms, especially through the efflux pump, which reduces the effectiveness of treatments for fungal infections. Therefore, the present study aims to analyze the genetic similarity of *C. auris* strains from Recife and evaluate the possible relationship between mutations in the *CDR1* gene and the phenotypic changes associated with the efflux pump, seeking better to understand the characteristics and virulence mechanisms of *C. auris*. To this end, sequencing of the D1/D2 domain of the *LSU* region of ribosomal DNA was carried out, analysis of the clonal profile of the isolates using two molecular markers (*GTG5* and *T3B*), sequencing and analysis of the *CDR1* gene and subsequent evaluation of *ABC* proteins. Thus, the results obtained by sequencing the *LSU* region and markers confirm that all isolates are clones phylogenetically closer to clade IV of *C. auris*. In contrast, the Japanese isolate is closer to clade II. Furthermore, the mutations identified did not result in structural changes in *ABC* proteins. Therefore, it is recommended the continuation of studies like this to better understand the population structure, genetic diversity, and virulence mechanisms of *C. auris*, which is crucial for a better prognosis and management of patients with fungal infections.

Keywords: Medical Mycology; Molecular biology; Resistance Mechanisms; Microsatellite.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Célula de levedura exposta a azólicos. Em A, há a concentração dos compostos azólicos no meio intracelular, ocasionando danos à membrana celular e extravasamento do material citoplasmático, resultando na morte celular. Em B, as bombas de efluxo expulsam os compostos azólicos, diminuindo sua concentração no meio intracelular antes que possa causar danos celulares, preservando a integridade celular.

24

Imagem 1 - Gel de eletroforese de reações em cadeia da polimerase convencional, utilizando os primers NL1 e NL4 (Tabela 1), de isolados de *C. auris*. Amplicons da região LSU com aproximadamente 750 pb

36

Figura 2 – Análise evolutiva pelo método de Máxima Verossimilhança. A história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo Tamura-Nei. A árvore com maior probabilidade de log (-7501,18) é mostrada. A percentagem de árvores nas quais os táxons associados estão agrupados é mostrada junto aos ramos. As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbour-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando o modelo Tamura-Nei e, em seguida, selecionando a topologia com valor de log de verossimilhança superior. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos medidos no número de substituições por local. Esta análise envolveu 38 sequências de nucleotídeos. Houve um total de 719 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA-X 10.2.6.

37

Figura 3 - Análise da similaridade genética de isolados de *Candida auris* utilizando os marcadores *GTG5* e *T3B*. 1.a. Gel de eletroforese de reações em cadeia da polimerase. Amplificação da região *GTG5* de isolados de *Candida auris* utilizando o primer *GTG5* (Tabela 1). Evidenciando o isolado ATCC B11220, em vermelho, padrão de bandas diferentes. 1.b. Dendrograma derivado da matriz de similaridade obtida do padrão de bandas do gel de eletroforese com o marcador *GTG5*, após

análise com o programa Past versão 4.03 usando o coeficiente Dice e análise UPGMA. 2.a. Gel de eletroforese de reações em cadeia da polimerase. Amplificação da região *T3B* de isolados de *Candida auris* utilizando o primer *T3B* (Tabela 1). Evidenciando o isolado ATCC B11220, em vermelho, com expressiva diferença na intensidade e no padrão de bandas. 2.b. Dendrograma derivado da matriz de similaridade obtida do padrão de bandas do gel de eletroforese com o marcador *T3B*, após análise com o programa Past versão 4.03 usando o coeficiente Dice e análise UPGMA.

39

Imagem 2 - Gel de eletroforese de reações em cadeia da polimerase (PCR) com diferentes temperaturas de anelamento (*Ta*) para a determinação da temperatura ótima do primer específico para o gene *CDR1* de *Candida auris*.

41

Figura 4. Modelagem estrutural da proteína ABC codificada pelo gene *CDR1* em *Candida auris*. A e B mostram a estrutura da proteína. C e D mostram os gráficos de Ramachandran das respectivas proteínas. Sendo A e C da ATCC B11220, e B e D do isolado URM8617.

43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados para o sequenciamento da região LSU (NL1 e NL4) e para análise do perfil clonal de isolados de *Candida auris* (marcadores *GTG5* e *T3B*). 31

Tabela 2 - Isolados clínicos de *Candida* proveniente da Coleção de Culturas Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e cepas controle provenientes do Japão (B11220) e Estados Unidos da América (B11903). 35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 O Gênero <i>Candida</i>	16
2.2 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde	17
2.3 <i>Candida auris</i>	18
2.3.1 Epidemiologia genética de <i>Candida auris</i>	19
2.4 Resistência fúngica	20
2.4.1 Gene <i>CDR1</i>	22
2.4.1.1 Bomba de efluxo	23
2.5 Biologia molecular	25
2.5.1 Ômicas	25
2.5.2 Os Marcadores moleculares	26
2.5.2.1 Microssatélites	27
2.5.2.2 Polimorfismos de nucleotídeo único	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 METODOLOGIA	30
4.1 Obtenção dos isolados	30
4.2 Identificação taxonômica	30
4.2.1. Extração do DNA	30
4.2.2 PCR convencional	31

4.2.3 Sequenciamento	32
4.2.4. Análise de bioinformática	32
4.3 Similaridade genética	32
4.3.1 Amplificação	32
4.3.2. Análise de similaridade	32
4.4. Análise de mutações	33
4.4.1. Desenho dos primers	33
4.4.2. Pcr convencional	33
4.4.3. Sequenciamento	34
4.4.4. Análise das sequências alvo	34
4.4.5. Análise dos produtos proteicos	34
5 Resultados e Discussão	35
5.1. Obtenção dos isolados	35
5.2. Identificação taxonômica	35
5.3. Similaridade genética	38
5.4. Análise de mutações	40
5.4.1 Análise dos produtos proteicos	42
6 Conclusão	45
Referências	46

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* compreende aproximadamente 800 espécies, das quais cerca de 20 são patógenos oportunistas responsáveis por micoses superficiais (Candidíase superficial) e profundas (Candidíase Sistêmica), podendo levar a óbito (Index Fungorum, 2024; Bhattacharya, Sae-Tia e Fries; 2020). Entre essas, *Candida auris* tem se destacado devido ao aumento na frequência de isolamento em infecções fúngicas recentes (Du *et al.*, 2020). Além disso, fatores como a difícil identificação e a elevada resistência a antifúngicos contribuem para elevadas taxas de mortalidade relacionadas a esta espécie (Sato *et al.*, 2009; Ademe e Girma; 2020). A identificação de *C. auris* é desafiada pela semelhança morfológica com espécies como as do complexo *C. haemulonii*, *Saccharomyces cerevisiae* e outras espécies intimamente relacionadas. Desta forma, o uso das ferramentas moleculares para caracterização precisa é exigida (Jeffery-Smith; 2018), sendo o sequenciamento genômico das regiões *ITS* (espaçadora transcrita interna) e *LSU* (subunidade maior do DNA ribossomal) são o padrão ouro para a identificação microbiológica em nível de espécie (Hilt e Ferrieri; 2023).

Em relação a resistência fúngica, podem ser observadas cepas de *C. auris* resistentes a 2 ou mais antifúngicos (multirresistência), incluindo todas as 5 classes de antifúngicos disponíveis (azólicos, equinocandinas, análogos de pirimidina, alilaminas e poliênicos), trazendo assim uma preocupação global dada a limitação de opções terapêuticas (Desoubreaux *et al.*, 2022). Além disso, trabalhos como os de Chowdhary *et al.* (2018); Chybowska *et al.* (2020) e Wang e Xu (2024) associam diferentes famílias gênicas à resistência fúngica, incluindo ao menos 19 genes. Dentre eles estão a família de genes *CDR* (*Candida Drugs Resistance*), os quais estão associadas a mecanismos de virulência em espécies como *C. albicans* (Maras *et al.*, 2021). Dessa maneira, os genes *CDRs* podem também estar relacionados a um dos principais mecanismos de resistência de *C. auris*, a bomba de efluxo, a qual diminui a concentração intracelular dos antifúngicos, comprometendo a eficácia do tratamento (Iyer *et al.*, 2020).

Dessa forma, a identificação precisa da espécie é crucial para um tratamento direcionado e melhor prognóstico. Além disso, o entendimento dos mecanismos de

virulência fúngica são imprescindíveis para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas e alvos biológicos. Sendo assim, este estudo visa analisar a similaridade genética entre as cepas de *C. auris* coletadas em Recife e avaliar a possível relação entre mutações no gene *CDR1* e alterações fenotípicas na bomba de efluxo de fármacos em *C. auris*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O gênero *Candida*

As leveduras são fungos unicelulares cosmopolitas capazes de se adaptar a variados habitats, podendo ser encontradas no meio ambiente (solo, água salgada), em vegetais e em animais humanos e não-humanos. Diversas espécies fúngicas compõem a microbiota humana, variando de sítio corpóreo a depender do gênero, podendo ser de maneira transitória (alóctone), em que podem ocasionar infecções em situações de desequilíbrio, ou residente (autóctone), sendo importantes para o equilíbrio do microbioma humana por evitarem infecções e doenças (Sivieri., 2021). Dentre elas estão incluídas algumas espécies pertencentes aos gêneros *Candida*, *Saccharomyces* e *Malassezia* (Carmona-Cruz, Orozco-Covarrubias e Sáez-de-Ocariz, 2022; Niu *et al.*, 2023).

O gênero *Candida* é amplamente estudado e bem caracterizado, sendo composto por leveduras que podem apresentar dimorfismo celular, como a presença de hifas e pseudo-hifas. Ainda que semelhantes, as pseudo-hifas se diferenciam das hifas verdadeiras, pelo alinhamento em cadeia de células de levedura, as quais se agrupam por brotamento, característico da reprodução assexuada do gênero (Kadosh, Mundodi *et al.*, 2020). Em relação às características de coloração e morfologia, apresentam células hialinas ovaladas e globosas em microscopia e colônias de coloração branca e/ou amarelada com aspecto liso a rugoso, opaco e/ou cremoso em macroscopia (Sato *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2020).

Devido ao aumento populacional e alterações climáticas, organismos antes incapazes de colonizar humanos têm se adaptado significativamente ao novo hospedeiro nos últimos anos, ocasionando surtos de doenças por agente etiológicos antes não relatados (Seidel *et al.*, 2024; NNADI *et al.*, 2021). A frequência de isolamento das espécies varia a depender da geografia e da incidência de determinadas doenças de base, sendo *C. albicans* a espécie, do gênero *Candida*, mais frequentemente isolada em pacientes acometidos por infecções fúngicas em todo o mundo (PAPPAS *et al.*, 2018). Espécies como *C. tropicalis*, as do complexo *C. parapsilosis*, *C. auris* e *C. glabrata* também são frequentemente isoladas,

apresentando significativo aumento de incidência em todo o mundo nas últimas décadas (Rocha *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2023).

2.2. Infecções relacionadas à assistência à saúde

Embora algumas espécies de *Candida* possam fazer parte da microbiota natural, está entre os principais agentes fúngicos das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (Da Silva *et al.*, 2019), que dizem respeito a qualquer infecção que ocorra ao longo da internação, se manifestando durante ou após o período de internação (Baptista *et al.*, 2020). IRAS podem ser ocasionadas por fungos, parasitas, vírus ou bactérias, os quais geralmente apresentam considerável potencial de contágio (Gomes *et al.*, 2020). A contaminação pode ocorrer em unidades de terapia intensiva ou semi-intensiva, ambulatorios, salas de espera e sala de cirurgias, dentre outros locais dentro do ambiente hospitalar (Salvi *et al.*, 2020).

Longos períodos de internação, cirurgias, utilização de imunossupressores, de equipamentos médicos invasivos (cateteres, sonda), ou a presença de doenças de bases (câncer, HIV, diabetes), são alguns dos vários fatores predisponentes a infecções por *Candida*. A qual se utiliza desse desequilíbrio para migrar para variados sítios corpóreos incomuns, ocasionando infecções sistêmicas como a candidemia (Da Silva *et al.*, 2019; Baptista *et al.*, 2020; Rocha *et al.*, 2020). A candidemia, por sua vez, é uma infecção hematopoiética ocasionada exclusivamente por leveduras do gênero *Candida*, a qual, além de afetar milhões de pessoas anualmente, pode apresentar taxa de mortalidade de 77% (318/416) a depender da doença de base e do perfil de susceptibilidade do agente (Farias e Gama, 2020; Correa *et al.*, 2023).

Com o aumento significativo das doenças de base e, conseqüentemente, cirurgias nas últimas décadas, a incidência das IRAS aumentou substancialmente, estando entre as principais causas de óbito no Brasil (Miranda, Campos, Vieira; 2020, Baptista *et al.*, 2020; Da Rocha *et al.*, 2021). Além disso, por apresentar elevada taxa de mortalidade (variando entre 30 e 50 %), relacionada com fatores inerentes ao microrganismo, como espécie e cepa isolada, e ao hospedeiro, a candidemia está entre as principais infecções da corrente sanguínea dentro do

ambiente hospitalar na Europa e em países como Estados Unidos da América, Japão e Brasil (Asai *et al.*, 2021).

“No Brasil as IRAS apresentam taxas de incidência de 22,8% quando comparado aos países europeus, cujas taxas são menores que 9%” (Gomes *et al.*, 2020, p. 2), resultando em milhares de mortes anualmente em todo o globo. Estudos apontam, ainda, que cerca de 59% dos pacientes são acometidos por infecções ao longo da internação (Pappas *et al.*, 2018; Farias e Gama, 2020). Essas taxas trazem considerável preocupação em todos os continentes por variados fatores, como o aumento do custo e tempo de internação, além do aumento das chances de maiores complicações ao longo do tratamento (Nigumeleu *et al.*, 2020; Sterwart *et al.*, 2021).

Outro fator agravante diz respeito à utilização em larga escala de antibióticos de amplo espectro, dado o tempo necessário para a identificação do agente etiológico. Sendo assim, o tratamento é comumente iniciado antes mesmo da caracterização do agente, contribuindo para a utilização indiscriminada de antibióticos, o que tem contribuído significativamente para o surgimento de surtos e aparecimento de novos microrganismos multirresistentes (Da Rocha *et al.*, 2021). Ainda que existam medidas preventivas, como a adequada higienização e esterilização das mãos e ambiente, além do manejo de antibióticos de maneira consciente, a má execução dos protocolos favorece a incidência de IRAS, como a candidemia, possibilitando também o surgimento de fungos multirresistentes ao tratamento, sobretudo espécies de *Candida* (De Aguiar Portela, *et al.*, 2020).

2.3. *Candida auris*

Candida auris foi isolada pela primeira vez em 1996 na Coreia do Sul, onde foi erroneamente identificada como *C. haemulonii*. Apenas em 2009, no Japão, outro isolado foi obtido de uma paciente com infecção auditiva, sendo possível identificar *C. auris* corretamente pela primeira vez com o auxílio de ferramentas moleculares. No período anterior a 2009, casos de infecção por *C. auris* eram raros, sugerindo se tratar de um patógeno recém evoluído (Du *et al.*, 2020).

A origem de *C. auris* ainda não foi bem elucidada, mas, a coleta de isolados de pântanos salgados, praias arenosas e zonas úmidas, evidenciam que se trata originalmente de um fungo de ambiente, que tenha se adaptado a sítios corpóreos humanos (Casadevall *et al.*, 2019 e Arora *et al.*, 2021). Essa hipótese é suportada dada as características peculiares de *C. auris*, as quais a difere das demais espécies do gênero, como termoresistência, osmotolerância e plasticidade morfológica (Du *et al.*, 2020).

A capacidade de *C. auris* resistir a altas temperaturas, ambientes salinos e plasticidade morfológica, permite que as células fúngicas consigam se aderir a ambientes abióticos por mais tempo (Du *et al.*, 2020). Essas características favorecem a formação de biofilmes, os quais propiciam maiores chances de contaminação, além de uma maior capacidade de adesão a tecidos humanos. A alta capacidade de formação de biofilme e a multirresistência são alguns dos componentes que caracterizam a alta virulência de *C. auris*, podendo variar a depender da cepa e do clado pertencente (Gómez-Gaviria *et al.*, 2023).

2.3.1. Epidemiologia genética de *Candida auris*

As mudanças climáticas (Jackson *et al.*, 2019) e a migração humana (Chow *et al.*, 2020), propiciam uma maior disseminação de doenças, logo, o potencial patogênico de *C. auris* preocupa cientistas e profissionais de saúde em todo o mundo. Em 2022, a OMS (Organização mundial de saúde), considerou *C. auris* como o quarto patógenos fúngicos prioritários (OMS, 2022) por ter ocasionado surtos em mais de 30 países, como Brasil, Japão e países europeus (Rhodes e Fisher, 2019).

Contudo, a origem de *C. auris* ainda não foi bem elucidada, sendo possível observar cepas com diferenças genotípicas e fenotípicas, possibilitando dividi-las em 6 clados. clado I (Sul Asiático), clado II (Leste Asiático), clado III (Sul Africano), clado IV (Sul-Americano), clado V (do Irã) e clado VI (de Singapura) (Rhodes e Fisher, 2019; Spruijtenburg *et al.*, 2022; Suphavitai *et al.*, 2023). Cada clado é denominado de acordo com o local onde seu primeiro isolado foi encontrado, mas, estudos como o de Chen *et al.* (2020), demonstraram que cepas de diferentes clados podem ser

observados em um mesmo território. Trabalhos como o de Ross e Lorenz (2020), evidenciam que as distribuições cada vez mais mistas entre linhagens pertencentes a diferentes clados de *C. auris* possibilitam recombinações e, consequentemente, descendentes híbridos geneticamente diversos.

O sequenciamento do genoma completo (*Whole Genome Sequencing* - WGS) revelou que os clados I, II, III e IV emergiram de forma independente e quase simultânea em diferentes locais (Lockhart *et al.*, 2017). A divisão dos clados pode ser realizada por diferentes formas, como pela citogenética ou por WGS. Através da citogenética é possível identificar alterações cromossômicas, sendo possível observar regiões conservadas do genoma e rearranjos cromossômicos. Trabalhos, como o de Munoz *et al.* (2018), denotam alterações cromossômicas em isolados de *C. auris* que permitem diferenciá-los não apenas entre espécies, mas também entre clados. Em relação ao WGS, a diferenciação entre os clados pode ser realizada pela contagem de polimorfismos de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphism - SNPs) (Wang e Xu, 2024).

2.4. Resistência fúngica

Em *C. auris*, os SNPs são recorrentes em regiões codificadoras e não codificadoras próximas a genes que expressam proteínas relacionadas à resistência fúngica (Wang e Xu, 2024). A variação da quantidade e localização de SNPs em *C. auris* denota diferentes fenótipos, caracterizando os diferentes perfis de suscetibilidade dos clados frente os antifúngicos (Lockhart *et al.*, 2017).

Em trabalhos como os de Chow *et al.* (2020), Spruijtenburg *et al.* (2022) e Khan *et al.* (2024), o clado I (Sul Asiático) apresenta altas taxas de resistência ao fluconazol, anfotericina B e micafungina, além de consideráveis isolados com multirresistência frente 2 ou mais antifúngicos. O clado com maior taxa de sensibilidade ao fluconazol, anfotericina B e micafungina é o clado II (Leste Asiático). O clado III (Sul Africano) apresenta isolados com alta resistência ao fluconazol e alguns com resistência à micafungina, além de apresentar isolados multirresistentes a ambos simultaneamente. O clado Sul-Americano (clado IV) apresenta alta taxa de resistência frente ao fluconazol, anfotericina B e micafungina, além de isolados multirresistentes a 2 dos 3 antifúngicos citados. Isolados representantes do clado V

(Irã) apresentaram resistência ao fluconazol, mas mostrou-se sensível à anfotericina B e equinocandinas (caspofungina, micafungina). Enquanto o clado VI (Singapura) apresentou resistência aos azólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol), mas sensibilidade a equinocandinas.

Os azólicos são uma classe de antifúngicos sintéticos que têm como mecanismo de ação a inibição da biossíntese do ergosterol, presente na membrana plasmática fúngica, sendo capaz de alterar as características químico-físicas da parede fúngica e ocasionar sua ruptura. As equinocandinas são uma classe de antifúngicos que têm a capacidade de inibir a síntese de β -glucanos, importantes enzimas estruturais da parede celular fúngica (Vishnuvardhini *et al.*, 2021). Devido a semelhança entre a membrana celular fúngica e a membrana celular humana, os azólicos apresentam considerável toxicidade, enquanto as equinocandinas apresentam uma menor toxicidade comparado aos azólicos, por possuírem a parede celular fúngica como alvo (Houšť, Spížek e Havlíček, 2020; McCormick e Ghannoum, 2023). Ainda que as equinocandinas apresentem menores taxas de resistência fúngica, seu alto custo limita sua viabilidade em muitos hospitais, resultando na predominância do uso de antifúngicos azólicos para o tratamento de fungemias (Spellberg, 2020).

No entanto, algumas espécies de *Candida* possuem resistência intrínseca ao fluconazol e altas taxas de resistência adquirida às demais classes de antifúngicos. Com isso, a utilização predominante de azólicos, juntamente a utilização imprudente dos antifúngicos de maneira geral, favorecem a adaptação dos fungos aos tratamentos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de mecanismos adicionais de resistência (Garcia-Effron, 2023; McCormick e Ghannoum, 2023). Esses mecanismos impactam significativamente na elevação do custo e tempo do tratamento, refletindo também em altas taxas de mortalidade em pacientes acometidos por infecções fúngicas (Forsberg *et al.*, 2019).

A elevada capacidade de adaptação de *C. auris* é notável, permitindo uma rápida resposta frente às pressões seletivas, como o uso disseminado de antifúngicos. Alguns dos mecanismos de resposta adaptativa são a capacidade de transferência de genes de resistência entre espécies fúngicas, mutações ou a

regulação da expressão desses genes. Esse fenômeno é observado no aumento do surgimento de cepas de *C. auris* e demais espécies com níveis crescentes de resistência, tornando os tratamentos menos eficazes e representando um sério problema de saúde pública.

Trabalhos, como os de Chowdhary *et al.* (2018), Chybowska *et al.* (2020) e Wang e Xu. (2024), indicam famílias inteiras de genes (*ERG*, *FKS*, *CDR*) relacionadas à resistência antifúngica em espécies de *Candida*, as quais contabilizam ao menos 19 genes. A regulação da expressão desses genes está associada a alguns dos principais mecanismos de resistência no gênero *Candida*. Dentre eles, podemos citar a síntese de ergosterol na parede celular fúngica pela família dos genes *ERG*, codificação da subunidade catalítica da glucana pela família de genes *FKS* e expressão da bomba de efluxo pelas famílias *ERG* e *CDR1* (Suwunnakorn *et al.*, 2018; Rybak *et al.*, 2019; Frías-De-León *et al.* 2020).

2.4.1. Gene *CDR1*

A família de genes *CDR* (*Candida Drugs Resistance*) é bem estabelecida no gênero *Candida*, sendo composta por 4 genes (*CDR1*, *CDR2*, *CDR3* e *CDR4*), localizados em diferentes cromossomos a depender da espécie de *Candida* (Akins, 2005; Selmecki, Forche e Berman, 2006). O gene *CDR1* tem sido considerado uma peça crucial para o melhor entendimento dos mecanismos de resistência antifúngica no gênero *Candida*, mas a regulação de sua expressão ainda não foi bem elucidada. Sua regulação é mediada por vias regulatórias complexas, muitas vezes associadas a outros genes, como *TAC1b* e *ERG11* (Li *et al.*, 2021). A investigação detalhada das interações genéticas e moleculares envolvendo o gene *CDR1* abrangem mecanismos multidisciplinares que integram a genômica comparativa, transcriptômica, proteômica e estudos funcionais (Iyler *et al.*, 2020; Maras *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2021).

Trabalhos como os de Rybak *et al.* (2019) e Maras *et al.* (2021), evidenciam um papel significativo de *CDR1* na resistência aos azólicos, elucidando correlações entre a superexpressão do gene com altas taxas de resistência frente os azólicos e

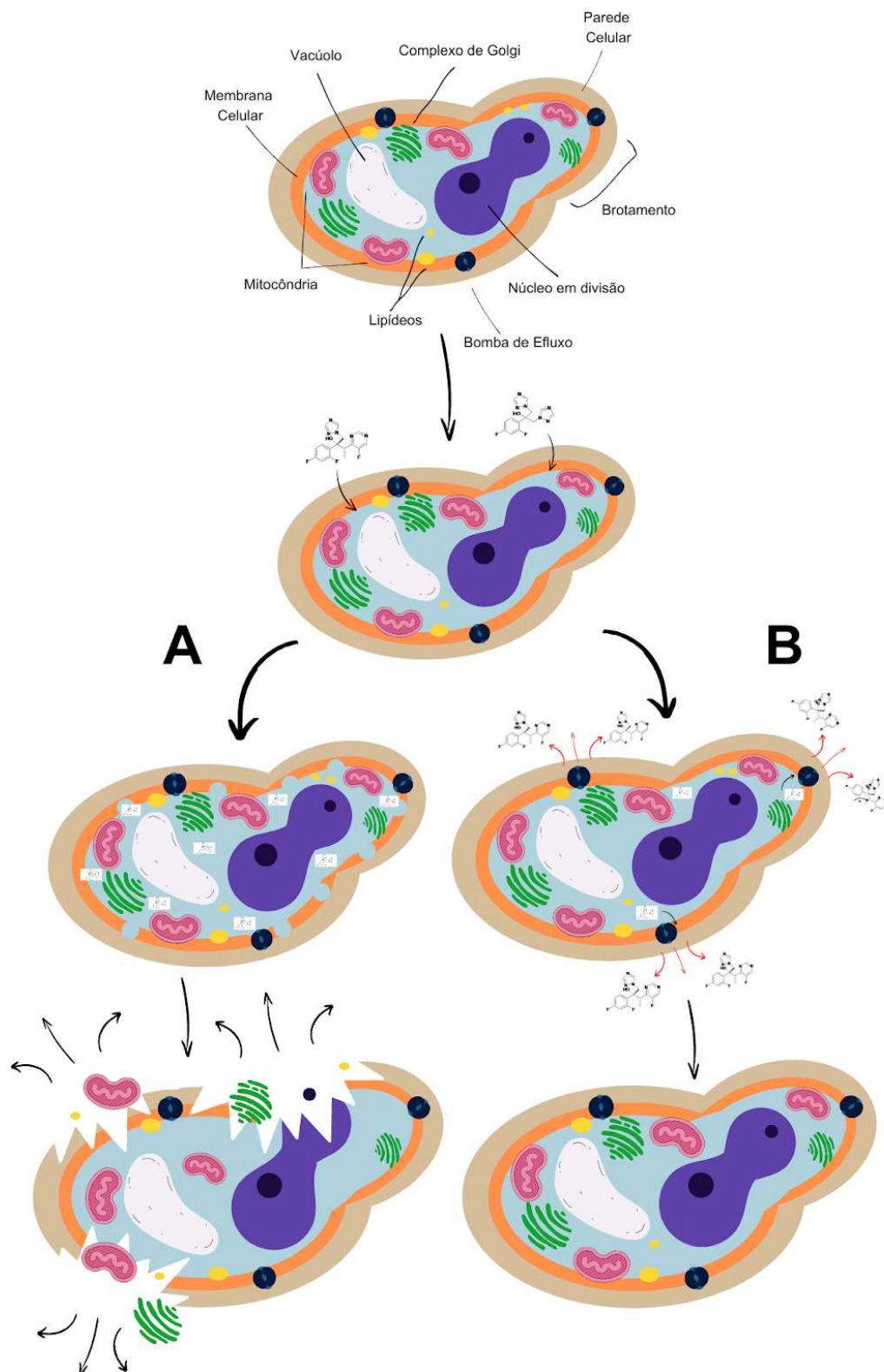
a superexpressão da bomba de efluxo, uma das principais adaptações metabólicas observadas em *C. auris*.

2.4.1.1. Bomba de Efluxo

O gene *CDR1* codifica aminoácidos que expressam proteínas transmembrana do tipo ABC (*ATP-binding cassette*), as quais realizam o transporte ativo (com gasto de ATP) de pequenos compostos hidrofóbicos para o meio extracelular da célula fúngica (Figura 1). Existe uma seletividade de transporte, mas que ainda não foi bem elucidada. Esse mecanismo diminui a concentração intracelular dos antifúngicos, os quais tornam-se ineficientes para o tratamento da infecção, sendo necessária a utilização de maiores dosagens por tempo prolongado e, consequentemente, refletindo na elevação do custo, tempo do tratamento, chances de maiores complicações ao longo da internação e, por fim, nas altas taxas de mortalidade (Akins *et al.*, 2005; Iyer *et al.*, 2020).

Devido às características de suas estruturas químicas, os azólicos possuem um transporte facilitado para o meio extracelular via as proteínas ABC, por apresentarem afinidade aos azólicos (Akins *et al.*, 2005). Essas proteínas funcionam como bombas de expulsão, removendo ativamente o medicamento antifúngico das células fúngicas antes que ele possa causar danos (Figura 1). Outro fator agravante é a ocorrência de mutações em genes que codificam proteínas ABC, os quais podem promover variações fenotípicas nas proteínas e possivelmente alterar sua atividade (Holmes *et al.*, 2006). Porém, resultados consistentes sobre a influência de possíveis mutações no mecanismo de susceptibilidade ainda não são evidentes.

Figura 1. Célula de levedura exposta a azólicos. Em A, a concentração dos compostos azólicos no meio intracelular, ocasionando danos à membrana celular e extravasamento do material citoplasmático, resultando na morte celular. Em B, as bombas de efluxo expulsam os compostos azólicos, diminuindo sua concentração no meio intracelular antes que possam causar danos, preservando a integridade celular.



Fonte: A autora.

2.5. Biologia molecular

Tendo em vista o exponencial surgimento de patógenos humanos, surge a necessidade do desenvolvimento de tecnologias com alta capacidade de processamento e análise de dados. A biologia molecular, aliada a bioinformática, têm permitido significativo avanço nas áreas da saúde nas últimas décadas, possuindo ferramentas multidisciplinares que permitem a identificação, caracterização e elaboração de novas estratégias de manejo (Sharma e Chakrabarti, 2020). As variadas ferramentas moleculares permitem o mapeamento e melhor entendimento da história evolutiva de patógenos como *C. auris*, traçando sua trajetória adaptativa e prevendo possíveis novas adaptações e riscos ainda no início.

Dado o cenário atual, frente às fungemias, o melhor entendimento dos mecanismos de resistência de *C. auris* se torna imprescindível para o mapeamento e desenvolvimento de estratégias para o combate de fungemias. Como citado anteriormente, a caracterização do agente e seu perfil de susceptibilidade (sensibilidade ou resistência ao antifúngico) são cruciais para melhores chances de um tratamento bem-sucedido. Sendo assim, tecnologias que utilizam a biologia molecular têm permitido avanços significativos nessa busca. Dentre essas tecnologias pode se citar a proteômica (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight - MALDI-TOF*) e a genômica (sequenciamento completo do genoma ou sequenciamento parcial de genes e marcadores moleculares), que permitem a identificação e caracterização de novas espécies, cepas e fatores de virulência (De Groot *et al.*, 2022).

2.5.1. Ômicas

O sequenciamento e o *MALDI-TOF* se mostram eficientes para a identificação de *Candida* spp., e por entregarem resultados semelhantes, ambas podem ser consideradas padrão ouro para a identificação de *C. auris*, a depender do contexto e capacidade do laboratório (Anvisa; 2020). Ainda que o *MALDI-TOF* seja capaz de entregar resultados precisos com maior rapidez, comparado à biologia molecular, o sequenciamento é considerado o padrão ouro para a identificação microbiológica, oferecendo maior confiabilidade na identificação da espécie e clado de *Candida* sp.

(Hilt e Ferrieri; 2023). Afinal, as ferramentas genômicas (sequenciamento) entregam resultados robustos sem a necessidade de bancos de dados constantemente atualizados, além de fornecer uma maior carga de informações genéticas quando comparada ao *MALDI-TOF*. Contudo, o investimento (equipamentos, ambiente, mão de obra especializada, insumos) para a utilização da biologia molecular é alto quando comparado a equipamentos automatizados como o Vitek. Por conta disso, hospitais de países em desenvolvimento, como o Brasil, utilizam o Vitek para a identificação da espécie, ainda que seja passível de erros e muitas vezes incapaz de identificar *C. auris*, a depender do modelo utilizado, por utilizarem características fenotípicas (Ninan *et al.*, 2020).

2.5.2. Os marcadores moleculares

Os marcadores moleculares de repetição em tandem do tipo SSRs (microssatélites ou *Simple Sequence Repeat*) e SNPs são sequências de DNA abundantes, com ampla distribuição no genoma, que servem como impressões digitais interespecíficas (Marwal e Gaur, 2020). Anteriormente, essa diferenciação era realizada por marcadores morfológicos, ou seja, pelo fenótipo e não pelo genótipo, podendo assim refletir em análises tendenciosas por estarem susceptíveis à influência do ambiente (Duran *et al.*, 2009). Os marcadores moleculares diferenciam indivíduos de uma mesma população através de pequenas variações genéticas, como mutações, inserções e substituições, herdados geneticamente e atribuindo assim, uma maior confiabilidade quando comparados aos marcadores morfológicos (Marwal e Gaur, 2020).

Existem variadas aplicações de uso para os marcadores, como seleção, caracterização e identificação de organismos, estudos de diversidade e pureza genética e teste de paternidade (Dias Filho, Menezes e Francez, 2020; Serrote *et al.*, 2020; Marwal e Gaur, 2020). Para isso, existem variados tipos de marcadores que podem ser utilizados a depender do alvo de análise, como SSR (microssatélites ou *Simple Sequence Repeat*) e os SNPs (Salgotra e Stewart, 2020).

2.5.2.1. Microsatélites

SSR são sequências curtas de DNA repetidas no mesmo sentido (em tandem), composta geralmente por 15 pares de bases com unidades mono-, di-, tri- ou tetranucleotídeos em repetição. Apresentam altos níveis de polimorfismos e densa distribuição ao longo do genoma, sendo altamente informativos para estudos de diversidade e mapeamento genético, além de permitir delimitar espécies e clados (Wang *et al.*, 2019; Marwal e Gaur, 2020; Luo *et al.*, 2023).

Possuem alto grau de confiabilidade por não serem afetados por fatores ambientais, permitindo estimar a distância genética entre organismos. Por produzirem produtos de *PCR* de tamanhos distintos, permitem delimitar parâmetros de variabilidade genética através de diferentes padrões e tamanhos de bandas para um mesmo microsatélite (Marwal e Gaur, 2020).

2.5.2.2 Polimorfismos de nucleotídeo único

Os polimorfismos de nucleotídeo único são marcadores moleculares que, com o auxílio da técnica de sequenciamento genômico, permitem identificar sequências polimórficas, ou seja, deleções, inserções ou mutações (troca) de apenas um nucleotídeo. Essa técnica é relativamente barata e possui diversas aplicações, sendo uma importante ferramenta para estudos de variabilidade genética e análises de genes. Os *SNPs* são abundantemente encontrados em SSRs, mas de maneira geral, podem ser encontrados ao longo de todo o genoma. Sua localização e frequência podem ser únicas em cada indivíduo, permitindo diferenciá-los dentro de uma mesma população e assim distinguir variantes (Marwal e Gaur, 2020; Salgotra e Stewart, 2020).

A rápida distribuição e expansão clonal de *C. auris* pode ser detectada por variações na localização e frequência de *SNPs*, os quais tornaram possível a caracterização de diferentes clados, suas distâncias e variedades genéticas (Wang; Jianping, 2022). Além disso, permite melhor compreender sua história evolutiva, ancestrais comuns e variações de virulência em *C. auris* (Holmes *et al.*, 2006; Sharma e Chakrabarti, 2020; Ashkenazi-Hoffnung e Rosenberg Danziger, 2023). Sendo assim, tais investigações devem permitir compreender melhor a arquitetura

genética da virulência e a evolução da resistência a fármacos dentro e entre os clados divergentes desse patógeno em ambientes naturais e clínicos(Wang; Jianping, 2022, p. 9).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a similaridade genética de cepas de *Candida auris* e avaliar a existência de mutações no gene *CDR1*.

3.2 Objetivos Específicos

- Confirmar taxonomicamente os isolados de *C. auris*;
- Analisar as respectivas similaridades genéticas;
- Avaliar a relação entre mutações no gene *CDR1*
- Avaliar possíveis alterações fenotípicas na bomba de efluxo de drogas antifúngica em cepas de *C. auris*.

4 METODOLOGIA

4.1. Obtenção dos isolados de leveduras clínicas

Foram obtidos isolados clínicos de *C. auris* armazenados na Coleção de Culturas da Micoteca URM do Departamento de Micologia da UFPE. As cepas foram mantidas, em duplicata em meio SDA (Ágar Sabouraud Dextrose) com 50mg/L de cloranfenicol, armazenados em tubos de ensaio e mantidos à temperatura ambiente.

4.2. Identificação Taxonômica

4.2.1. Extração de DNA

Para a confirmação taxonômica, os isolados fúngicos de *C. auris* foram semeados em meio SDA e incubados a 37°C por 24 hs para a posterior extração do DNA (Muller *et al.*, 1998; Fredricks *et al.*, 2005). Após as 24hs, parte das colônias foram transferidas para tubos microtubos de 2 mL, nos quais foram adicionados 650µL do tampão brometo de cetil trimetilamônio (tampão de extração que contém: CTAB 2%, NaCl 1,5 M, 100mM de Tris-HCl, 20mM de EDTA e polivinilpirrolidona 1%) e homogeneizadas no vórtex por 20 segundos. Posteriormente, foram incubadas a 65°C por 15 minutos em termobloco, homogeneizadas por 20 segundos, e centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos. Para a purificação do DNA (DNA genômico), em novos tubos microtubos foram adicionadas as mesmas proporções dos sobrenadantes e de Clorofórmio álcool-isoamílico (24:1) gelado, os tubos foram homogeneizados por 20 segundos e centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos microtubos, sendo adicionado na mesma proporção o isopropanol gelado e 40 µL de acetato de Sódio (0,3M, pH 8), posteriormente foram homogeneizados manualmente e centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados, adicionados 1000 µL de etanol 70% gelado em cada tubo e centrifugados a 12000 rpm por 2 minutos. Por fim, os sobrenadantes foram descartados e os microtubos invertidos em papel toalha para secagem do pellet de DNA. Para a ressuspensão do DNA, foram adicionados 50 µL de água ultrapura Milli-Q e os tubos armazenados a 4°C (Inácio *et al.*, 2016). A quantificação e integridade do DNA foi avaliada em NanoDrop

(Thermo Scientific) e por gel de eletroforese, respectivamente. Por fim foi realizada a diluição de cada DNA extraído para a padronização da concentração a 20 ng/ml.

4.2.2. *PCR* convencional

Em continuidade a confirmação taxonômica molecular dos isolados fúngicos, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*) utilizando o Termociclador MiniAmp (Thermo Fisher Scientific) , visando à amplificação da região de interesse do DNA. Para isso, a reação teve volume final de 20 μ L, contendo 11,8 μ L de ddH₂O, 4 μ L do tampão da *PCR*, 0,2 μ L de Taq DNA polymerase High Fidelity, 0,6 μ L de DMSO, 0,4 μ L de dNTP (10mM), 1 μ L de DNA molde e 1 μ L de cada primer (5 pmol), sendo eles NL1 e NL4 (Tabela 1) (Kurtzman e Robnett, 1998). As reações de *PCR* consistiram na desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 57 °C por 30s e extensão a 72 °C por 30s e posterior extensão final a 72 °C por 10 min. Ao fim do processo, para a confirmação da amplificação da região de interesse, os produtos da *PCR* (5 μ L do produto da *PCR*, 3 μ L GLB e 4 μ L GelRed) foram separados por eletroforese em gel de agarose (0,8 %) a 3 V/cm de distância entre os eletrodos em tampão corrida 1X TAE (pH 8,0) e utilizando o marcador de peso molecular 1KB-Plus DNA Ladder (5 μ L Ladder, 3 μ L GLB e 4 μ L GelRed) em parafilme, e submetidas a eletroforese (100v por 20 min) . Para a purificação dos produtos da *PCR*, foi utilizado o kit GenJET *PCR* Purification (Fermentas, UK).

Tabela 1. Primers utilizados para o sequenciamento da região *LSU* (NL1 e NL4) e para análise do perfil clonal de isolados de *Candida auris* (marcadores *GTG5* e *T3B*).

Primer	Sequência
NL1	5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3'
NL4	5' – GGTCCGTGTTTCAAGACGG - 3'
GTG5	5'-GTG GTG GTG GTG GTG
T3B	5'-AGG TCG CGG GTT CGA ATC C

4.2.3. Sequenciamento

Para o sequenciamento de Sanger do domínio D1/D2 da região *LSU* (28S) do rDNA, foram utilizados os primers NL1 e NL4 (Tabela 1), o qual foi realizado na Plataforma de sequenciamento-LABEE/CB (UFPE), segundo protocolos preestabelecidos pelo laboratório parceiro.

4.2.4. Análise Bioinformática

As sequências consenso foram obtidas pelo programa Sequencher 4.7 e posteriormente foram submetidas a ferramenta BLAST do GenBank (National Center of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), onde foram alinhadas com as sequências de confiança depositadas no banco de dados para a busca por similaridade, como descrito em Satoh *et al.*, 2009. As novas sequências foram analisadas filogeneticamente com o auxílio do programa MEGA-X 10.2.6. (Tamura *et al.* 2013), software também utilizado para a elaboração da árvore filogenética utilizando o método de Máxima Verossimilhança.

4.3. Similaridade genética

4.3.1. Amplificação

A fim de caracterizar a similaridade genética das cepas de *C. auris*, buscando interpretar como estão relacionadas entre si, foi realizada a amplificação dos marcadores $(GTG)_5$ e *T3B* (Tabela 1) por *PCR*, utilizando o método anteriormente descrito no tópico “*PCR* convencional”. Foram alterados apenas as temperaturas de anelamento, tempo e quantidades de ciclos para cada marcador, sendo 40 ciclos à 55 °C por 45 segundos para $(GTG)_5$ e 32 ciclos a 52 °C por 30 segundos para *T3B* (Thanos *et al.*, 1996).

4.3.2. Análise de similaridade

Foi construído um sistema binário utilizando 1 para presença e 0 para ausência de banda em gel respectiva aos marcadores $(GTG)_5$ e *T3B*. Foram consideradas somente as bandas sem margens de dúvidas, portanto, bandas muito

fracas e de difícil resolução, não foram incluídas. Para análise dos dados, foi utilizado o software Past 4.03, onde foi gerado o cluster para a construção dos dendrogramas como descrito em Gaia *et al.*, 2004 e Kunz *et al.*, 2009.

4.4. Análise de mutações

4.4.1. Desenho dos primers

A sequência do gene *CDR1* foi baixada do banco de dados GenBank (*National Center of Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e em seguida, os primers para os ensaios de mutação do gene de interesse foram desenhados através da plataforma primer-BLAST do National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine-NCBI, utilizando os seguintes parâmetros: Tamanho dos produtos da *PCR*, quantidade de primers de interesse, temperatura de anelamento dos primers e microrganismo alvo. Foram realizadas buscas no banco de dados do BLASTn-NCBI para garantir a especificidade dos primers obtidos com o gene alvo do genoma de *Candida*, garantindo assim que são únicos e específicos para *C. auris*. Para a confirmação da temperatura ótima do par de primers desenhados, foi estabelecido um intervalo de temperaturas utilizando as fórmulas $T_m = 2(A + T) + (G + C)$ e $T_a = T_m - 5^{\circ}\text{C}$, onde T_a é a temperatura de anelamento. Em seguida foi realizada a *PCR* convencional com diferentes ciclos com diferentes temperaturas de anelamento e posterior montagem de gel de eletroforese, sendo selecionada a temperatura com a banda mais evidente.

4.4.2. *PCR* convencional

Foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*), utilizando o Termociclador MiniAmp (Thermo Fisher Scientific), com cada isolado, visando a amplificação do gene *CDR1* para posterior análise. Cada reação tem o volume final de 20 μL , contendo 13,75 μL de ddH₂O, 2,5 μL do tampão da *PCR*, 0,25 μL de Taq DNA Polymerase from *Thermus aquaticus* (Sigma-Aldrich), 0,5 μL de dNTP (10mM), 1 μL de DNA molde e 1 μL de cada primer (5 pmol) anteriormente desenhados. Foram utilizados os parâmetros presentes no protocolo da Taq DNA Polymerase

from *Thermus aquaticus* (Sigma-Aldrich) para a realização das reações de *PCR*, ajudando apenas a temperatura de anelamento ótima do primer. Ao fim do processo, para a confirmação da amplificação da região de interesse, os produtos da *PCR* (5µL do produto da *PCR*, 3µL GLB e 4 µL GelRed) foram separados por eletroforese em gel de agarose (0,8%) a 3 V/cm de distância entre os eletrodos em tampão corrida 1X TAE (pH 8,0) e utilizando o marcador de peso molecular 1KB-Plus DNA Ladder (5µL Ladder, 3µL GLB e 4 µL GelRed) em parafilme, e submetidas a eletroforese (100v por 20 min). O gel foi visualizado em transiluminador de ultravioleta e fotografado utilizando máquina digital. Para quantificação dos produtos da *PCR*, os produtos foram purificados com o uso do kit *GenJET PCR Purification* (Fermentas, UK) e quantificados no NanoDrop (*Thermo Scientific*).

4.4.3. Sequenciamento

O sequenciamento de Sanger do gene *CDR1* foi realizado na Plataforma de sequenciamento-LABEE/CB (UFPE), utilizando os primers desenhados anteriormente e seguindo protocolos preestabelecidos pelo laboratório parceiro.

4.4.4. Análise das sequências alvo

A caracterização e análise das mutações foi realizada com o auxílio da tabela universal do código genético (Nirenberg *et al.*, 1965). Adicionalmente, tradução no códon CUN foi levado em consideração para evitar erros preditivos de estudo. Para localização e análise das sequências de aminoácidos do gene *CDR1*, foram empregados os programas MEGA-X 10.2.6. (Lamb *et al.*, 1997).

4.4.5. Análise dos produtos proteicos

Visando evidenciar as possíveis mutações no gene alvo, quanto ao aspecto tridimensional da proteína, foi utilizada a plataforma Swiss Model disponível em : <https://swissmodel.expasy.org> .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção dos isolados

Foram obtidos dez isolados clínicos de *C. auris* que estavam armazenados na Coleção de Culturas da Micoteca URM do Departamento de Micologia da UFPE. Além disso, foram selecionadas duas cepas controle provenientes da Coleção de Culturas ATCC, sendo um isolado do Japão (B11220) e outro dos Estados Unidos (B11903) (Tabela 2).

Tabela 2. Isolados clínicos de *Candida* proveniente da Coleção de Culturas Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e cepas controle provenientes do Japão (B11220) e Estados Unidos da América (B11903).

Isolado	Espécie
ATCC B11220	<i>Candida auris</i>
ATCC B11903	<i>C. auris</i>
URM8610	<i>C. auris</i>
URM8611	<i>C. auris</i>
URM8612	<i>C. auris</i>
URM8613	<i>C. auris</i>
URM8614	<i>C. auris</i>
URM8615	<i>C. auris</i>
URM8616	<i>C. auris</i>
URM8617	<i>C. auris</i>
URM8618	<i>C. auris</i>
URM8619	<i>C. auris</i>

Fonte: A autora (2024).

5.2. Identificação Taxonômica

Os isolados da Micoteca URM haviam sido previamente identificados taxonomicamente por Vitek2 (fenótipo) e genotipicamente pelo sequenciamento parcial da região *ITS* e os isolados ATCC B11220 e ATCC B11903 via *ITS*. Visando

uma confirmação taxonômica com um maior quantidade de informações genômicas, foi utilizada também a região da subunidade maior do DNA ribossomal (*LSU*), pois como descrito em trabalhos anteriores, o domínio D1/D2 do gene 28S/*LSU* é menos variável do que a região *ITS* em leveduras. Trabalhos como os de Menezes *et al.* (2010) e Fasciana *et al.* (2020) evidenciam que ambas as regiões podem ser utilizadas de maneira complementar para a obtenção de mais informações genômicas e uma identificação mais confiável. Desta maneira, foram obtidos amplicons com cerca de 750 pares de base (pb), por PCR convencional (Imagem 1), sequenciamento dos produtos para a confirmação da amplificação da região alvo (*LSU*) e posteriores análises de bioinformática e elaboração de uma árvore filogenética (Figura 2).

Imagem 1. Gel de eletroforese de reações em cadeia da polimerase convencionais, utilizando os primers NL1 (5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3') e NL4 (5' – GGTCCGTGTTTCAAGACGG - 3'), de isolados de *Candida auris*. Amplicons da região *LSU* com aproximadamente 750pb.

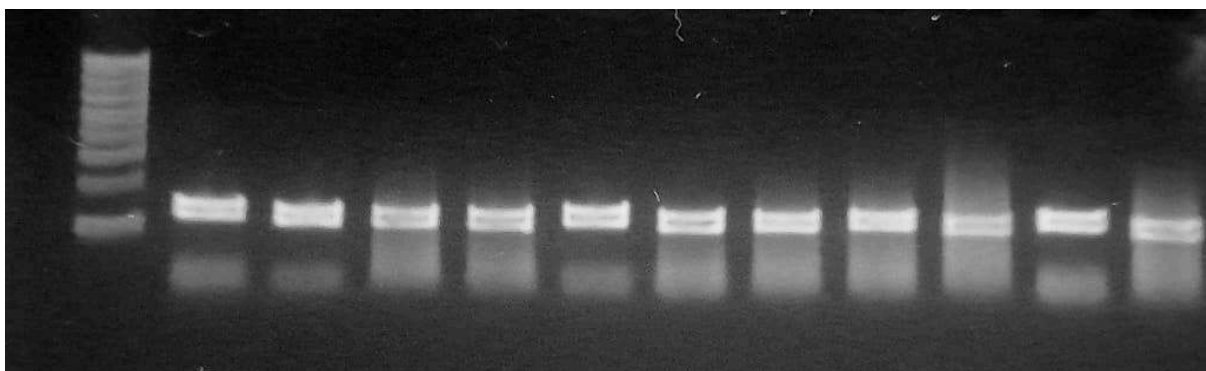
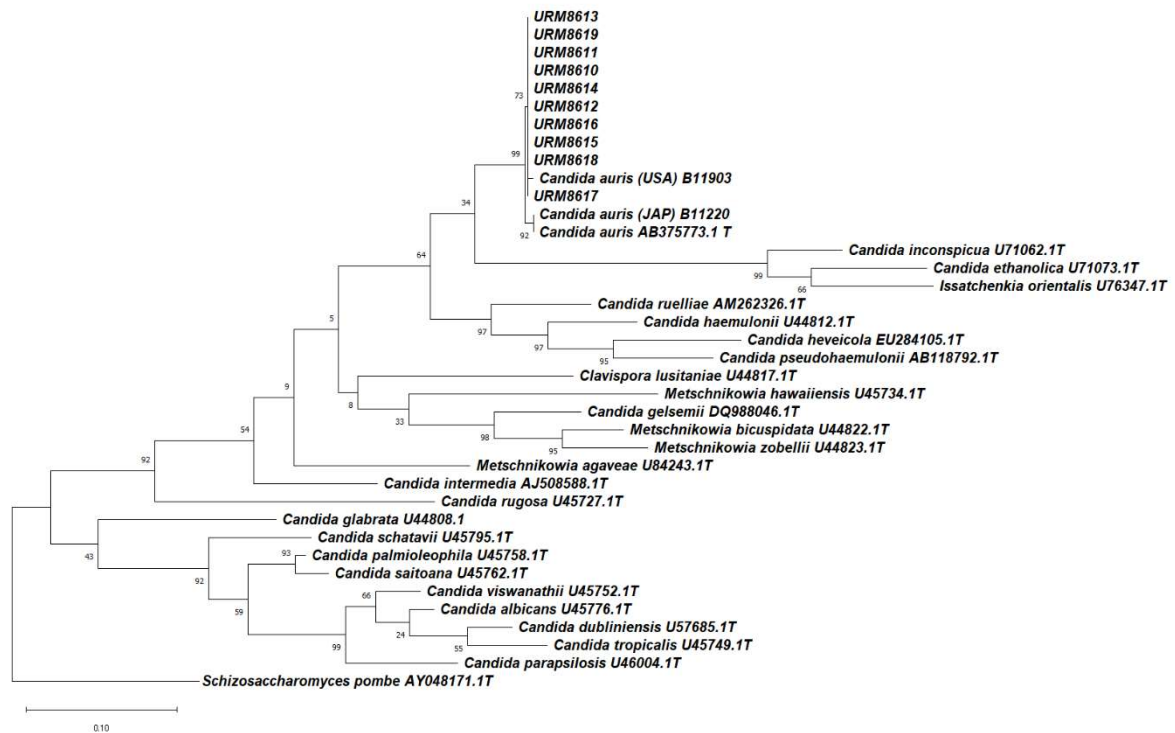


Figura 2. Análise evolutiva pelo método de Máxima Verossimilhança. A história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo Tamura-Nei. A árvore com maior probabilidade de log (-7501,18) é mostrada. A percentagem de árvores nas quais os táxons associados estão agrupados é mostrada junto aos ramos. As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbour-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando o modelo Tamura-Nei e, em seguida, selecionando a topologia com valor de log de verossimilhança superior. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos medidos no número de substituições por local. Esta análise envolveu 38 sequências de

nucleotídeos. Houve um total de 719 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA-X 10.2.6..



Com a montagem da árvore filogenética (Figura 2) foi possível verificar que todos os isolados estão próximos taxonomicamente e de fato filogeneticamente mais próximos de *C. auris*, apresentando 2 subdivisões. Dadas as características genótípicas analisadas, todos os isolados obtidos estão mais próximos filogeneticamente do clado IV, com exceção da ATCCB11220, a qual apresentou maior proximidade com a espécie tipo AB375773.1 T, representante clado II.

Os dados da taxonomia molecular e demais características genômicas concordam entre si, sendo condizentes com o descrito na literatura. Lone e Ahmad (2019) e De Melo *et al.* (2023) mostram que as informações genômicas fornecidas pelas regiões *ITS* e *LSU* em isolados de *C. auris* os diferenciam entre diferentes clados de maneira confiável, permitindo um melhor entendimento de características fenotípicas do isolado, como seu perfil de susceptibilidade. Ainda que as linhagens

pertençam a uma mesma espécie, a identificação dos diferentes clados é significativa, dado às diferentes características genótípicas e fenotípicas (susceptibilidade, virulência) dos diferentes clados de *C. auris*, como descrito em Narayanan *et al.* (2022).

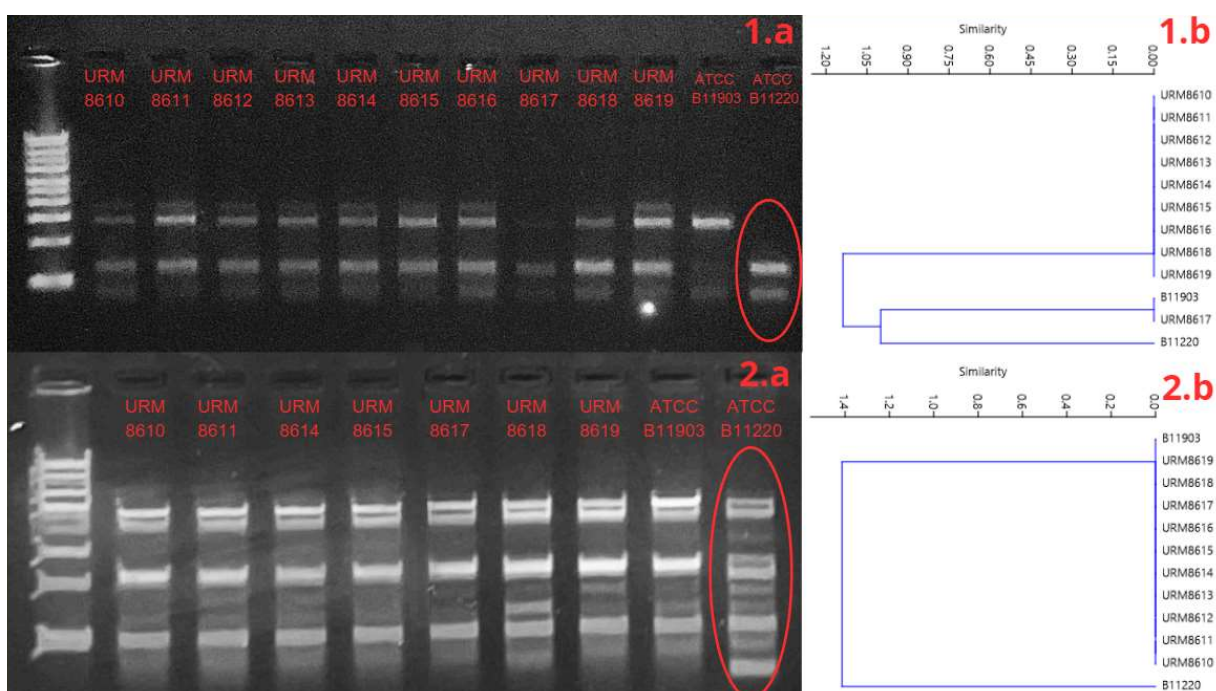
Da Silva Neto *et al.* (2021) e Da Rocha *et al.* (2021) relatam como a caracterização imprecisa do agente pode impactar no prognóstico do paciente, tendo em vista as consideráveis variações no perfil de susceptibilidade aos antifúngicos a depender da cepa e clado de *C. auris*. Dada essa problemática, trabalhos como o de Stefenon *et al.* (2021) evidenciam a importância da incorporação de ambas as regiões moleculares para uma identificação mais robusta de leveduras. As ferramentas moleculares, como o sequenciamento, possuem relevante papel para o melhor entendimento da diversidade gênica e dos mecanismos de virulência de *C. auris*, tornando possível um melhor compreensão dos padrões de comportamento das diferentes cepas de *Candida auris* (Ribeiro *et al.*, 2021).

5.3. Similaridade genética

Foram realizadas *PCRs* convencionais com os marcadores moleculares *GTG5* e *T3B*, com a posterior separação por gel de eletroforese (Figura 3. em 1.a e 2.a), sendo possível evidenciar que os isolados obtidos da Coleção de Culturas da Micoteca URM, assim como a cepa ATCC B11903, apresentaram padrões de banda semelhantes entre si para os respectivos marcadores moleculares. Dessa forma, pode-se sugerir que são linhagens de uma mesma cepa de *C. auris*. Além disso, o isolado ATCC B11220, por sua vez, é o único que apresenta um padrão e intensidade de bandas distintos dos demais isolados para ambos os marcadores, o que está de acordo com os resultados da confirmação taxonômica. Portanto, sugere-se que, embora o ATCC B11220 pertença à espécie *C. auris*, possui características genótípicas distintas dos outros isolados analisados, com fragmentos das sequências marcadores em frequência e tamanho distintos dos demais isolados.

Figura 3. Análise da similaridade genética de isolados de *Candida auris* utilizando os marcadores *GTG5* e *T3B*. 1.a. Gel de eletroforese de reações em cadeia da polimerase. Amplificação da região

GTG5 de isolados de *Candida auris* utilizando o primer *GTG5* (5'-GTG GTG GTG GTG GTG). Evidenciando o isolado ATCC B11220, em vermelho, padrão de bandas diferentes. 1.b. Dendrograma derivado da matriz de similaridade obtida do padrão de bandas do gel de eletroforese com o marcador *GTG5*, após análise com o programa Past versão 4.03 usando o coeficiente Dice e análise UPGMA. 2.a. Gel de eletroforese de reações em cadeia da polimerase. Amplificação da região *T3B* de isolados de *Candida auris* utilizando o primer *T3B* (5'-AGG TCG CGG GTT CGA ATC C). Evidenciando o isolado ATCC B11220, em vermelho, com expressiva diferença na intensidade e no padrão de bandas. 2.b. Dendrograma derivado da matriz de similaridade obtida do padrão de bandas do gel de eletroforese com o marcador *T3B*, após análise com o programa Past versão 4.03 usando o coeficiente Dice e análise UPGMA.



Trabalhos como os de Marwal e Gaur (2020) mostram que os diferentes padrões de bandas com tamanhos e intensidades diferentes dizem respeito ao tamanho da sequência marcadora que foi amplificada e sua incidência ao longo do DNA. Meyer, Maszewska e Sorrell (2001) evidenciam que essas características podem variar entre espécies e populações, podendo resultar em fragmentos de diferentes tamanhos e intensidades distintas a depender da quantidade de fragmentos marcadores que foram amplificados, sendo possível diferenciar espécies e clados. Somado a isso, levando em consideração as regiões onde os isolados

foram coletados e as diferenças genotípicas anteriormente citadas, ATCC B11220 apresenta maior proximidade com o clado II de *C. auris* e todos os outros isolados apresentam maior proximidade com o clado IV (De Melo *et al.*, 2023) com origem no Leste Asiático e na América do Sul respectivamente (Rhodes e Fisher; 2019).

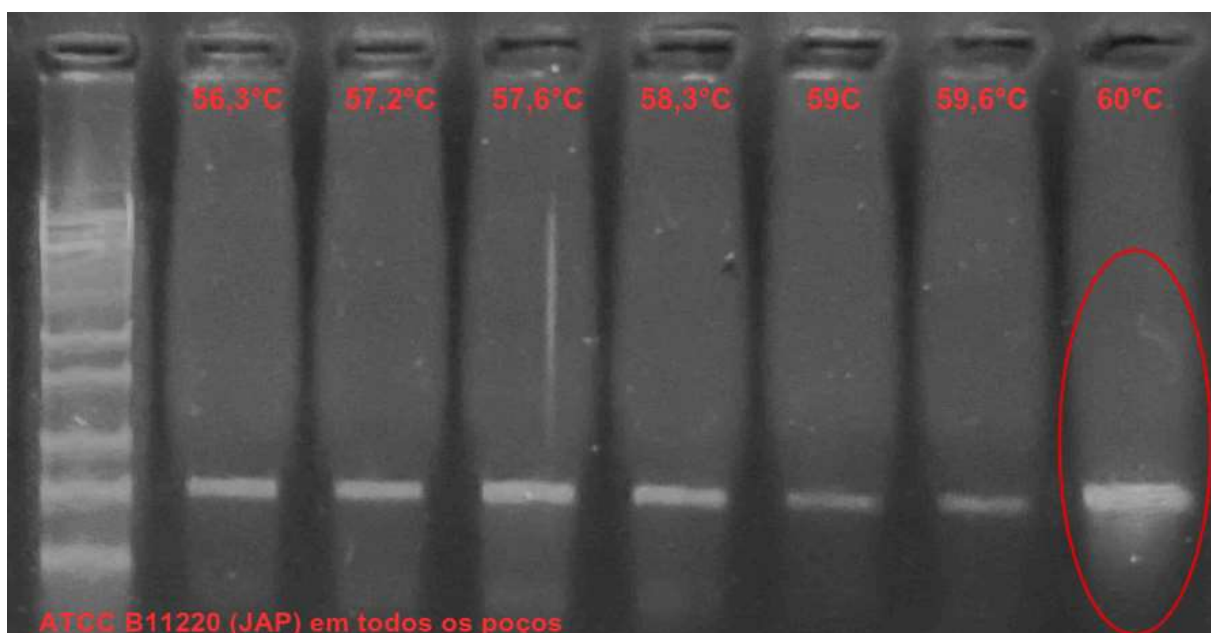
Resultados semelhantes foram obtidos em trabalhos como os de Silva-Filho *et al.* (2001) e Thanos *et al.* (1996) os quais, com a utilização dos marcadores moleculares *T3B* e *GTG5*, foram capazes de diferenciar de forma eficiente diferentes espécies de *Candida*. Tal metodologia se mostrou aplicável para isolados de *C. auris*, sendo possível diferenciá-los a partir dos padrões de bandas e suas respectivas intensidades no gel de eletroforese. Em relação aos resultados dos dendrogramas (Figura 3. em 1.b e 2.b), foram condizentes aos resultados mostrados na árvore filogenética (Figura 2) no tópico 5.2 (Identificação Taxonômica), sendo possível observar que todos os isolados apresentam proximidade genética, sendo o isolado ATCC B11220, representante do Japão, o mais distante. Tal fato se dá por todos os isolados pertencerem ao mesmo clado e o isolado pertencer a um clado distinto que surgiu independentemente, ainda que quase simultaneamente aos demais clados, conferindo assim significativa distância genética para os separar intraespecificamente (Lockhart *et al.*, 2017). Isso evidencia que os marcadores moleculares são vantajosos para a diferenciação intraespecífica de diferentes cepas em conjunto às análises filogenéticas, assim como observado em trabalhos anteriores. Podendo se destacar o marcador *T3B*, o qual permitiu uma melhor diferenciação dos isolados.

5.4. Análise de mutações

Com o desenho dos pares de primers e posterior montagem do gel de eletroforese, foi possível observar considerável amplitude de temperaturas de anelamento (56,3 a 60°C) para o funcionamento dos primers (Imagem 2). A maior temperatura de anelamento testada foi selecionada ($T_a = 60^\circ\text{C}$), visando uma maior especificidade de anelamento com o gene de interesse e redução de ruídos (Ashrafi *et al.*, 2009). Como descrito em Lorenz (2012) e Porta e Enners (2012) a determinação da temperatura ótima de anelamento dos primers diz respeito a

melhor combinação de especificidade e eficiência, o que impacta significativamente nos resultados da *PCR*. Esses fatores são imprescindíveis para garantir a especificidade à sequência alvo, a quantidade de amplicons gerados e evitar a formação de estruturas secundárias como dímeros, que competiriam com a ligação ao DNA alvo e, conseqüentemente, impactariam negativamente na reação. Sendo assim, a determinação correta da temperatura de anelamento dos primers é crucial para o sucesso da *PCR*.

Imagem 2. Gel de eletroforese de reações em cadeia da polimerase (*PCR*) com diferentes temperaturas de anelamento (T_a) para a determinação da temperatura ótima do primer específico para o gene *CDR1* de *Candida auris*. Evidenciando o produto de *PCR* com $T_a = 60^\circ\text{C}$.



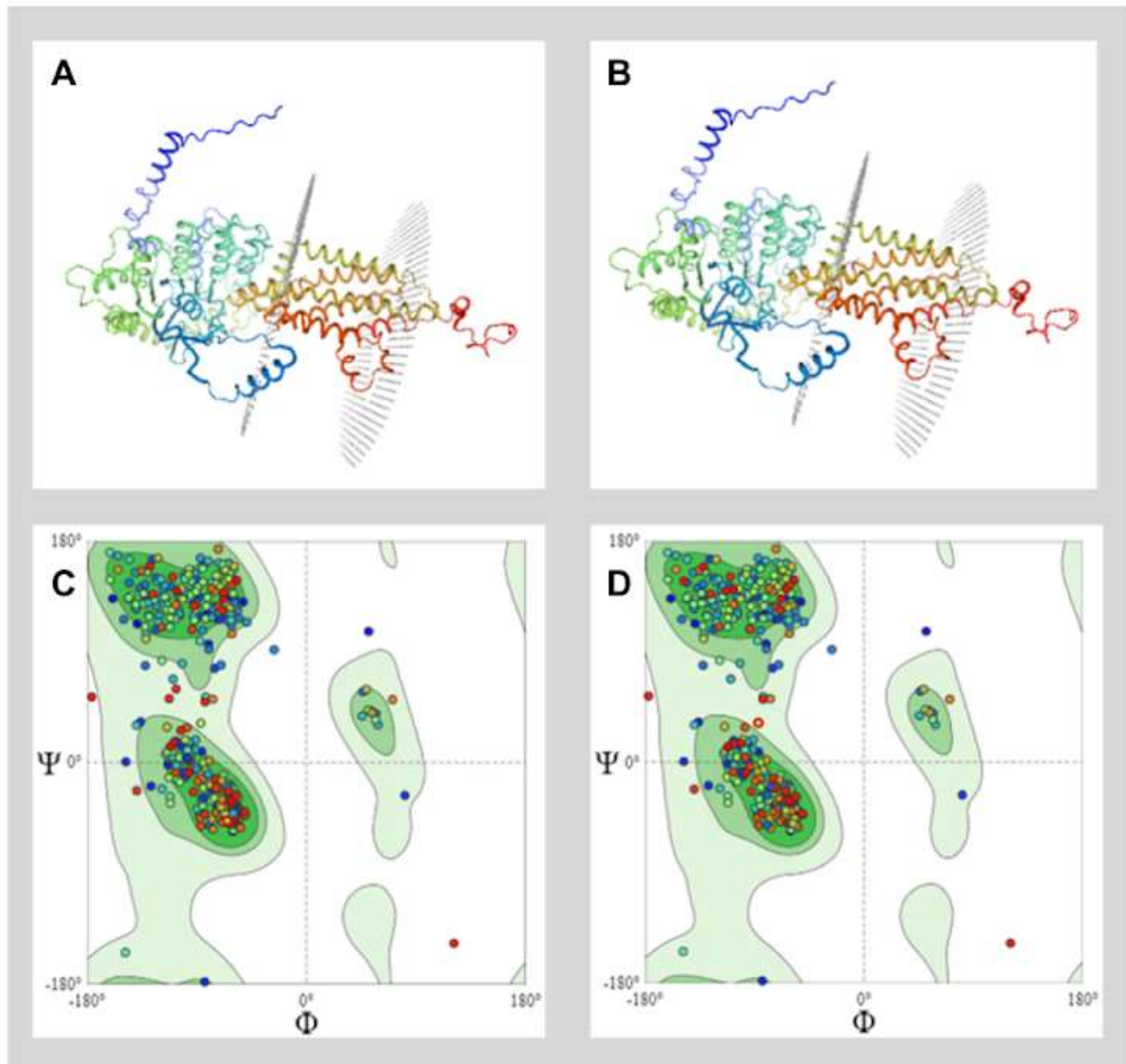
Posteriormente, com o auxílio do MEGA-X 10.2.6., foi possível observar que a ATCC B11220 foi o único isolado que não apresentou mutações, e os demais isolados apresentaram mutações silenciosas localizadas nas posições 17, 20, 44, 95 e 194, com substituições de uma Timina por uma Citosina, Citosina por uma Adenina, Adenina por uma Guanina, Citosina por uma Timina e Citosina por uma Timina, respectivamente. O isolado URM8617 foi o único que apresentou, além das

mutações silenciosas citadas, uma mutação missense localizada na posição 711, com a substituição de uma Citosina por uma Timina, resultando na tradução de uma Glicina e não de uma Arginina (Nirenberg *et al.*, 1995; Verli, 2014).

5.4.1 Análise dos produtos proteicos

Assim como evidenciado em Kikutake e Suyama (2023), as mutações silenciosas são muito frequentes ao longo do genoma e, por alterarem a sequência de nucleotídeos e não a sequência de aminoácidos, não são facilmente percebidas. Por outro lado, as alterações nos códons que resultem de mutações nonsense ou missense modificam a sequência de aminoácidos, podendo resultar em alterações fenotípicas que podem ou não interferir na função proteica. Com o auxílio da plataforma Swiss Model (disponível em: <https://swissmodel.expasy.org>), foi possível observar que as mutações silenciosas de fato não resultam em alterações fenotípicas nas proteínas. Em relação à mutação missense, também não foi observada qualquer alteração fenotípica na proteína (Figura 4).

Figura 4. Modelagem estrutural da proteína ABC codificada pelo gene *CDR1* em *Candida auris*. A e B mostram a estrutura da proteína. C e D mostram os gráficos de Ramachandran das respectivas proteínas. Sendo A e C da ATCC B11220, e B e D do isolado URM8617.



O gráfico de Ramachandran é uma ferramenta da bioquímica que permite visualizar as possíveis conformações de ângulos diédricos (phi e psi) de uma cadeia polipeptídica e assim determinar a possível estrutura secundária e final de uma proteína (Ramachandran e Sasisekharan; 1968 e Sobolev *et al.* (2020). Para isso, é necessário observar os quadrantes do gráfico e analisar se as ligações entre os aminoácidos estão em áreas permitidas, como descrito em Ramachandran e Sasisekharan (1968), Hovmöller, Zhou e Ohlson (2002) e Sobolev *et al.* (2020). Nos

gráficos obtidos (Figura 4), é possível observar que as ligações entre os aminoácidos da proteína gerada estão dentro das áreas permitidas, indicando que a prevalência da conformação estrutural de ambas está dentro dos limites de normalidade e em ângulos de menor gasto energético. Logo, dentro dos parâmetros esperados para a confirmação da confiabilidade do modelo.

6 CONCLUSÃO

Dessa maneira, os resultados obtidos mostram que o presente trabalho foi eficaz na análise da similaridade genética entre cepas de *Candida auris*, indicando que todos os isolados obtidos da coleção da Micoteca URM são clones com maior afinidade filogenética ao clado IV de *C. auris*. Em contraste, o isolado japonês apresentou maior proximidade ao clado II. A análise dos marcadores moleculares *T3B* e *GTG5* corroborou os resultados do sequenciamento da região *LSU*, confirmando a separação dos clados.

Além disso, foram identificadas mutações de polinucleotídeo único no gene *CDR1*, predominantemente silenciosas, e apenas uma mutação missense foi observada em um isolado do nordeste brasileiro, a qual não resultou em alterações fenotípicas, ou seja, a mutação não mostrou impacto na estrutura da proteína ABC sintetizada pelo gene *CDR1*.

Portanto, a compreensão detalhada da estrutura genética e dos mecanismos de virulência de *C. auris* é essencial para aprimorar os estudos epidemiológicos e desenvolver protocolos globais de prevenção de infecções fúngicas. Recomenda-se a continuidade de trabalhos como este para melhorias no prognóstico e no manejo de pacientes com infecções fúngicas.

REFERÊNCIAS

- ADEME, Muluneh; GIRMA, Friehiwot. *Candida auris*: From multidrug resistance to pan-resistant strains. **Infection and drug resistance**, p. 1287-1294, 2020.
- AKINS, Robert A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. **Medical mycology**, v. 43, n. 4, p. 285-318, 2005.
- ARORA, Parth et al. Environmental isolation of *Candida auris* from the coastal wetlands of Andaman Islands, India. **MBio**, v. 12, n. 2, p. 10.1128/mbio. 03181-20, 2021.
- ASAI, Nobuhiro *et al.* Combination of Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score and Charlson Comorbidity Index (CCI) could predict the severity and prognosis of candidemia more accurately than the Acute Physiology, Age, Chronic Health Evaluation II (APACHE II) score. **BMC infectious diseases**, v. 21, p. 1-11, 2021.
- ASHKENAZI-HOFFNUNG, Liat; ROSENBERG DANZIGER, Chen. Navigating the new reality: a review of the epidemiological, clinical, and microbiological characteristics of *Candida auris*, with a focus on children. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 176, 2023.
- ASHRAFI, Elena Hidalgo; PAUL, Natasha. Improved *PCR* specificity with hot start *PCR* primers. **Biotechniques**, v. 47, n. 3, p. 789-790, 2009.
- BHATTACHARYA, Somanon; SAE-TIA, Sutthichai; FRIES, Bettina C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 312, 2020.
- CARMONA-CRUZ, Silvia; OROZCO-COVARRUBIAS, Luz; SÁEZ-DE-OCARIZ, Marimar. The human skin microbiome in selected cutaneous diseases. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 834135, 2022.
- CASADEVALL, Arturo; KONTOYIANNIS, Dimitrios P.; ROBERT, Vincent. Environmental *Candida auris* and the global warming emergence hypothesis. **MBio**, v. 12, n. 2, p. 10.1128/mbio. 00360-21, 2021.
- CHEN, Jingjing *et al.* Is the superbug fungus really so scary? A systematic review and meta-analysis of global epidemiology and mortality of *Candida auris*. **BMC infectious diseases**, v. 20, p. 1-10, 2020.
- CHOWDHARY, Anuradha *et al.* A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the *ERG11* and *FKS1* genes in azole and echinocandin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 4, p. 891-899, 2018.

CHOW, Nancy A. *et al.* Tracing the evolutionary history and global expansion of *Candida auris* using population genomic analyses. **MBio**, v. 11, n. 2, p. 10.1128/mbio.03364-19, 2020.

CHYBOWSKA, Aleksandra D.; CHILDERS, Delma S.; FARRER, Rhys A. Nine things genomics can tell us about *Candida auris*. **Frontiers in genetics**, v. 11, p. 526662, 2020.

CORREA, Francini Guerra *et al.* Letalidade das infecções relacionadas a assistência à saúde (irras) associadas a germes com resistência antimicrobiana (RA) em hospital geral terciário de São Paulo-sp (HMP) no período de 2020 a 2022. **The brazilian journal of infectious diseases**, v. 27, p. 103394, 2023.

CRUZ, Gabriela Silva *et al.* Candidíase vulvovaginal na Atenção Primária à Saúde: diagnóstico e tratamento. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 94, n. 32, 2020.

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.

DA SILVA, Renata Baltar *et al.* Candidemia in a public hospital in Northeastern Brazil: Epidemiological features and risk factors in critically ill patients. **Revista iberoamericana de micología**, v. 36, n. 4, p. 181-185, 2019.

DA SILVA NETO, Irineu Ferreira; RICARDINO, Isadora Ellen Feitoza; DUARTE, Maria Beatriz Silva. Características Epidemiológicas da Levedura Emergente *Candida auris*. **UNICIÊNCIAS**, v. 25, n. 2, p. 120-124, 2021.

DE AGUIAR PORTELA, Davi *et al.* A importância da higienização das mãos nas unidades de terapia intensiva: os perigos das infecções relacionadas à assistência à saúde. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 9, p. e3854-e3854, 2020.

DE GROOT, Theun *et al.* Optimization and validation of *Candida auris* short tandem repeat analysis. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, p. e02645-22, 2022.

DE MELO, Camylla Carvalho *et al.* Colonized patients by *Candida auris*: Third and largest outbreak in Brazil and impact of biofilm formation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1033707, 2023

DESOUBEUX, Guillaume *et al.* Overview about *Candida auris*: what's up 12 years after its first description?. **Journal of Medical Mycology**, v. 32, n. 2, p. 101248, 2022.

DIAS FILHO, Claudemir Rodrigues; MENEZES, Meiga Aurea Mendes; FRANCEZ, Pablo Abdon da Costa. História da Genética Forense. **DIAS FILHO, CR; RODRIGUES, EL (Org.)**, p. 1-12, 2020.

DU, Han *et al.* *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 10, p. e1008921, 2020.

DURAN, Chris *et al.* Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualisation. **Current bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 16-27, 2009.

FARIAS, Carolina Huller; GAMA, Fabiana Oenning da. Infecções relacionadas à assistência à saúde em pacientes internados em unidade de terapia intensiva cardiológica. **Rev. epidemiol. controle infecç**, p. 104-10, 2020.

FASCIANA, Teresa *et al.* *Candida auris*: an overview of how to screen, detect, test and control this emerging pathogen. **Antibiotics**, v. 9, n. 11, p. 778, 2020.

FORSBERG, Kaitlin *et al.* *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. **Medical mycology**, v. 57, n. 1, p. 1-12, 2019.

Fredricks, D.N.; Smith, C.; Meier, A. Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative *PCR*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 43, n. 10, p. 5122–28, 2005.

GAIA, José Maria D. *et al.* Similaridade genética de populações naturais de pimenta-de-macaco por análise RAPD. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 686-689, 2004.

GARCIA-EFFRON, B. G. The rising threat of intrinsically resistant *Candida* species in Argentina. **Rev. Argent Microbiol.**, v. 55, n. 3, p. 201-203, 2023.

GOMES, André Augusto Guerra *et al.* Infecções relacionadas à assistência em saúde em unidades de terapia intensiva no Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 11, p. e4665-e4665, 2020.

GÓMEZ-GAVIRIA, Manuela *et al.* *Candida haemulonii* complex and *Candida auris*: biology, virulence factors, immune response, and multidrug resistance. **Infection and drug resistance**, p. 1455-1470, 2023.

Inácio, C.P., Rocha, A.P.S., Barbosa, R.D.N., Oliveira, N.T., Silva, J.C., de Lima Neto, R.G. 2016. Experimental white piedra: a robust approach to ultrastructural analysis, scanning electron microscopy and etiological discoveries. **Experimental Dermatology**, 25(1): 79-81.

HILT, Evann E.; FERRIERI, Patricia. Next generation and other sequencing technologies in diagnostic microbiology and infectious diseases. **Genes**, v. 13, n. 9, p. 1566, 2022.

HOLMES, Ann R. *et al.* Heterozygosity and functional allelic variation in the *Candida albicans* efflux pump genes *CDR1* and *CDR2*. **Molecular microbiology**, v. 62, n. 1, p. 170-186, 2006.

HOVMÖLLER, Sven; ZHOU, Tuping; OHLSON, Tomas. Conformations of amino acids in proteins. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 58, n. 5, p. 768-776, 2002.

Index Fungorum. Disponível em: <https://www.indexfungorum.org/names/names.asp>. Acesso em: 20 de março de 2024.

IYER, Kali R. *et al.* An oxindole efflux inhibitor potentiates azoles and impairs virulence in the fungal pathogen *Candida auris*. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 6429, 2020.

JACKSON, Brendan R. *et al.* On the origins of a species: what might explain the rise of *Candida auris*. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 58, 2019.

JEFFERY-SMITH, Anna *et al.* *Candida auris*: a review of the literature. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 1, p. 10.1128/cmr. 00029-17, 2018.

JIRÍ HOUŠT, Jaroslav Spížek; HAVLÍČEK, Vladimír. Antifungal Drugs. 2020.

KADOSH, David; MUNDODI, Vasanthakrishna. A re-evaluation of the relationship between morphology and pathogenicity in *Candida* species. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 13, 2020.

KHAN, Tahsin *et al.* Emergence of the Novel Sixth *Candida auris* Clade VI in Bangladesh. **medRxiv**, p. 2024.04. 12.24305665, 2024.

KIKUTAKE, Chie; SUYAMA, Mikita. Possible involvement of silent mutations in cancer pathogenesis and evolution. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 7593, 2023.

KUNZ, Sustanis Horn *et al.* Análise da similaridade florística entre florestas do Alto Rio Xingu, da Bacia Amazônica e do Planalto Central. **Brazilian Journal of Botany**, v. 32, p. 725-736, 2009.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Three new insect-associated species of the yeast genus *Candida*. **Canadian journal of microbiology**, v. 44, n. 10, p. 965-973, 1998.

LI, Jizhou *et al.* Novel *ERG11* and *TAC1b* mutations associated with azole resistance in *Candida auris*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 5, p. 10.1128/aac. 02663-20, 2021.

LOCKHART, Shawn R. *et al.* Editor's choice: Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 64, n. 2, p. 134, 2017.

LONE, Shabir A.; AHMAD, Aijaz. *Candida auris*—the growing menace to global health. **Mycoses**, v. 62, n. 8, p. 620-637, 2019.

LORENZ, Todd C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 63, p. e3998, 2012.

LUO, Zhengyu *et al.* The first established microsatellite markers to distinguish *Candida orthopsilosis* isolates and detection of a nosocomial outbreak in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 61, n. 11, p. e00806-23, 2023.

MARAS, Bruno *et al.* Hyperexpression of CDRs and HWP1 genes negatively impacts on *Candida albicans* virulence. **PloS one**, v. 16, n. 6, p. e0252555, 2021.

MARWAL, Avinash; GAUR, Rajarshi Kumar. Molecular markers: tool for genetic analysis. In: **Animal biotechnology**. Academic Press, 2020. p. 353-372.

MCCORMICK, Thomas S.; GHANNOUM, Mahmoud. Time to Think Antifungal Resistance Increased Antifungal Resistance Exacerbates the Burden of Fungal Infections Including Resistant Dermatomycoses. **Pathogens and Immunity**, v. 8, n. 2, p. 158, 2023.

MENEZES, Josiane Pacheco *et al.* Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 132-139, 2010.

MEYER, W.; MASZEWSKA, K.; SORRELL, T. C. PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 39, n. 2, p. 185-193, 2001.

MIRANDA, Valdirene Barroso; CAMPOS, Ana Cristina Viana; VIEIRA, Antônia Benedita Rodrigues. Infecções relacionadas à assistência à saúde nos hospitais de Belém, Pará, Brasil. **Revista Saúde & Ciência**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2020.

MOURA, Gabriela R.; PAREDES, João A.; SANTOS, Manuel AS. Development of the genetic code: insights from a fungal codon reassignment. **FEBS letters**, v. 584, n. 2, p. 334-341, 2010.

MUÑOZ, José F. *et al.* Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 5346, 2018.

NARAYANAN, Aswathy *et al.* ClaID: a rapid method of clade-level identification of the multidrug resistant human fungal pathogen *Candida auris*. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e00634-22, 2022.

NGUEMELEU, E. Tchouaket *et al.* Economic analysis of healthcare-associated infection prevention and control interventions in medical and surgical units: systematic review using a discounting approach. **Journal of Hospital Infection**, v. 106, n. 1, p. 134-154, 2020.

NIRENBERG, M. *et al.* RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 53, n. 5, p. 1161-1168, 1965.

NINAN, Marilyn M. *et al.* *Candida auris*: Clinical profile, diagnostic challenge and susceptibility pattern: Experience from a tertiary-care centre in South India. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, p. 181-185, 2020.

NIU, Chenguang *et al.* Mapping the human oral and gut fungal microbiota in patients with metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1157368, 2023.

NNADI, Nnaemeka Emmanuel; CARTER, Dee A. Climate change and the emergence of fungal pathogens. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 4, p. e1009503, 2021.

Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 11/2020 Orientações para identificação, prevenção e controle de infecções por *Candida auris* em serviços de saúde. 2020

OSTROWSKY, Belinda. *Candida auris* isolates resistant to three classes of antifungal medications—New York, 2019. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 69, 2020.

PAPPAS, Peter G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.

PORTA, Angela R.; ENNERS, Edward. Determining annealing temperatures for polymerase chain reaction. **The american biology Teacher**, v. 74, n. 4, p. 256-260, 2012.

RHODES, Johanna; FISHER, Matthew C. Global epidemiology of emerging *Candida auris*. **Current opinion in microbiology**, v. 52, p. 84-89, 2019.

RIBEIRO, Gabriela Fior *et al.* What ‘Omics can tell us about antifungal adaptation. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 8, p. foab070, 2021.

ROCHA, Ana Paula Santiago *et al.* Perfil epidemiológico das leveduras sistêmicas em Unidades de Terapia Intensiva de hospitais públicos da cidade do Recife–PE, Brasil. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 6, p. 19098-19111, 2020.

ROSS, Zoe K.; LORENZ, Alexander. Is *Candida auris* sexual. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 12, p. e1009094, 2020.

RYBAK, Jeffrey M. *et al.* Abrogation of triazole resistance upon deletion of CDR1 in a clinical isolate of *Candida auris*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 10.1128/aac. 00057-19, 2019.

SATOH, Kazuo *et al.* *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and immunology**, v. 53, n. 1, p. 41-44, 2009.

SALGOTRA, Romesh K.; STEWART JR, C. Neal. Functional markers for precision plant breeding. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 13, p. 4792, 2020.

SALVI, Elenir Salete Frozza *et al.* PREVENÇÃO DE INFECÇÕES: PREVENÇÃO DE INFECÇÕES. **Anuário Pesquisa e Extensão Unoesc Xanxerê**, v. 5, p. e27154-e27154, 2020.

SELMECKI, Anna; FORCHE, Anja; BERMAN, Judith. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 367-370, 2006.

SEIDEL, Danila *et al.* Impact of climate change and natural disasters on fungal infections. **The Lancet Microbe**, 2024.

SERROTE, Caetano Miguel Lemos *et al.* Determining the polymorphism information content of a molecular marker. **Gene**, v. 726, p. 144175, 2020.

SHARMA, Megha; CHAKRABARTI, Arunaloke. On the origin of *Candida auris*: ancestor, environmental stresses, and antiseptics. **MBio**, v. 11, n. 6, p. 10.1128/mbio. 02102-20, 2020.

SILVA-FILHO, Eurípedes Alves da *et al.* Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by *PCR*-fingerprinting. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 13-23, 2005.

SIVIERI, Katia *et al.* Microbiota da pele: novos desafios. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 50, n. 1, p. 93-112, 2021.

SOBOLEV, Oleg V. et al. A global Ramachandran score identifies protein structures with unlikely stereochemistry. **Structure**, v. 28, n. 11, p. 1249-1258. e2, 2020.

SPELLBERG, Brad. Are echinocandins superior in efficacy to azoles. **Clinical Infectious Diseases**, v. 70, n. 9, p. 2020-2021, 2020.

SPRUIJTENBURG, Bram *et al.* Confirmation of fifth *Candida auris* clade by whole genome sequencing. **Emerging microbes & infections**, v. 11, n. 1, p. 2405-2411, 2022.

STEWART, Sally *et al.* Impact of healthcare-associated infection on length of stay. **Journal of Hospital Infection**, v. 114, p. 23-31, 2021.

SUPHAVILAI, Chayaporn *et al.* Discovery of the sixth *Candida auris* clade in Singapore. **medRxiv**, p. 2023.08. 01.23293435, 2023.

SUWUNNAKORN, Sumanun *et al.* *FKS2* and *FKS3* genes of opportunistic human pathogen *Candida albicans* influence echinocandin susceptibility. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 4, p. 10.1128/aac. 02299-17, 2018.

TAMURA, Koichiro *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

THANOS, M. *et al.* Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 3, p. 615-621, 1996.

VERLI, H. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas. *In*: DAVID L. N. e MICHAEL M. C. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014. p.77.

VISHNUVARDHINI, R. *et al.* A review on antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. **International Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences Archive**, v. 2, n. 1, p. 042-054, 2021.

WANG, Meizhu *et al.* Virulence and antifungal susceptibility of microsatellite genotypes of *Candida albicans* from superficial and deep locations. **Yeast**, v. 36, n. 5, p. 363-373, 2019.

WANG, Yue; XU, Jianping. Associations between Genomic Variants and Antifungal Susceptibilities in the Archived Global *Candida auris* Population. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 1, p. 86, 2024.

WANG, Yue; XU, Jianping. Population genomic analyses reveal evidence for limited recombination in the superbug *Candida auris* in nature. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 20, p. 3030-3040, 2022.

WHO. Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>. Acesso em: 21 maio de 2024.

WU, Luciana *et al.* Leveduras do gênero *Candida* isoladas de hemocultura de pacientes hospitalizados. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 103395, 2023.