

Análise *in silico* do DNA genômico de três espécies do gênero *Candida* para verificação de ocorrência de microssatélites e observação de semelhanças interespecíficas

Analysis *in silico* of genomic DNA of three species of *Candida* for verification of microssatellite occurrence and observation of interspecific similarities

Letícia Vieira Barbosa¹, Iven Neylla Farias Vale Mendes¹, Marcia Barros Alves², Bruno Carvalho Campelo², Karol Cristina Fonseca Moura², Naiza Maria Castro Nogueira¹, Cristina de Andrade Monteiro^{1,2}

Resumo: Nos últimos anos, estudos epidemiológicos apontam a contribuição relevante que fungos do gênero *Candida*, especialmente *Candida albicans*, vêm dando às infecções hospitalares e comunitárias, seguidas de altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente de lactentes e pacientes imunocomprometidos. Os protocolos comumente conhecidos para análise e identificação das espécies são muito caros e demorados e, por isso, estudos *in silico* dos microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) se tornaram importantes marcadores moleculares proporcionando à engenharia genética uma estratégia para ligar variações do genótipo às variações fenotípicas sem a utilização de métodos caros e demorados de análise. O presente trabalho avaliou a presença de SSR em sequências de DNA de diferentes espécies de *Candida* depositadas no *GenBank* a fim de detectar possíveis diferenças entre elas através de programas específicos. Em *Candida albicans* foram identificados maior número de SSR além de maior variedade de motivos (repetições). Foi detectado um número reduzido de microssatélites em *C. tropicalis* (cinco) e nenhum foi encontrado em *C. parapsilosis*. A utilização de SSR como ferramenta de identificação de *Candida* foi considerada satisfatória, pois revelou importantes diferenças entre as espécies analisadas quanto a presença e os tipos de SSR.

Palavras-chave: *Candida*, microssatélite, SSR, Candidíase

Abstract: Hospital infections caused by fungi have been established as a growing public health problem in many countries. In recent years, epidemiological studies have pointed out the significant contribution that fungi of the genus *Candida*, especially *Candida albicans*, are giving to the hospital and community infections, followed by high rates of morbidity and mortality, especially in infants and immunocompromised patients. Commonly known protocols for species analysis and identification are very expensive and time-consuming and, therefore, *in silico* microssatellite studies or SSR (*Simple Sequence Repeat*) analysis have become important molecular markers providing genetic engineering a strategy to link genotype variations to phenotypic variations without the use of expensive and time-consuming methods of analysis. The present work evaluated the presence of SSR in DNA sequences from different *Candida* species deposited in *GenBank* in order to detect possible differences among them through specific programs. In *Candida albicans*, a greater number of SSRs was identified, in addition to a greater variety of motifs (repetitions). A small number of microssatellites was detected in *C. tropicalis* (five) and none was found in *C. parapsilosis*. The use of SSR as a tool to identify *Candida* spp. was considered satisfactory, as it revealed important differences between the species analyzed for the presence and types of SSR.

Keywords: *Candida*, microssatellites, SSR, Candidiasis

1 – Docentes - Instituto Federal do Maranhão

2 – Docentes - Universidade CEUMA

Introdução

As infecções hospitalares causadas por fungos tem representado problema crescente de saúde pública em muitos países. Estudos epidemiológicos realizados no Brasil apontam *Candida* como um dos principais agentes de infecções nosocomiais¹ e se mostrou presente em muitos casos de infecções sistêmicas podendo ser classificada como a sétima mais prevalente². Altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente de lactentes e pacientes imunocomprometidos³ foram observadas e, portanto, estes casos constituem um grave problema de saúde pública.

Vários processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos podem facilitar a colonização e posterior infecção do hospedeiro por *Candida* spp. Dentre estes, os mais comuns são imunossupressão por várias causas, neutropenia, desnutrição e quimioterapia anti neoplásica⁴.

Espécies do gênero *Candida* apresentam variações na sua composição genômica que podem ser determinadas por procedimentos de análise genômica⁵. Estes procedimentos são úteis quando se quer determinar a identidade do isolado presente no ambiente hospitalar ou do que tenha vindo de pacientes internados, e assim associá-los aos processos infecciosos⁶.

Várias metodologias têm sido utilizadas para a tipagem de *C. albicans*^{7,8,9,10}. Contudo, a maior parte delas depende de processos demorados e de alto custo, se executado em laboratórios por meio de protocolos comumente conhecidos. Nos últimos anos, o projeto genoma e o surgimento de novas metodologias de sequenciamento propiciaram a redução dos custos e aumento

expressivo do número de sequências depositadas no *Genbank/NCBI* (*National Center for Biotechnology Information Search Database*), que é o mais conhecido banco de dados que disponibiliza, gratuitamente, sequências e ferramentas para sua análise. Este banco foi criado, inicialmente, pelo Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI) com o objetivo de abrigar sequências submetidas diretamente por autores de publicações científicas. Entretanto, não só autores, como também centros de pesquisa passaram a depositar regularmente seus dados¹¹.

A análise de sequências e a utilização de marcadores genéticos permitem ao pesquisador classificar os isolados e assim verificar semelhanças genéticas entre eles. Um dos marcadores que podem ser utilizados são os microssatélites ou SSRs (*Simple sequence repeat*). Essas sequências são formadas pela repetição em série de nucleotídeos dispostos em arranjos contendo entre um e seis pares de bases¹². Estes locos podem ser encontrados em sequências gênicas (CDS – *CoDing Segment*), 5'-UTR – *Untranslated region 5'*, 3'-UTR – *Untranslated region 3'* e íntrons) e intergênicas, podendo conduzir a um ganho ou perda de função dos genes. Variações nas regiões SSR se originam principalmente a partir de erros durante o processo de replicação, frequentemente relacionados a erros da DNA polimerase, podendo gerar inserção ou deleção de pares de bases, resultando, respectivamente, em regiões maiores ou menores. Avaliações de SSR no genoma humano têm demonstrado que muitas doenças são causadas por mutações nestas sequências revelando a importância de estudar essas regiões. Esta classe de marcadores é poderosa

em diversas aplicações da genética e melhoramento, devido a sua reprodutibilidade, natureza multi-alélica, característica co-dominante e abundância genômica, proporcionando aos geneticistas e melhoristas uma estratégia para ligar variações do genótipo às variações fenotípicas¹³.

Muitos microssatélites encontram-se em partes não-codificantes do genoma e, portanto, são biologicamente silenciosos. Isto permite que acumulem mutações sem obstáculos ao longo das gerações e dá origem à variabilidade que pode ser utilizado para fins de tipagem (*fingerprint*) de DNA e identificação individual. Outros microssatélites estão localizados em regiões de flaqueamento ou regiões intrônicas dos genes¹⁴. É possível destacar que podem ser feitos uma grande variedade de trabalhos envolvendo microssatélites, principalmente, por três características presentes nesse marcador: (1) a elevada abundância com ampla distribuição pelo genoma; (2) a neutralidade e (3) o alto polimorfismo.

Os microssatélites permitem analisar com eficiência a estrutura genética de populações por apresentarem um maior conteúdo informativo por *loco* gênico do que outros marcadores moleculares. Permite, inclusive, observar diferenças genéticas em populações separadas por poucos quilômetros, em uma escala microgeográfica¹⁵. Assim, indicam os microssatélites, devido ao alto polimorfismo, como a metodologia

mais eficiente para separar subespécies.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência *in silico* de microssatélites em DNA de três espécies de micro-organismos do gênero *Candida*.

Materiais e Métodos

A partir do *website* do NCBI (www.ncbi.nih.gov), foi realizada pesquisa para o genoma das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Para a seleção das sequências utilizou-se a opção “EST” (*expressed sequence tag*) que funciona como filtro da pesquisa.

As sequências de DNA referentes ao genoma das três espécies foram localizadas e em seguida depositadas em arquivos no padrão FASTA para posterior análise em programa adequado.

Após depósito, o alinhamento das sequências genômicas foi realizado pelo programa computacional *Bioedit*, com acesso disponível e gratuito para download, após procura em sites de buscas. Os alinhamentos das regiões de microssatélites foram executados com o objetivo de posterior importação para o *SSR Locator* e início da análise proposta¹⁶. Após o processo de alinhamento, os arquivos individuais contendo as sequências alinhadas são importados para o *SSRLocator*, programa computacional específico para triagem e consequente detecção de SSR (Figura 1).

CODIGO	CONTIGCOMPLETO	STRUCT	CONTIG	LOCOSSR	TIPOSSR	REPETICOESSR	SEQUENCIASSR	TIPOSSR
1	gi190117520gb DC87	P	1	(CT)38		2	38	CT
2	gi190117417gb DC87	P	1	(GA)38		2	38	GA
3	gi190117361gb DC87	P	1	(AGGC)5		4	5	AGGC
4	gi190117241gb DC87	P	1	(CAG)8		3	8	CAG
5	gi190116100gb DC86	P	1	(AT)20		2	20	AT
6	gi190116079gb DC86	P	1	(CT)65		2	65	CT
7	gi190116001gb DC86	P	1	(AG)48		2	48	AG
8	gi190115497gb DC86	P	1	(AC)11		2	11	AC
9	gi190114721gb DC86	P	1	(CT)28		2	28	CT
10	gi190114603gb DC86	P	1	(AT)23		2	23	AT
11	gi190113718gb DC87	P	1	(GA)11		2	11	GA
12	gi190113608gb DC86	P	1	(CT)26		2	26	CT
13	gi168022368gb DR164	P	1	(TCTTCCTCC)5		9	5	TCTTCCTCC
14	gi168022366gb DR164	P	1	(TCTTCCTCC)3		9	3	TCTTCCTCC
15	gi168022323gb DR164	P	1	(AT)11		2	11	AT
16	gi168022270gb DR164	P	1	(TTCTTA)5		6	5	TTCTTA
17	gi168022270gb DR164	P	1	(GGTGT)4		6	4	GGTGT
18	gi168022270gb DR164	P	1	(TGTTGG)3		7	3	TGTTGG

A configuração para os motivos (arranjo dos microssatélites) a serem localizados compreenderam arranjos formados com repetições mínimas de dez pares de base para dímeros (2 x 10), sete para trímeros, (3 x 7), cinco para tetrâmeros (4x5) e pentâmeros (5x5), quatro para hexâmeros (6x4) Ao término de cada entrada, o aplicativo gera arquivos descritivos em formato de texto puro; um *pipeline* desenvolvido em linguagem de programação (PERL)¹⁶.

As sequências foram estudadas, analisadas e separadas em arranjos de microssatélites não-redundantes em classes. Para a verificação de identidade entre sequências genômicas também foi usado o *BioEdite* apenas sequências não-redundantes foram selecionadas, ou seja, aquelas com

similaridade(identidade) acima de 90% foram descartadas.

Após a verificação da identidade das sequências no programa *BioEdit*, a detecção de microssatélites foi executada então pelo *SSRLocator*. Um arquivo, a partir das sequências, foi gerado para análise por meio do diretório *Creat File*.

Resultados

A análise computacional revelou além das sequências de EST de *Candida albicans* que apresentam *contigs* com ocorrência de microssatélites (Figura 2), os tipos de microssatélites encontrados nas sequências de EST em seus respectivos *loci* (Figura 3).

Results of SSR - Loci / Sequences

CODIGO	CONTIGCOMPLETO	STRUCTU	CONTIG	LOCOSSR	TIPOSSR	REPETICOESSSR	SEQUENCIASSR	TIPOSSR
1	gi190117520gbIDC87	P	1	(CT)38		2	38 CT	
2	gi190117417gbIDC87	P	1	(GA)38		2	38 GA	
3	gi190117361gbIDC87	P	1	(AGGC)5		4	5 AGGC	
4	gi190117241gbIDC87	P	1	(CAG)8		3	8 CAG	
5	gi190116100gbIDC86	P	1	(AT)20		2	20 AT	
6	gi190116079gbIDC86	P	1	(CT)65		2	65 CT	
7	gi190116001gbIDC86	P	1	(AG)48		2	48 AG	
8	gi190115497gbIDC86	P	1	(AC)11		2	11 AC	
9	gi190114721gbIDC86	P	1	(CT)28		2	28 CT	
10	gi190114603gbIDC86	P	1	(AT)23		2	23 AT	
11	gi190113718gbIDC87	P	1	(GA)11		2	11 GA	
12	gi190113608gbIDC86	P	1	(CT)26		2	26 CT	
13	gi168022368gbIDR164	P	1	(TCTTCCTCC)5		9	5 TCTTCCTCC	
14	gi168022366gbIDR164	P	1	(TCTTCCTCC)3		9	3 TCTTCCTCC	
15	gi168022323gbIDR164	P	1	(AT)11		2	11 AT	
16	gi168022270gbIDR164	P	1	(TTCTTA)5		6	5 TTCTTA	
17	gi168022270gbIDR164	P	1	(GGTGT)4		6	4 GGTGT	
18	gi168022270gbIDR164	P	1	(TGTTGG)3		7	3 TGTTGG	

Print XLS Print TXT Exit

Results A.Acids - Results SSRs - Description of Amino Acids derivated SSRs loci

SSR	NBASES	NREPEATS	CODON1	CODON2	CODON3	AACID1	AACID2	AACID3
AAG	3	10	AAG			Lys		
AAT	3	7	AAU			Asn		
AAT	3	8	AAU			Asn		
AAT	3	15	AAU			Asn		
ACC	3	7	ACC			Thr		
ACC	3	7	ACC			Thr		
AGA	3	9	AGA			Arg		
ATA	3	12	AUA			Ile		
CAA	3	28	CAA			Gln		
CAA	3	11	CAA			Gln		
CAG	3	8	CAG			Gln		
CAT	3	7	CAU			His		

Print XLS Print TXT Exit

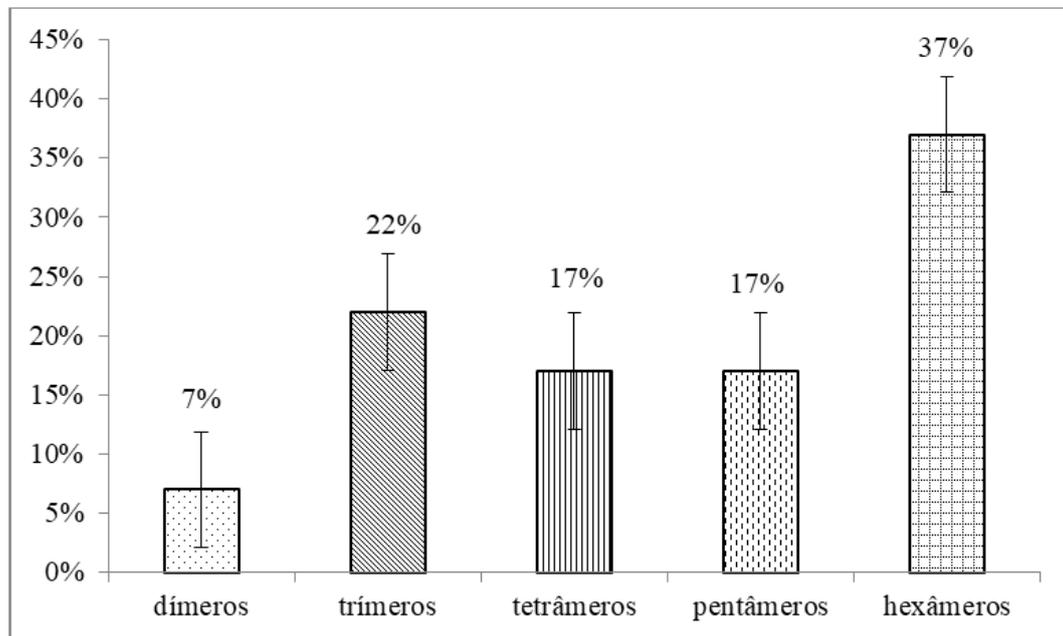
Além disso, foi possível observar a ocorrência de microssatélites que geram códons e consequentemente aminoácidos repetidos nesta espécie conforme (Figura 4).

Results A.Acids - Results SSRs - Description of Amino Acids derivated SSRs loci

SSR	NBASES	NREPEATS	CODON1	CODON2	CODON3	AACID1	AACID2	AACID3
AAG	3	10	AAG			Lys		
AAT	3	7	AAU			Asn		
AAT	3	8	AAU			Asn		
AAT	3	15	AAU			Asn		
ACC	3	7	ACC			Thr		
ACC	3	7	ACC			Thr		
AGA	3	9	AGA			Arg		
ATA	3	12	AUA			Ile		
CAA	3	28	CAA			Gln		
CAA	3	11	CAA			Gln		
CAG	3	8	CAG			Gln		
CAT	3	7	CAU			His		

Print XLS Print TXT Exit

Foram encontrados números variáveis de microssatélites em *C. albicans* (Figura 5).



As análises apontam rica variedade de tipos e repetições de microssatélites sendo detectada uma frequência maior de hexâmetros (37%) seguido de trímeros (22%), tetrâmeros (17%), pentâmeros (17%) e dímeros em menor frequência (7%).

CODIGO	CONTIG COMPLETO	STRUCTURE
1	gi 392582655 gb JX989905.1 JK989905_C05-G1111223-635-PMD19-T.ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	P
2	gi 392582459 gb JX989709.1 JK989709_A08-G1107144-370-M13R(-48).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	P
3	gi 392582017 gb JX989480.1 JK989480_F06-G080318879-G142-M13R(-48).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	P
4	gi 392581959 gb JX989422.1 JK989422_E08-G0321238-G346-M13R(-48).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	P
5	gi 392582850 gb JX990108.1 JK990108_E09-G1022152-171-M13F(-47).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	P
6	gi 392582822 gb JX990072.1 JK990072_E03-G1119084-911-M13R(-48).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	P
7	gi 392582744 gb JX989994.1 JK989994_D05-G1114372-698-M13R(-48).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	P
8	gi 392582602 gb JX989852.1 JK989852_B11-G1023084-80-M13F(-47).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	P
9	gi 392582456 gb JX989706.1 JK989706_A08-G1023073-69-M13F(-47).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	P
10	gi 392582316 gb JX990330.1 JK990330_G12-G1107135-361-M13R(-48).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	P
11	gi 392581910 gb JX989373.1 JK989373_D10-G080324211-G462-M13R(-48).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	P
12	gi 392581796 gb JX989259.1 JK989259_B09-G080324201-G452-M13R(-48).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	P

A figura 6 mostra a ocorrência de 12 contigs de *C. tropicalis* que apresentam sequências de microssatélites. A mesma configuração de arranjos de microssatélites foi aplicada na triagem das três espécies, entretanto não foi observada a ocorrência de tetrâmeros, pentâmeros e hexâmetros em *C. tropicalis* na sequência EST estudada (Tabela 1).

Tipo SSR	Sequencia SSR	Repetições SSR
<u>3</u>	CA	11
<u>3</u>	TCA	<u>9</u>
<u>3</u>	TTC	<u>8</u>
<u>3</u>	ACT	<u>8</u>
<u>2</u>	AAT	<u>7</u>

Assim como em *C. albicans*, também foram avaliados os loci de SSR para *C. tropicalis* dentro de regiões codificantes e os aminoácidos resultantes (Figura 7).

CODIGO	CONTIGCOMPLETO	STRUCTURE
1	gi392582655gb J989905.1 J989905_C05-G1111223-635-PM019-T.ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	
2	gi392582459gb J989703.1 J989703_A08-G1107144-370-M13R(-48).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	
3	gi392582017gb J989480.1 J989480_F06-G080318879-G142-M13R(-48)_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	
4	gi392581959gb J989422.1 J989422_E08-G0321238-G346-M13R(-48)_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	
5	gi392582058gb J990108.1 J990108_E09-G1022152-171-M13R(-47).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	
6	gi392582822gb J990072.1 J990072_E03-G1119084-911-M13R(-48).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	
7	gi392582744gb J989994.1 J989994_D05-G1114372-698-M13R(-48).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	
8	gi392582602gb J989852.1 J989852_B11-G1023084-80-M13R(-47).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	
9	gi392582456gb J989706.1 J989706_A08-G1023073-69-M13R(-47).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	
10	gi392582316gb J990330.1 J990330_G12-G1107135-361-M13R(-48).ab1_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	
11	gi392581910gb J989373.1 J989373_D10-G080324211-G462-M13R(-48)_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	
12	gi392581796gb J989259.1 J989259_B09-G080324201-G452-M13R(-48)_Candida_tropicalis_suppression_subtractive_Library_P	

Para *C. parapsilosis* os resultados foram divergentes em comparação com as outras espécies analisadas. A frequência de regiões de microssatélites nessa espécie era muito baixa, entretanto, o programa não detectou nenhum SSR na sequência EST de *C. parapsilosis*.

Discussão

A análise de microssatélites já é amplamente utilizada não somente como formas de identificação intra^{17,18} e interespecífica¹⁹, mas também para determinação de perfil de sensibilidade a antifúngicos²⁰ e controle de infecção hospitalar²¹.

Apesar de esperada uma probabilidade de ocorrência de microssatélites iguais entre as espécies, por serem do mesmo gênero, os resultados desta pesquisa apontam para uma grande quantidade de diferenças entre as mesmas, com poucas similaridades.

Houve poucas semelhanças nos tipos de arranjos de microssatélites que ocorrem em *C. tropicalis* e *C. albicans* e muita diferença na concentração de bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina e timina, respectivamente A, C, G e T) observadas nos microssatélites.

Em *C. albicans* há grande variedade no número de repetições para os dímeros GA e CT. O mesmo não é observado em *C. tropicalis* para nenhum tipo de microssatélite. A primeira espécie detém, também, maior variedade nos tipos de SSR, sendo observada a ocorrência de dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros.

Não houve ocorrência de um único microssatélite que fosse ordinário em ambas. Nem mesmo dímeros que são conhecidos como comuns na maioria das espécies. Também não foi observada presença de tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros nas sequências de *C. tropicalis*.

Mesmo com poucas semelhanças entre os microssatélites nas sequências analisadas destas duas espécies, há o ponto positivo da possibilidade de utilização de tais SSR apresentados como marcadores

moleculares para diferenciação segura entre amostras, visto que visualmente são muito parecidas.

Traçando-se um comparativo entre *C. albicans* e *C. tropicalis*, nota-se alta concentração das bases nitrogenadas citosina e guanina para a primeira espécie e concentração de adenina para a segunda.

Estudos envolvendo microssatélites realizados com *C. albicans* revelaram uma distribuição genotípica única de *C. albicans* associada à vulvovaginite por *Candida*²² demonstrando que a aplicabilidade dos estudos de microssatélites pode ir além da identificação e promover ferramentas para análise de isolados potencialmente patogênicos.

Microssatélites em *C. tropicalis* também já foram estudados²³ e foi possível utilizar esse marcador para identificação de linhagens dessa espécie.

Embora o estudo não tenha revelado presença de microssatélites em *C. parapsilosis* esse tipo de marcador vem sendo utilizado com sucesso para distinção entre isolados de *C. parapsilosis* como *C. ortopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis stricto sensu*²⁴. Os novos microssatélites são uma valiosa ferramenta para a diferenciação de *C. parapsilosis stricto sensu* e importante na epidemiologia para responder a questões de tensão e determinar vias de transmissão.

A cada dia novas sequências de DNA genômico estão sendo adicionadas aos bancos de dados o que viabiliza ainda mais os estudos de análise *in silico* diminuindo gastos com materiais de consumo, equipamentos e infra-estrutura para as análises convencionais. Além disso, é uma ferramenta que pode ser facilmente manipulada e demandando curto tempo de formação de recursos humanos, com necessidades apenas

de conhecimento básico em genética, biologia molecular e bioinformática.

Conclusão

Os microssatélites estão amplamente distribuídos no genoma de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Ainda que venham de um mesmo gênero, estas espécies provaram que realmente não possuem grandes semelhanças a nível molecular em relação às áreas analisadas, muito embora sejam extremamente parecidas em termos fenotípicos quando analisadas morfológicamente. Desta forma, os marcadores identificados podem ser testados experimentalmente por meio de técnicas moleculares para identificação específica das espécies estudadas. Nas condições testadas, não houve identificação de microssatélites em *C. parapsilosis* entretanto, o aumento constante de genomas inseridos em bases de dados poderá revelar marcadores nesta espécie em estudos posteriores.

Devido à semelhança fenotípica e para evitar que haja dúvidas ou erros na diferenciação bioquímica/morfológica entre isolados, sugere-se fazer uma análise dos mesmos a nível molecular usando marcadores microssatélites. As regiões de microssatélites identificadas e descritas neste trabalho são potenciais candidatos que podem ser empregados em testes de biologia molecular como marcadores moleculares específicos para identificação precisa dos isolados das espécies aqui avaliadas.

Referências

1. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, Calvo B, Cuomo CA, Desjardins CA, Berkow EL, Castanheira M, Magobo RE, Jabeen K, Asghar RJ, Meis JF, Jackson B, Chiller T, Litvintseva AP. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clinical Infectious Diseases*. 2016; 64(2):134-140.
2. Doi, AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. *PLoS one*, 2016,11(1)1-9
3. Chakravarthi S, Haleagrahara N. A comprehensive review of the occurrence and management of systemic Candidiasis as an opportunistic infection. *Microbiology Journal*.2011,1:1-7.
4. Barot N, Vegad M, Soni S; Sharma K, Shah K. *Candida* Infection in Intensive Care Unit Patients at Tertiary Care Hospital. *Healthline, Journal of Indian Association of Preventive and Social Medicine*, 2015,6(1)53-56.
5. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999 *Clinical Infectious Diseases*,2002,35(5):627-630
6. Taylor JS, Durkin JM, Brenden F. The death of a microsatellite: a phylogenetic perspective on microsatellite interruptions. *Molecular Biology and Evolution*, 1999 16(4):567-572.
7. Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, Meyer J, Accoceberry I, François N, Morio F, Desoubeaux G, Chandenier J, Kauffmann-Lacroix C, Hennequin C, Guitard J, Nassif X, M.-E. Bougnoux. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

- systems for the identification of *Candida* species. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014,20(2), 153-158
8. Foongladda S, Mongkol N, Petlum P, Chayakulkeeree M. Multi-probe real-time PCR identification of four common *Candida* species in blood culture broth. *Mycopathologia*, 2014, 177(5-6), 251-261.
 9. Gómez-Molero E, Dekker HL, de Boer AD, de Groot PW. Identification of secreted *Candida* proteins using mass spectrometry. *Candida Species: Methods and Protocols*, 2016, 79-94.
 10. Stefaniuk E, Baraniak A, Fortuna M, Hryniewicz W. Usefulness of CHROMagar *Candida* Medium, Biochemical Methods--API ID32C and VITEK 2 Compact and Two MALDI-TOF MS Systems for *Candida* spp. Identification. *Pol J Microbiol*, 2016,65(1), 111-14.
 11. Tateno Y, Imanishi T, Miyazaki S, Fukani-Kobayashi K, Saitou N, Sugawara H, Gajobori T. DNA databank of Japan (DDBJ) for genome scale research in life science. *Nucleic Acids Research*, 2002, v.30, 27-30.
 12. Morgante M, Olivieri A. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The plant journal*, 1993,3(1),175-182.
 13. Varshney RK, Graner A, Sorrells, ME. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology*, 2005, 23(1), 48-55.
 14. Richard GF, Kerrest A, Dujon B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008,72(4), 686-727.
 15. Costa-Ribeiro MCVD, Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2006, 101(8), 917-921.
 16. Da Maia LC, Palmieri DA, De Souza, VQ, Kopp MM, de Carvalho FIF, Costa de Oliveira A. SSR locator: tool for simple sequence repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation. *International Journal of Plant Genomics*, 2008, 1-9.
 17. Fan X, Xiao M, Liu P, Chen, S, Kong F, Wang H, Zhang L, Hou X, Xu, YC. Novel polymorphic multilocus microsatellite markers to distinguish *Candida tropicalis* isolates. *PloS one*, 2016, 11(11)
 18. Chillemi V, Passo CL, van Diepeningen AD, Rharmitt S, Delfino D, Cascio A, Nnadi NE, Cilo BD, Sampaio P, Tietz H-J, Pemán J, Criseo G, Romeo O, Scordino F. Multilocus microsatellite analysis of European and African *Candida glabrata* isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2016, 35(6), 885-892.
 19. Garcia-Hermoso D, Desnos-Ollivier M, Bretagne S. Typing *Candida* species using microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing. *Candida Species: Methods and Protocols*, 2016,199-214.
 20. Ngouana TK, Drakulovski P, Krasteva D, Toghueo RK, Kouanfack C, Reynes J, Delaporte E, Boyom FF, Mallié M, Bertout, S. Genetic diversity of the Hwp1 gene and HIS3, EF3, CDC3 microsatellites and antifungal susceptibility profiles of *Candida albicans* isolates from Yaounde HIV-infected patients. *Medical mycology*, 2016.
 21. Sabino R, Sampaio P, Veríssimo C, Pais C. Genotipagem de *Candida parapsilosis* com marcadores de DNA microsatélite: uma ferramenta para o estudo e controlo das infeções

- hospitalares. Boletim Epidemiológico Observações, 2014,3, 30-33.
22. Li C, Wang L, Tong H, Ge Y, Mei H, Chen L, Lv G, Liu W. Microsatellite analysis of genotype distribution patterns of *Candida albicans*. Archives of gynecology and obstetrics, 2016, 294(2), 291-297.
23. Wu Y, Zhou HJ, Che J, Li WG, Bian FN, Yu SB, Zhang LJ, Lu J. Multilocus microsatellite markers for molecular typing of *Candida tropicalis* isolates. BMC microbiology, 2014,14(1), 245.
24. Sabino R, Sampaio P, Rosado L, Stevens DA, Clemons KV, Pais C. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates. Journal of clinical microbiology, 2010, 48(5), 1677-1682.