



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Shaiana Paula Mattiello

Caracterização de biofilmes polimicrobianos de *Candida parapsilosis* com *Staphylococcus aureus* ou *Acinetobacter* sp. e avaliação de sua sensibilidade a sanitizantes e a antimicrobianos

Porto Alegre

2015

Shaiana Paula Mattiello

Caracterização de biofilmes polimicrobianos de *Candida parapsilosis* com *Staphylococcus aureus* ou *Acinetobacter* sp. e avaliação de sua sensibilidade a sanitizantes e a antimicrobianos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Medina da Silva

Porto Alegre

2015

SHAIANA PAULA MATTIELLO

Caracterização de biofilmes polimicrobianos de *Candida parapsilosis* com *Staphylococcus aureus* ou *Acinetobacter* sp. e avaliação de sua sensibilidade a sanitizantes e a antimicrobianos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

-Maria José Soares Mendes Giannini

-Amanda de Souza da Motta

-Fernanda Bueno Morrone

Porto Alegre

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço às Professoras Dra. Renata Medina da Silva e Dra. Sílvia Dias de Oliveira pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, por todo o incentivo, apoio e ajuda ofertados, pelos preciosos ensinamentos e por terem contribuído para meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço também pelas incríveis colaborações e suporte que foram de grande valia para a execução e elaboração deste trabalho.

Aos Professores Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira e Dra. Marjo Cadó Bessa pelo incentivo em todos os momentos, pela ajuda na discussão de ideias e por todo apoio e auxílio prestados na realização desta pesquisa.

Agradeço de forma muito importante aos meus pais Valdir Antônio Mattiello e Marli Hermes Fontana Mattiello, que nunca deixaram de me apoiar nas decisões tomadas, sempre incentivando a correr atrás do que realmente importa, agradeço por toda a força, conforto e coragem que recebo de vocês diariamente. À minha irmã Samara Paula Mattiello Drescher, pela amizade, ensinamentos, apoio e paciência de todas as horas, por ter me auxiliado na realização de mais esta fase.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Belisa Avila Rodrigues, Bruna Ferreira Leal, Bruna Kern Donamore, Bruno Dall’Agnol e Stephanie Wagner Gallo, que sempre se mostraram prestativos para auxiliar em dúvidas, mas que também foram amigos e companheiros incríveis em todos os momentos compartilhados. Aos alunos de iniciação científica deste laboratório, principalmente Aimeé Lersh e Elenise Amaral da Silva, por todo o suporte e auxílio prestado na realização da pesquisa, e por

terem se empenhado para que o trabalho fosse realizado e concluído. Às técnicas do laboratório de ensino de Microbiologia, Maria Cláudia Garcia e Joanna Reis pela ajuda em todos os momentos.

Agradeço a todas as pessoas que fazem parte da minha vida, e que com uma simples palavra de carinho e conforto fazem meu dia melhor. Em especial aos meus amigos de longa data Priscila Francisca Bianchi, Deizi Groth, Géssica Caroline da Silva e Ivair Malagi que mesmo longe, sempre foram confidentes e apoiaram a realização de mais esta etapa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento desta pesquisa.

A Deus, pelo dom da vida e, por permitir que nos sintamos fortes e protegidos para enfrentarmos todos os desafios que a vida nos apresenta, com sabedoria, calma e serenidade.

RESUMO

As espécies do “complexo *Candida parapsilosis*” mostram-se como frequentes agentes etiológicos de candidemias nosocomiais, sendo a *C. parapsilosis sensu stricto* uma das espécies não-*albicans* de *Candida* de maior incidência em infecções clínicas, estando relacionada principalmente com dispositivos médicos implantados. Neste estudo, identificamos, em nível de espécie, 29 isolados pertencentes ao “complexo *Candida parapsilosis*”, todos previamente obtidos a partir do ambiente hospitalar e de dispositivos médicos. Os isolados também foram caracterizados quanto à atividade *in vitro* de aspartil proteinase e fosfolipase, e quanto à habilidade de formar biofilmes. Os isolados identificados como *C. parapsilosis sensu stricto* foram avaliados quanto à capacidade de interagir com *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter* sp. no desenvolvimento de biofilmes polimicrobianos de duas espécies. Estes biofilmes foram então analisados quanto à sua capacidade de tolerar o tratamento com concentrações crescentes de fármacos antimicrobianos e sanitizantes. Como resultados, 75,9% dos isolados foram identificados como *C. parapsilosis sensu stricto*, 24,1% como *Candida metapsilosis* e nenhum como *Candida orthopsilosis*. Em relação à *C. parapsilosis sensu stricto*, todos os isolados mostraram-se como produtores muito fortes de aspartil proteinase e 13,6% de fosfolipase. Em relação à *C. metapsilosis*, 71,4% e 14,3% dos isolados apresentaram atividade muito forte de aspartil proteinase e fosfolipase, respectivamente. Além disso, todos os isolados foram capazes de formar biofilme em superfície de poliestireno. Dentre os isolados de *C. parapsilosis sensu stricto*, 9,1%, 45,4% e 45,4% mostraram-se como produtores fortes, moderados e fracos de biofilme, respectivamente. Em relação aos de *C. metapsilosis*, 71,4% foram moderados e 28,6% foram fracos formadores de biofilme. Demonstramos também que a *C. parapsilosis sensu stricto* foi capaz de se associar de forma sinérgica com ambas as bactérias testadas, pois nos biofilmes polimicrobianos um número significativamente maior de células bacterianas se aderiram em comparação à sua condição monomicrobiana. Entretanto, as bactérias não interferiram na eficiência de formação de biofilmes da levedura. O tratamento com sanitizantes mostrou que o álcool etílico a 70% e o hipoclorito de sódio a 1% foram eficazes em diminuir significativamente o número de células viáveis, mas não foram capazes, mesmo assim, de eliminar as populações

microbianas dos biofilmes. Além disso, nossos dados mostraram que as células integrantes de todos os biofilmes monomicrobianos avaliados apresentaram elevada tolerância aos seus respectivos antimicrobianos, em doses superiores aos seus valores de concentração inibitória mínima, previamente determinados. Mesmo assim, os biofilmes de *C. parapsilosis sensu stricto* de 6, 12 e 24 h mostraram alguma perda de viabilidade celular ao tratamento com cetoconazol, enquanto biofilmes de 48 h se mostraram resistentes a este antifúngico. Nos biofilmes polimicrobianos, a presença das células bacterianas não influenciou a tolerância das leveduras ao antimicrobiano. Por outro lado, as células de *S. aureus* e *Acinetobacter* sp. foram ainda mais tolerantes ao tratamento com vancomicina e polimixina B, respectivamente, quando em biofilmes polimicrobianos, de forma significativa em comparação às suas respectivas condições monomicrobianas. Os resultados deste trabalho revelaram a capacidade de isolados do “complexo *C. parapsilosis*” do ambiente nosocomial de expressar importantes fatores de virulência, bem como de interagir sinergicamente com bactérias de importância clínica. Em conjunto, estas informações mostram-se de grande relevância clínica, em função de tais características fenotípicas representarem um importante risco em termos de infecção hospitalar a pacientes internados.

Palavras-chave: “Complexo *Candida parapsilosis*”, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* sp., biofilmes, enzimas hidrolíticas, fármacos antimicrobianos, sanitizantes.

ABSTRACT

The species of the “*C. parapsilosis* complex” are common etiological agents of nosocomial candidemia, and *C. parapsilosis sensu stricto* is one of non-*albicans* *Candida* species with the highest incidences in clinical infections, primarily related to implanted medical devices. In this study, we identified 29 isolates comprising the “*C. parapsilosis* complex” to species level, all previously obtained from the hospital environment and medical tools. The isolates were also characterized for *in vitro* activity of aspartyl proteinase and phospholipase, as well as for their ability to form biofilms. The isolates identified as *C. parapsilosis sensu stricto* were also evaluated for their capability to interact with *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter* sp. in two-species polymicrobial biofilms. These biofilms were then analyzed for their tolerance to treatments with increasing concentrations of antimicrobials drugs and sanitizers. The results indicated that 75.9% of the isolates were identified as *C. parapsilosis sensu stricto*, 24.1% as *Candida metapsilosis* and none as *Candida orthopsilosis*. Regarding *C. parapsilosis sensu stricto*, all isolates were very strong producers of aspartyl proteinase, and 13.6% of phospholipase. Regarding *C. metapsilosis*, 71.4% and 14.3% of the isolates showed very strong aspartyl proteinase and phospholipase activity, respectively. Moreover, all isolates were able to form biofilm on polystyrene surface. Among the *C. parapsilosis sensu stricto* isolates, 9.1%, 45.4% and 45.4% were strong, moderate and weak biofilm producers, respectively. Regarding *C. metapsilosis*, 71.4% were moderate and 28.6% were weak biofilm producers. We also demonstrated that *C. parapsilosis sensu stricto* was capable of associating synergistically with both bacteria tested, since in polymicrobial biofilms a significantly higher number of bacterial cells adhered, compared to their own monomicrobial condition. However,

bacterial cells did not interfere on the efficiency of yeast biofilm formation. When testing sanitizers, we showed that 70% ethyl alcohol and 1% sodium hypochlorite were effective to significantly decrease the number of viable cells, although they have not been able to eliminate the microbial populations of the biofilms. Our data also showed that the cells from all monomicrobial biofilms exhibited elevated tolerance to their respective antimicrobial drugs, at higher doses than their pre-determined minimal inhibitory concentration values. Nevertheless, biofilms of 6, 12 and 24 h of *C. parapsilosis sensu stricto* presented some decrease in cell viability to the treatment with ketoconazole, whereas 48 h biofilms were resistant to this antifungal. In polymicrobial biofilms, the bacterial cells did not affect the tolerance of yeast isolates to this antimicrobial. Conversely, *S. aureus* and *Acinetobacter* sp. cells were even more tolerant to the treatment with vancomycin and polymyxin B, respectively, when they were in polymicrobial biofilms, which was significantly different from their respective monomicrobial condition. The results from this work revealed the ability of “*C. parapsilosis* complex” isolates from nosocomial environment to express important virulence factors, as well as to interact synergistically with bacterial species of clinical importance. This data is clinically relevant, since such phenotypic features may represent an important risk in terms of nosocomial infection to hospitalized patients.

Keywords: “*Candida parapsilosis* complex”, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* sp., biofilms, hydrolytic enzymes, antimicrobial drugs, sanitizers.

SUMÁRIO

Capítulo 1	11
1.1 Introdução.....	12
1.2 Objetivos.....	24
1.2.1 Objetivo Geral.....	24
1.2.2 Objetivos Específicos	24
Capítulo 2	25
2.1 <i>In vitro</i> evaluation of hydrolytic enzymes activity and biofilm formation of “ <i>Candida parapsilosis</i> complex” species from nosocomial environment	25
Capítulo 3	27
3.1 <i>Candida parapsilosis</i> polymicrobial biofilms with <i>Staphylococcus aureus</i> or <i>Acinetobacter</i> sp. and their susceptibility to sanitizers and antimicrobial drugs.....	27
Capítulo 4	28
4.1 Considerações finais	29
Referências Bibliográficas	33

Capítulo 1

Introdução

Objetivos

1.1 Introdução

A importância das infecções hospitalares causadas por fungos, em especial por espécies unicelulares, as chamadas leveduras, têm se mostrado em destaque na literatura internacional em função do aumento mundial da incidência de novos casos nos últimos anos (1,2,3). Neste contexto, leveduras pertencentes ao gênero *Candida* constituem agentes etiológicos de grande importância, pois são as principais espécies envolvidas em infecções fúngicas hospitalares no mundo (4,5,6).

O gênero *Candida* é classificado taxonomicamente como pertencente ao domínio Eukarya, grupo Opisthokonta, subgrupo Nucletmycea, reino Fungi, sub-reino Dikarya, filo Ascomycota, subfilo Saccharomycotina, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales (7,8), compreendendo mais de 200 espécies (9). Algumas espécies deste gênero podem ser encontradas em ambientes diversos, tais como solo, alimentos e ecossistemas aquáticos (10). Por outro lado, as espécies de *Candida* mais conhecidas fazem parte da microbiota normal do ser humano, comportando-se, em condições de saúde, como comensais da pele e de mucosas da cavidade oral, trato gastrointestinal e urogenital (11,12). Mesmo assim, tais espécies podem se tornar patógenos oportunistas em algumas situações, tais como desequilíbrio da microbiota e imunocomprometimento (11,13).

A *Candida albicans* é considerada o patógeno oportunista mais importante do gênero *Candida*, pois é a espécie mais frequentemente isolada a partir de amostras clínicas em humanos (14). Depois de *C. albicans*, as espécies mais comumente isoladas em amostras de sangue venoso de pacientes hospitalizados são *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* (15). Dentre tais espécies, a *C. parapsilosis* é uma das

mais frequentes causas de candidemia nosocomial em pacientes, sendo uma das espécies não-*albicans* de *Candida* de maior incidência em infecções clínicas (16,17,18,19,20).

A *C. parapsilosis* tornou-se um patógeno emergente de grande importância, pois é um dos principais agentes causadores de doenças em alguns centros hospitalares, sendo relatada em 15,5% das candidemias na América do Norte, 16,3% na Europa e, em maior incidência, 23,4%, na América Latina (21,22,23,24). Neste contexto, um estudo recente realizado na Colômbia revelou que a *C. parapsilosis* foi a espécie não-*albicans* de *Candida* de maior prevalência entre os isolados clínicos, seguida pela *C. tropicalis* (19).

No que se refere ao Brasil, poucos dados recentes foram publicados quanto à prevalência de diferentes espécies de *Candida*, mas trabalhos mais antigos já relatavam a *C. parapsilosis* como a segunda espécie não-*albicans* de *Candida* mais frequentemente isolada a partir de amostras clínicas, atrás apenas da *C. tropicalis* (25,26). Este dado foi posteriormente confirmado com um estudo conduzido por Júnior *et al.* (2011), em que a *C. parapsilosis* foi a espécie de *Candida* mais prevalente dentre as amostras coletadas em sítios anatômicos de militares hospitalizados com quadros sugestivos de infecção fúngica, estando presente em 20,5% dos casos, seguida pela *C. tropicalis* (13,9%) (27). Este conjunto de dados reforça a importante ocorrência desta espécie nos centros hospitalares, sendo geralmente associada com infecções clínicas (28). Da mesma forma, diferentes relatos têm demonstrado a alta prevalência desta espécie em diversos locais dos ambientes nosocomiais, bem como em dispositivos médicos e em equipamentos de proteção individual (15,17,29,30).

Baseando-se em análises genéticas, foi constatado que a *C. parapsilosis* forma um complexo de três espécies geneticamente distintas, o chamado “complexo *C. parapsilosis*”, constituído por *C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis* (31). Estas três espécies são fisiologicamente e morfologicamente indistinguíveis, sendo necessária a aplicação de métodos moleculares para diferenciá-las (32). Mesmo havendo ainda a publicação de trabalhos que as descrevem como uma única espécie (20,33,34), a partir do relato do “complexo *C. parapsilosis*” observou-se um crescente interesse em estudá-las separadamente, com base nas suas diferenças quanto ao perfil de suscetibilidade a fármacos antifúngicos, capacidade de adesão a superfícies (35), bem como à expressão de outras características fenotípicas indicadoras do seu potencial de patogenicidade (36). Comparando as três espécies entre si, a *C. parapsilosis sensu stricto* tem sido a mais frequentemente isolada a partir de amostras clínicas e ambientais (36,37,38), além de apresentar indícios de um potencial de patogenicidade superior em relação às outras duas espécies do complexo (36).

Sabe-se que o aumento da incidência de infecções fúngicas invasivas tem sido atribuído principalmente ao aumento da população suscetível, ao mesmo tempo em que procedimentos médicos invasivos com a necessidade do uso de dispositivos implantáveis têm sido cada vez mais frequentes (15,39). Estes dispositivos, por vezes, podem ser colonizados por microrganismos, constituindo assim, uma porta de entrada para uma colonização sistêmica (40). Neste contexto, diferentes relatos têm demonstrado que a candidemia causada por *C. parapsilosis sensu stricto* está associada principalmente à presença de dispositivos de longa permanência, o que tem atraído cada vez mais a atenção de profissionais da saúde (35,36,41). Esta espécie também tem se mostrado como um

importante agente etiológico de endocardite, artrite séptica e peritonite, geralmente associadas a procedimentos médicos invasivos ou com a utilização de próteses (42,43), atingindo pacientes de todas as idades em vários países (17,22,28).

O desenvolvimento dos diferentes quadros de candidemias se dá não apenas por uma disfunção imunológica do hospedeiro, mas também devido à habilidade do fungo de se adaptar às novas condições ambientais, o que depende da expressão de genes associados ao processo de infecção, os chamados fatores de virulência (44). Dentre os diversos fatores de virulência encontrados em algumas espécies de *Candida*, podem ser citados: a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas específicas (34,45); a superexpressão de genes que regulam a atividade de bombas de efluxo de moléculas, aumentando a tolerância a fármacos antifúngicos (46,47); a capacidade de alterar a morfologia colonial (48), bem como a morfologia celular, de leveduriforme para filamentosa (44); a produção de adesinas, facilitando a sua adesão a superfícies (49,50), e a propriedade de formar biofilmes em tecidos vivos e/ou substratos inanimados (48,51).

Em relação a enzimas hidrolíticas, algumas espécies de *Candida* apresentam a capacidade de produzir fosfolipases (PLs) e aspartil proteinases (SAPs) (16,37,52). As PLs e as SAPs têm um papel importante na invasão aos tecidos do hospedeiro, uma vez que podem provocar a ruptura da membrana das células epiteliais, permitindo a infiltração das hifas ao citoplasma destas células (34). Além disso, tais enzimas conferem à levedura a capacidade de evadir a ação do sistema imunológico através da degradação de uma variedade de proteínas (53,54), incluindo imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento e citocinas (34). Dessa forma, PLs e SAPs parecem desempenhar um papel importante na patogenicidade das infecções causadas por espécies de *Candida* (53,54).

Considerando especificamente o “complexo *C. parapsilosis*”, a *C. parapsilosis sensu stricto* foi descrita como capaz de expressar níveis superiores de atividade de SAP em comparação às outras duas espécies, indicando um potencial de patogenicidade superior dessa levedura em relação a este fator de virulência (36).

Além da capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, a formação de biofilmes constitui um importante fator de virulência para o gênero *Candida* (40,55,56). Biofilmes são estruturas formadas por comunidades microbianas que se desenvolvem em meio a uma matriz de material exopolimérico (*Extracellular Polymeric Substances* – EPS) (57,58). Em geral, são compostos por grupos de microrganismos sésseis arranjados em estruturas chamadas microcolônias (51), que podem apresentar elevada resistência a desinfecções químicas, terapia antimicrobiana, bem como uma elevada capacidade de evasão frente à resposta do sistema imunológico (51,59). Estas estruturas também podem servir como proteção para o desenvolvimento, nutrição, cooperação metabólica e aquisição de novas características genéticas pelos microrganismos integrantes (51). Desta forma, a ocorrência de biofilmes em superfícies vivas ou inanimadas é um fator importante para o desenvolvimento de infecções clínicas (56).

Em relação aos biofilmes formados por espécies de *Candida*, é sabido que, primeiramente, as células se aderem à superfície onde se encontram e então desenvolvem uma camada através do contato célula-célula (60). Após a adesão, as células passam por uma mudança de crescimento do tipo leveduriforme para crescimento em hifas e/ou pseudohifas, o que se encontra relacionado com o desenvolvimento de um biofilme bem estruturado (61). Em seguida, ocorre a maturação do biofilme, caracterizada pela presença

de uma matriz extracelular e, por fim, a dispersão das células, que podem, então, atingir novos sítios e estabelecer um novo biofilme (23).

Assim como na grande maioria dos biofilmes microbianos, as células sésseis de *Candida* spp. mostram-se menos suscetíveis a agentes antimicrobianos em comparação às células planctônicas da mesma linhagem (58). Esse fenômeno tem sido descrito como relacionado ao processo de maturação do biofilme, entretanto, o seu mecanismo exato ainda não é bem elucidado (62). Uma hipótese é que a presença da matriz extracelular do biofilme restringe a penetração dos fármacos devido à formação de uma barreira difusa e, com isso, apenas as camadas celulares mais superficiais ficam em contato com doses letais dos antimicrobianos (39,63). Além disso, moléculas sinalizadoras já foram descritas como capazes de influenciar a formação do biofilme e a sua resistência a antimicrobianos em diversos microrganismos, sendo geralmente associada com a comunicação intercelular que ocorre através do *quorum-sensing* (59,64,65,66).

De forma específica em relação ao “complexo *C. parapsilosis*”, a maioria dos trabalhos indica que os seus biofilmes costumam ser menos complexos, comparado aos de *C. albicans* (67,68). Esta característica se dá, em parte, pelo fato de biofilmes formados por tais espécies não apresentarem hifas, apenas leveduras e pseudohifas (68). Os seus biofilmes também se mostram menos espessos comparados aos de *C. albicans* e são frequentemente observados formando monocamadas ou alguns agregados de células leveduriformes (69). Enquanto biofilmes de *C. albicans* produzem uma matriz extracelular rica em proteínas, a matriz extracelular produzida em biofilmes do “complexo *C. parapsilosis*” apresenta predominantemente carboidratos (70). Esta última característica faz com que os seus biofilmes apresentem uma afinidade maior para materiais protéticos

em relação aos de *C. albicans*, especialmente em ambientes com concentração elevada de lipídios e glicose (71,72). Em relação a diferenças entre as três espécies do complexo, foi relatado que a *C. parapsilosis sensu stricto* produz biofilmes de forma mais eficiente quando comparada com *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (35), indicando uma capacidade maior de adesão e crescimento em superfícies, em relação às outras duas espécies.

Em termos de importância clínica, biofilmes de *C. parapsilosis* já foram observados como resistentes a tratamentos com fármacos antifúngicos e à ação do sistema imunológico, o que se encontra associado com um aumento da mortalidade de pacientes infectados por esta espécie (33,73). Neste contexto, um estudo revelou que na condição planctônica, todos os isolados de *C. parapsilosis* estudados mostraram-se suscetíveis ao voriconazol, porém, quando na condição de biofilme, apresentaram resistência a este antimicrobiano em doses $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ (73). Em outro trabalho, avaliou-se a suscetibilidade de isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, e das espécies pertencentes ao “complexo *C. parapsilosis*”, na condição de biofilme, frente aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B. Neste estudo, os autores observaram que a *C. parapsilosis sensu stricto* foi a espécie que apresentou menor suscetibilidade frente à anfotericina B, considerando todas as espécies utilizadas e os métodos de análise empregados (74).

Dados recentes têm mostrado que a *C. albicans*, especialmente quando encontrada em sua morfologia de hifa, apresenta alta capacidade de aderir diferentes espécies bacterianas em seus filamentos, o que pode levar à formação dos chamados biofilmes polimicrobianos (75,76). Esses biofilmes representam um problema de grande relevância clínica, com potencial para servir como reserva de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos e bactérias (77). O desenvolvimento de biofilmes

polimicrobianos pode dificultar a identificação do real agente etiológico da infecção e a aplicação de um tratamento adequado (78). Nestas condições, não apenas a virulência dos microrganismos integrantes dos biofilmes polimicrobianos pode ser modificada consideravelmente, mas também a padronização de tratamentos usualmente eficazes contra esses patógenos pode vir a ser alterada (79). Entretanto, apesar do grande potencial como fonte de microrganismos patogênicos em tecidos vivos ou superfícies inertes (48,80), os biofilmes polimicrobianos que envolvem espécies de *Candida* ainda foram pouco investigados (77,81).

Todos os relatos da literatura sobre a capacidade de formação de biofilmes polimicrobianos por *Candida* com espécies bacterianas de importância clínica são referentes à *C. albicans* (75,76). Esta espécie já foi descrita como capaz de interagir com uma variedade de bactérias no desenvolvimento de biofilmes polimicrobianos, estando relacionada principalmente com *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* (76,77,82), embora já tenha sido descrita como capaz de se associar com *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus gordonii* (83,84,85). Para a espécie *C. parapsilosis*, mesmo sendo relatada como um importante agente etiológico emergente de candidoses (22,42), bem como uma espécie prevalente em ambientes hospitalares e dispositivos médicos (86), ainda não se tem dados a respeito desta propriedade.

Espécies de *Candida* e *S. aureus* normalmente existem como comensais e colonizam superfícies das mucosas humanas (87). Durante co-infecções associadas a biofilmes, *C. albicans* forma uma base facilitando a adesão e o desenvolvimento de *S. aureus* (82). Além disso, isolados de *C. albicans* e *S. aureus* são, com frequência, obtidos a partir de biofilmes polimicrobianos formados sobre dispositivos médicos implantados (39).

Dados relativos aos mecanismos de interação entre estas duas espécies ainda são escassos, porém, estima-se que a proteína Als3 de *C. albicans* faça a mediação da ligação do *S. aureus* às hifas da levedura (49,88).

Nas últimas décadas, isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) emergiram como um sério patógeno nosocomial e da comunidade (89), sendo uma das principais causas de infecções no mundo (90). Os isolados de MRSA geralmente são multirresistentes, possuindo fatores determinantes de resistência às fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, macrolídeos, clindamicina e algumas tetraciclina (91). Dessa forma, os glicopeptídeos, como por exemplo, vancomicina e teicoplanina, tornaram-se as opções terapêuticas para o tratamento de infecções por este microrganismo (92,93). Porém, em meados de 1990 surgiram isolados com sensibilidade diminuída à vancomicina, estando esse achado relacionado principalmente ao uso extensivo desse fármaco por longos períodos (94). Além disso, estima-se que isolados multirresistentes de *S. aureus* obtidos a partir de ambientes clínicos têm uma elevada probabilidade de formar biofilmes em dispositivos médicos de longa permanência (95), bem como de desenvolver infecções crônicas, persistentes e recorrentes (96). De forma igualmente importante, há relatos de que isolados de MRSA, quando formam biofilmes polimicrobianos com *C. albicans*, apresentam aumento da resistência a agentes antimicrobianos, como a vancomicina (77,81).

Assim como o *S. aureus*, o *A. baumannii* também é um patógeno nosocomial oportunista e consegue sobreviver em ambientes hospitalares apesar das condições desfavoráveis, como dessecação e tratamento com antimicrobianos e sanitizantes (97). Supõe-se que a capacidade de persistir nesses ambientes e de desenvolver fatores de

virulência é um resultado da capacidade de formar biofilmes em superfícies abióticas, tais como poliestireno e vidro, bem como em superfícies bióticas (65,98).

Há pouco tempo atrás, infecções causadas por *A. baumannii* eram tratadas com antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica, tais como os carbapenêmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclinas (99,100). No entanto, a disseminação de isolados multirresistentes promoveu uma redução no número de fármacos que apresentavam atividade contra este patógeno, levando à necessidade do uso de novas estratégias de tratamento, que passaram a incluir o uso da tigeciclina e das polimixinas, sendo esta última introduzida na prática clínica há mais de 50 anos (98,101,102,103). A maioria das infecções causadas por *A. baumannii* são adquiridas no ambiente hospitalar, principalmente em unidades de cuidados intensivos (97), sendo que os fatores de risco incluem imunodepressão, uso de ventilação associada com dificuldades respiratória, prévia terapia com antimicrobianos, colonização anterior por esta bactéria e procedimentos médicos invasivos (104,105). Além disso, *A. baumannii* se liga às células epiteliais humanas, bem como aos filamentos de *C. albicans*, neste caso formando biofilmes polimicrobianos, em um processo de adesão que envolve, pelo menos, a sua proteína de membrana externa OmpA (65,76). Entretanto, diferentemente de *S. aureus*, não há dados na literatura relativos ao comportamento de espécies de *Acinetobacter* frente ao tratamento com fármacos antibacterianos, quando estas se encontram na condição de biofilmes polimicrobianos com espécies de *Candida*.

Sabe-se que os biofilmes constituem um sério problema hospitalar (63,106), além de apresentarem uma matriz extracelular que confere proteção química e física, dificultando a sua remoção de superfícies (67). Dessa forma, estratégias de controle para

reduzir a sua formação, como a utilização de mecanismos de limpeza e desinfecção química, vêm sendo amplamente recomendados e empregados (107,108). Para tal propósito, existem diversos produtos disponíveis na indústria, tais como compostos à base de álcool, cloro, iodo, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e quartenário de amônia (109). Porém, apesar da eficiência destes químicos como sanitizantes, alguns microrganismos podem resistir a esses tratamentos, o que pode levar ao desenvolvimento de biofilmes em materiais hospitalares (110). Além disso, o uso dos sanitizantes não necessariamente reduz o índice de formação de biofilmes, pois para destruí-los e removê-los, os agentes químicos devem ser capazes de penetrar na EPS para ter um livre acesso às células microbianas (107,111).

Ao longo dos anos, o uso de antissépticos, sanitizantes e de fármacos antimicrobianos têm desempenhando um papel importante no controle de doenças infecciosas e de comunidades microbianas indesejadas (108,112,113). Em relação aos biofilmes formados por espécies do “complexo *C. parapsilosis*”, pouca informação se tem quanto à sua sensibilidade a agentes químicos, apesar do crescente número de evidências que apontam a frequente ocorrência dessa levedura em ambientes hospitalares (18,114). De forma também importante, a capacidade de formar biofilmes polimicrobianos de *Candida* com espécies bacterianas de importância clínica, bem como a capacidade de tolerância destas bactérias frente à ação de fármacos antibacterianos nesta condição, foi apenas investigada com a espécie *C. albicans*. Neste contexto, a literatura também não relata dados referentes à suscetibilidade a fármacos antifúngicos de espécies de *Candida*, quando integrantes de biofilmes polimicrobianos com bactérias.

Desta forma, a obtenção de resultados desta natureza que envolvam o “complexo *C. parapsilosis*”, e em particular a espécie *C. parapsilosis sensu stricto*, se justifica pela sua já descrita capacidade de formar biofilmes, somada ao seu potencial de patogenicidade e, principalmente, a sua alta e importante prevalência em ambientes hospitalares.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar a capacidade de isolados do “complexo *C. parapsilosis*” obtidos em ambiente hospitalar de produzir enzimas hidrolíticas e de interagir com *S. aureus* e *Acinetobacter* sp. no desenvolvimento de biofilmes polimicrobianos, bem como a ação de fármacos antimicrobianos e sanitizantes sobre tais biofilmes.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar isolados nosocomiais do “complexo *C. parapsilosis*” em nível de espécie através de métodos moleculares;
- Mensurar a habilidade de produção de biofilmes dos isolados identificados;
- Avaliar a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas destes isolados;
- Analisar a capacidade dos isolados de *C. parapsilosis sensu stricto* em formar biofilmes polimicrobianos de duas espécies com *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) e com *Acinetobacter* sp.;
- Testar a sensibilidade dos biofilmes frente à ação de sanitizantes comumente utilizados em práticas de higienização hospitalar;
- Testar a capacidade dos biofilmes polimicrobianos formados por *C. parapsilosis sensu stricto* e MRSA em alterar o perfil de suscetibilidade ao cetoconazol nesta levedura e à vancomicina nesta bactéria;
- Testar a capacidade dos biofilmes polimicrobianos formados por *C. parapsilosis sensu stricto* com *Acinetobacter* sp. em alterar o perfil de suscetibilidade ao cetoconazol nesta levedura e à polimixina B nesta bactéria.

Capítulo 2

Artigo Científico

***In vitro* evaluation of hydrolytic enzymes activity and biofilm formation of “*Candida parapsilosis* complex” species from nosocomial environment**

Shaiana Paula-Mattiello, Sílvia Dias de Oliveira, Renata Medina-Silva*

*Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil*

Artigo científico submetido ao periódico científico *Medical Mycology*, publicado pela Oxford University Press.

Fator de impacto: 2.26

Guia dos autores: http://www.oxfordjournals.org/our_journals/mmy/for_authors/

Medical Mycology - Manuscript ID MM-2015-0067

onbehalfof+mm.editorialoffice+oup.com@manuscriptcentral.com em nome de
mm.editorialoffice@oup.com

Enviado: quarta-feira, 18 de março de 2015 16:51

Para: Renata Medina da Silva

18-Mar-2015

Dear Miss Medina-Silva:

Your manuscript entitled "*In vitro* evaluation of hydrolytic enzymes activity and biofilm formation of "*Candida parapsilosis* complex" species from nosocomial environment" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Medical Mycology.

Your manuscript ID is MM-2015-0067.

If there are any changes in your street or e-mail addresses, please log in to ScholarOne Manuscript at <https://mc.manuscriptcentral.com/tmmv> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/tmmv>.

Thank you for submitting your manuscript to Medical Mycology.

Sincerely,

Editor-in-Chief
Medical Mycology

Capítulo 3

Artigo Científico

***Candida parapsilosis* polymicrobial biofilms with *Staphylococcus aureus* or *Acinetobacter* sp. and their susceptibility to sanitizers and antimicrobial drugs**

Shaiana Paula-Mattiello, Elenise Amaral da Silva, Sílvia Dias de Oliveira, Renata Medina-Silva*

PUCRS, Faculdade de Biociências, Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Porto Alegre, Brazil

Artigo científico a ser submetido ao periódico científico *Future Microbiology*, publicado pela Future Medicine.

Fator de impacto: 4.27

Guia dos autores: <http://www.futuremedicine.com/page/authors.jsp>

Capítulo 4

Considerações Finais

4.1 Considerações Finais

O aumento da incidência de infecções fúngicas invasivas tem sido atribuído principalmente ao aumento da população suscetível, ao mesmo tempo em que procedimentos médicos invasivos com a necessidade do uso de dispositivos implantáveis têm sido cada vez mais frequentes (15,39). Neste contexto, diferentes relatos têm demonstrado que a candidemia causada por *C. parapsilosis sensu stricto* está associada principalmente com a presença de dispositivos de longa permanência, o que tem atraído cada vez mais a atenção de profissionais da saúde (35,36,41). Esta espécie de *Candida* já foi caracterizada como capaz de expressar importantes fatores de virulência, que podem estar envolvidos com o agravamento de infecções, como a habilidade de produzir enzimas hidrolíticas e capacidade de formar biofilmes (35,36).

Os dados obtidos neste estudo revelaram que todos os isolados do “complexo *C. parapsilosis*” investigados foram capazes de produzir a enzima hidrolítica aspartil proteinase (SAP), sendo que quatro também foram capazes de produzir a fosfolipase (PL). Estas enzimas promovem a ruptura da membrana de células epiteliais, permitindo a infiltração das hifas ao seu citoplasma (34), além de conferir à levedura a capacidade de evadir o sistema imunológico pela degradação de uma variedade de proteínas (53,54). Outro importante fator de virulência que todos os isolados apresentaram foi a habilidade de formar biofilmes em uma superfície abiótica. De forma também importante, os dados de identificação molecular apontaram a *C. parapsilosis sensu stricto* como a espécie mais encontrada dentre estes isolados, o que corrobora com achados de trabalhos anteriores, realizados com isolados de diversas origens clínicas e ambientais (36,37,38).

A partir destes primeiros resultados, foi avaliada a capacidade dos isolados de *C. parapsilosis sensu stricto* em formar biofilmes polimicrobianos de duas espécies com as bactérias *S. aureus* e *Acinetobacter* sp., bem como a ação de fármacos antimicrobianos e sanitizantes sobre estes biofilmes. Nestes experimentos, foi possível observar que a *C. parapsilosis sensu stricto* é capaz de interagir de forma sinérgica com *S. aureus* e com *Acinetobacter* sp. no desenvolvimento de biofilmes, pois na condição polimicrobiana, um número significativamente superior de células bacterianas se aderiram, em comparação aos seus respectivos biofilmes monomicrobianos. Estas associações foram semelhantes ao observado pela interação com *C. albicans* com estas espécies bacterianas (76,77,115), porém, este é o primeiro relato de tais interações com a espécie *C. parapsilosis sensu stricto*.

Os biofilmes investigados foram testados em relação à sua resposta ao tratamento com álcool etílico a 70% e hipoclorito de sódio a 1%. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que ambos os sanitizantes induziram significativa perda de viabilidade celular em todos os biofilmes avaliados, porém, mesmo após o maior tempo de tratamento, ainda restaram células fúngicas e bacterianas viáveis, indicando que os sanitizantes não foram capazes de eliminar toda a população microbiana presente nos biofilmes, sem diferenças observáveis entre os biofilmes mono- e polimicrobianos. Estes dados ressaltam a importância da ocorrência e da capacidade de tolerância destes biofilmes em superfícies abióticas, indicando, desta forma, o seu potencial como eficientes reservatórios de patógenos de importância clínica em ambientes nosocomiais.

Os biofilmes também foram testados quanto à capacidade de tolerar tratamentos com fármacos antimicrobianos. Os resultados revelaram que todos os isolados bacterianos e

fúngicos apresentaram, na condição de biofilme, uma elevada tolerância aos antimicrobianos, em doses superiores aos seus respectivos valores de concentração inibitória mínima. Nestes experimentos, os biofilmes jovens, mono e polimicrobianos, de *C. parapsilosis sensu stricto* sofreram uma pequena perda de viabilidade celular frente ao cetoconazol, enquanto os maduros mostraram-se totalmente tolerantes a este antifúngico. Dessa forma, estes dados sugerem que o desenvolvimento de biofilmes pela *C. parapsilosis sensu stricto* em dispositivos médicos pode-se mostrar de grande relevância clínica, pois quando presentes, o tratamento com cetoconazol ou outro azólico que possua o mesmo mecanismo de ação, pode apresentar pouca ou nenhuma eficácia terapêutica.

Biofilmes de *S. aureus* também foram avaliados quanto à capacidade de tolerar o tratamento com vancomicina, na condição polimicrobiana com os isolados de *C. parapsilosis sensu stricto*. Nestes experimentos, os dados mostraram um número significativamente maior de células bacterianas sobreviventes, comparado ao da condição monomicrobiana, indicando que, em associação com a levedura, esta bactéria obteve um efeito protetor, aumentando a sua tolerância ao tratamento com o antimicrobiano. O mesmo foi observado quando o isolado de *Acinetobacter* sp. foi testado, em biofilmes com as leveduras, quanto à sua tolerância ao tratamento com a polimixina B. Estes dados são semelhantes aos já observados para a interação de *C. albicans* com *S. aureus* (77), porém, este é o primeiro trabalho a associar *Acinetobacter* sp. e *S. aureus* com a levedura *C. parapsilosis sensu stricto*.

Dessa forma, o corpo de dados levantados neste trabalho revelou a elevada capacidade de isolados do “complexo *C. parapsilosis*”, originários de ambiente hospitalar, de expressar, em altos níveis, importantes fatores de virulência que, em conjunto, indicam o

seu grande potencial para o desenvolvimento de quadros infecciosos. Além disso, traz o primeiro relato a respeito da capacidade de interação entre a espécie de levedura *C. parapsilosis sensu stricto* com *S. aureus* e *Acinetobacter* sp. na formação de biofilmes polimicrobianos promotores de uma elevada tolerância a fármacos antimicrobianos. Em função do seu potencial em se desenvolver em superfícies, próteses e diversos outros dispositivos de longa permanência, juntamente com a elevada tolerância a sanitizantes e antimicrobianos, tais associações mostram-se clinicamente relevantes, representando um risco permanente à saúde de pacientes internados. Por fim, ressalta-se a perspectiva de que futuros trabalhos possam vir a elucidar os mecanismos que levam à interação sinérgica entre isolados de *C. parapsilosis sensu stricto* com *S. aureus* ou *Acinetobacter* sp., assim como os que possam estar envolvidos com o aumento da resistência aos antimicrobianos testados.

Referências Bibliográficas

1. Li Z, Zhong Q, Chang H, Yang C, Xiao Z, Xu F. A non-*albicans Candida* fungemia in very low birth weight infants in the neonatal intensive care unit of an “AAA” tertiary hospital in Shenzhen, China. *Biomedical Research*. 2013;24(4):435–40.
2. Spiliopoulou A, Dimitriou G, Jelastopulu E, Giannakopoulos I, Anastassiou ED, Christofidou M. Neonatal intensive care unit candidemia: epidemiology, risk factors, outcome, and critical review of published case series. *Mycopathologia*. 2012;173(4):219–28.
3. Miranda LDN, Rodrigues ECA, Costa SF, van der Heijden IM, Dantas KC, Lobo RD, et al. *Candida parapsilosis* candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. *BMJ*. 2012;2(4):1–7.
4. Ruan SY, Hsueh PR. Invasive candidiasis: an overview from Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 2009;108(6):443–51.
5. Awasthi AK, Jain A, Awasthi S, Ambast A, Singh K, Mishra V. Epidemiology and microbiology of nosocomial pediatric candidemia at a northern Indian tertiary care hospital. *Mycopathologia*. 2011;172(4):269–77.
6. Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez JA, López J, et al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect*. 2011;77(2):157–61.
7. Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*. 2012;59(5):429–93.
8. Taxonomy Browser. National Center for Biotechnology Information. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5475>. Access in March 10, 2015.
9. EOL - Encyclopedia of Life. Available from: <http://eol.org/pages/32103/names>. Access in March 10, 2015.
10. Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J Bras Patol Med Lab*. 2010;46(3):225–34.
11. Tsai P, Chen YT, Hsu PC, Lan CY. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. *BioMedicine*. 2012;3(1):1-14.
12. Pereira DC, Backes LTH, Calil LN, Fuentefria AM. A Six-Year Epidemiological Survey of Vulvovaginal Candidiasis in Cytopathology Reports in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Patol Trop*. 2012;41(2):163–8.
13. Yan L, Yang C, Tang J. Disruption of the intestinal mucosal barrier in *Candida albicans* infections. *Microbiol Res*. 2013;168(7):389–95.

14. Blyth CC, Chen SCA, Slavin MA, Serena C, Nguyen Q, Marriott D, et al. Not just little adults: candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. *Pediatrics*. 2009;123(5):1360–8.
15. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol*. 2014;31(1):42–8.
16. Singaravelu K, Gácsér A, Nosanchuk JD. Genetic determinants of virulence - *Candida parapsilosis*. *Rev Iberoam Micol*. 2014;31(1):16–21.
17. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):288–305.
18. Carvalho C, Yang J, Vogan A, Maganti H, Yamamura D, Xu J. Clinical and tree hollow populations of human pathogenic yeast in Hamilton, Ontario, Canada are different. *Mycoses*. 2014;57(5):271–83.
19. Cortés JA, Reyes P, Gómez CH, Cuervo SI, Rivas P, Casas CA, et al. Clinical and epidemiological characteristics and risk factors for mortality in patients with candidemia in hospitals from Bogotá, Colombia. *Braz J Infect Dis*. 2014;(45):3–9.
20. Juyal D, Sharma M, Pal S, Rathaur VK, Sharma N. Emergence of non-*albicans* *Candida* species in neonatal candidemia. *N Am J Med Sci*. 2013;5(9):541–5.
21. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, et al. *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol*. 2008;46(1):150–6.
22. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2010;51(5):561–70.
23. Pammi M, Holland L, Butler G, Gacsér A, Bliss JM. *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(5):1–23.
24. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):606–25.
25. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2816–23.
26. Colombo AL, Guimarães T, Silva LRBF, de Almeida Monfardini LP, Cunha AKB, Rady P, et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28(5):570–6.

27. Júnior DPL, Martins ER, Hahn RC, Yamamoto ACA, Teixeira AFR. Species of *Candida* isolated from anatomically distinct sites in military personnel in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. *An Bras Dermatol*. 2011;86(4):675–80.
28. Gedik H, Simsek F, Kanturk A, Yildirmak T, Arica D, Aydin D, et al. Bloodstream infections in patients with hematological malignancies: which is more fatal – cancer or resistant pathogens? *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2014;(10):743–52.
29. Sabino R, Sampaio P, Carneiro C, Rosado L, Pais C. Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. *BMC Microbiol*. 2011;11(1):180-90.
30. De Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(3):418–24.
31. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):284–92.
32. Garcia-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlin DS. Assessment of two new molecular methods for identification of *Candida parapsilosis* sensu lato species. *J Clin Microbiol*. 2011;49(9):3257–61.
33. Katragkou A, Chatzimoschou A, Simitsopoulou M, Georgiadou E, Roilides E. Additive antifungal activity of anidulafungin and human neutrophils against *Candida parapsilosis* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(3):588–91.
34. Júnior ADE, Silva AF, Rosa FC, Monteiro SG, Figueiredo PMS, et al. *In vitro* differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(3):334–8.
35. Ruiz LDS, Khouri S, Hahn RC, da Silva EG, de Oliveira VKP, Gandra RF, et al. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. *Mycopathologia*. 2013;175(3-4):231–9.
36. Abi-Chacra ÉA, Souza LOP, Cruz LP, Braga-Silva LA, Gonçalves DS, Sodr  CL, et al. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. *FEMS Yeast Res*. 2013;13(8):831–48.
37. Ge YP, Lu GX, Shen YN, Liu WDA. *In vitro* evaluation of phospholipase, proteinase, and esterase activities of *Candida parapsilosis* and *Candida metapsilosis*. *Mycopathologia*. 2011;172(6):429–38.
38. Hays C, Duhamel C, Cattoir V, Bonhomme J. Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis. *J Med Microbiol*. 2011;(60):477–80.
39. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* Infections of Medical Devices. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(2):255–67.

40. Estivill D, Arias A, Torres-Lana A, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *J Microbiol Methods*. 2011;86(2):238–42.
41. Swindell K, Lattif AA, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Parenteral lipid emulsion induces germination of *Candida albicans* and increases biofilm formation on medical catheter surfaces. *J Infect Dis*. 2009;200(3):473–80.
42. Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(12):5590–6.
43. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):133–63.
44. Brown AJP, Odds FC, Gow NAR. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10(4):307–13.
45. Noumi E, Snoussi M, Hentati H, Mahdouani K, del Castillo L, Valentin E, et al. Adhesive properties and hydrolytic enzymes of oral *Candida albicans* strains. *Mycopathologia*. 2010;169(4):269–78.
46. Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux ME, d'Enfert C, et al. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell*. 2007;6(10):1889–904.
47. Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 2008;46(1):120–8.
48. Karkowska-kuleta J, Rapala-kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*. 2009;56(2):211–24.
49. Silverman RJ, Nobbs AH, Vickerman MM, Barbour ME, Jenkinson HF. Interaction of *Candida albicans* cell wall Als3 protein with *Streptococcus gordonii* SspB adhesin promotes development of mixed-species communities. *Infect Immun*. 2010;78(11):4644–52.
50. Boer ADD, Groot PWJD, Weindl G, Schaller M, Riedel D, Diez-Orejas R, et al. The *Candida albicans* cell wall protein Rhd3/Pga29 is abundant in the yeast form and contributes. *Yeast*. 2010;(27):611–24.
51. Højby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(4):322–32.
52. Sorgo AG, Heilmann CJ, Brul S, de Koster CG, Klis FM. Beyond the wall: *Candida albicans* secret(e)s to survive. *FEMS Microbiol Lett*. 2013;338(1):10–7.

53. Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology*. 2008;154(11):3266–80.
54. Sanitá PV, Zago CE, de Oliveira Mima EG, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, et al. *In vitro* evaluation of the enzymatic activity profile of non-*albicans* *Candida* species isolated from patients with oral candidiasis with or without diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014;118(1): 54-91.
55. Seddiki SML, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, Badsı-Amir S, Taleb M, Kunkel D. Assessment of the types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria. *Int J Gen Med*. 2013;(6):1–7.
56. Martinez LR, Fries BC. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. *Curr Fungal Infect Rep*. 2010;4(4):266–75.
57. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-ribot JL. *Candida* Biofilms: an Update. *Eukaryotic cell*. 2005;4(4):633-38.
58. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013;62(1):10–24.
59. De Sordi L, Mühlshlegel FA. Quorum sensing and fungal-bacterial interactions in *Candida albicans*: a communicative network regulating microbial coexistence and virulence. *FEMS Yeast Res*. 2009;9(7):990–9.
60. Ramage G, VandeWalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*. 2001;18(4):163–70.
61. Ramage G, VandeWalle K, López-Ribot JL, Wickes BL. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;214(1):95–100.
62. Sardi JCO, Almeida AMF, Mendes Giannini MJS. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites - A brief review. *Arch Oral Biol*. 2011;56(10):951–9.
63. Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Ross KM, Andes DR. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. *Eukaryot Cell*. 2011;10(12):1660–9.
64. Lopes D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *CHS Perspectives*. 2010;(2)1–11.
65. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiology*. 2009;4(3):273–8.
66. Lazar V. Anaerobe Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe*. 2011;17(6):280–5.

67. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol.* 2009;47(7):681–9.
68. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. *Infection and Immunity.* 2002;70(2):878-88.
69. Laffey SF, Butler G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology.* 2005;151(4):1073–81.
70. Chow BDW, Linden JR, Bliss JM. *Candida parapsilosis* and the neonate: epidemiology, virulence and host defense in a unique patient setting. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(8):935–46.
71. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet.* 2009;55(5):497–509.
72. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2011;19(5):241–7.
73. Pulcrano G, Panellis D, De Domenico G, Rossano F, Catania MR. Ambroxol influences voriconazole resistance of *Candida parapsilosis* biofilm. *FEMS Yeast Res.* 2012;12(4):430–8.
74. Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol.* 2011;49(3):253–62.
75. Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, Leid JG, Costerton JW, Shirtliff ME. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* -*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010;59(3):493–503.
76. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2009;77(8):3150–60.
77. Harriott MM, Noverr MC. Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(9):3746–55.
78. Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, Costerton JW, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(1):193–213.

79. Lin JN, Lai CH, Chen YH, Chang LL, Lu PL, Tsai SS, et al. Characteristics and outcomes of polymicrobial bloodstream infections in the emergency department: A matched case-control study. *Acad Emerg Med.* 2010;17(10):1072–9.
80. Hell E, Giske CG, Hulthenby K, Danielsson KG, Marchini G. Attachment and Biofilm Forming Capabilities of *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated from Preterm Infants. *Curr Microbiol.* 2013;67:712-17.
81. Harriott MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3914–22.
82. Peters BM, Ovchinnikova ES, Krom BP, Schlecht LM, Zhou H, Hoyer LL, et al. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. *Microbiology.* 2012;158(12):2975–86.
83. Pammi M, Liang R, Hicks J, Mistretta TA, Versalovic J. Biofilm extracellular DNA enhances mixed species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*. *BMC Microbiol.* 2013;13(1):257-70.
84. Sztajner H, Szafranski SP, Tomasch J, Reck M, Nitz M, Rohde M, et al. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *ISME J.* 2014;2256–71.
85. Bamford CV, Nobbs AH, Barbour ME, Lamont RJ, Jenkinson HF. Functional regions of *Candida albicans* hyphal cell wall protein Als3 that determine interaction with oral bacterium *Streptococcus gordonii*. *Microbiology.* 2015;161(1):18-29.
86. Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, et al. Epidemiology, Risk Factors, and Prognosis of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections: Case-Control Population-Based Surveillance Study of Patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2006;44(5):1681–5.
87. Nair N, Biswas R, Götz F, Biswas L. Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. *Infect Immun.* 2014;82(6):2162–9.
88. Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, Freiberg JA, Hänsch GM, Filler SG, et al. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiology.* 2015;161(1):168-81.
89. Ippolito G, Leone S, Lauria FN, Nicastrì E, Wenzel RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The superbug. *Int J Infect Dis.* 2010;1454(4):S7–11.
90. Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* 2010;15(41):pii-19688.
91. Reygaert WC. Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Patho Strategies for Combating them.* 2013;297–305.

92. Lee CH, Tsai CY, Li CC, Chien CC, Liu JW. Teicoplanin therapy for MRSA bacteraemia: a retrospective study emphasizing the importance of maintenance dosing in improving clinical outcomes. *J Antimicrob Chemother.* 2015;10(1):257-63.
93. Guzek A, Korzeniewski K, Nitsch-Osuch A, Rybicki Z, Prokop E. *In vitro* susceptibility of *Staphylococci* and *Enterococci* to vancomycin and teicoplanin. *Neurobiol Respir.* 2013;788(1):125-32.
94. Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Publica.* 2011;30(6):519-28.
95. Kwon AS, Park GC, Ryu SY, Lim DH, Lim DY, Choi CH, et al. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;32(1):68-72.
96. Francois P, Schrenzel J, Stoerman-Chopard C, Favre H, Herrmann M, Foster TJ, et al. Identification of plasma proteins adsorbed on hemodialysis tubing that promote *Staphylococcus aureus* adhesion. *J Lab Clin Med.* 2000;135(1):32-42.
97. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(2):130-55.
98. García-Quintanilla M, Pulido MR, López-Rojas R, Pachón J, McConnell MJ. Emerging therapies for multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Trends Microbiol.* 2013;21(3):157-63.
99. Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(2):105-14.
100. Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis.* 2008;8(12):751-62.
101. Chen YH, Lu PL, Huang CH, Liao CH, Lu CT, Chuang YC, et al. Trends in the susceptibility of clinically important resistant bacteria to tigecycline: results from the Tigecycline *In Vitro* Surveillance in Taiwan study, 2006 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(3):1452-7.
102. López-Rojas R, Jiménez-Mejías ME, Lepe JA, Pachón J. *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin alters its antibiotic resistance profile: a case report from Spain. *J Infect Dis.* 2011;204(7):1147-8.
103. Rolain JM, Roch A, Castanier M, Papazian L, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin with impaired virulence: a case report from France. *J Infect Dis.* 2011;204(7):1146-7.
104. Jung JY, Park MS, Kim SE, Park BH, Son JY, Kim EY, et al. Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. *BMC Infect Dis.* 2010;10:228.

105. Jang TN, Lee SH, Huang CH, Lee CL, Chen WY. Risk factors and impact of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in the adult intensive care unit: a case-control study. *J Hosp Infect.* 2009;73(2):143–50.
106. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med.* 2012;125(1 Suppl):S3–13.
107. Araújo P, Lemos M, Mergulhão F, Melo L, Simões M. Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. *Science Against Microbiol Pathog.* 2011;826–34.
108. Da Silva PMB, Acosta EJTR, Pinto LDR, Graeff M, Spolidorio DMP, Almeida RS, et al. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. *Mycoses.* 2011;54(6):e712–7.
109. Nascimento HM, Delgado DA, Barbaric IF. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. *Rev Ceciliana.* 2010;2(1):11–3.
110. Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dobois-Brissonnet. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: A review. *Biofouling.* 2011(27)9:1017-1032.
111. Stewart PS, Rayner J, Roe F, Rees WM. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J Appl Microbiol.* 2001;91(3):525–32.
112. Awodele O, Emeka PM, Agbamuche HC, Akintonwa A. The antimicrobial activities of some commonly used disinfectants on *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *African J Biothech.* 2007;6(8):987–90.
113. Cruz EDA, Pimenta FC, Palos MA, Silva SRM, Gir E. Lavado de manos: 20 años de divergencias entre la práctica y lo idealizado. *Ciencia y Enfermería.* 2009;(1):33-8.
114. Dizbay M, Kalkanci A, Sezer BE, Aktas F, Aydogan S, Fidan I, et al. Molecular investigation of a fungemia outbreak due to *Candida parapsilosis* in an intensive care unit. *Braz J Infect Dis.* 2008;12(5):395–99.
115. Ibarra-Trujillo C, Villar-Vidal M, Gaitán-Cepeda LA, Pozos-Guillen A, Mendoza-de Elias R, Sánchez-Vargas LO. Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Rev Iberoam Micol.* 2012;29(4):214-22.