

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS
MARICELMA FRANCELINO FIALHO CÂNDIDO

**AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Candida glabrata* EM HOSPITAL PÚBLICO
TERCIÁRIO**

CAMPO GRANDE
2024

MARICELMA FRANCELINO FIALHO CÂNDIDO

**AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Candida glabrata* EM HOSPITAL PÚBLICO
TERCIÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: I – Aspectos laboratoriais e epidemiológicos das Infecções fúngicas, bacterianas e virais

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia de Souza Carvalho Melhem

CAMPO GRANDE

2024

MARICELMA FRANCELINO FIALHO CÂNDIDO

**AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Candida glabrata* EM HOSPITAL PÚBLICO
TERCIÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina na Universidade Federal de Mato Grosso do sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Campo Grande, MS, 20 de março de 2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes
Faculdade de Medicina– UFMS

Prof. Dr. Ricardo de Souza Cavalcante
Faculdade de Medicina de Botucatu– UNESP

Dr. Thales Domingos Arantes
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

À minha mãe pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Itukó'oviti (Deus) por me conceder a vida, a saúde e a oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço por Sua proteção ao longo deste caminho, e por me conceder força e sabedoria para enfrentar os desafios que surgiram. Agradeço por Sua graça e misericórdia, que sempre estiveram presentes em minha jornada acadêmica.

Agradeço à minha mãe, Celma Francelino Fialho, que foi mãe solteira e me criou sozinha, na qual me espelho e me orgulho pela mãe incrível que foi e é, ao criar-me sozinha. Sua força, amor e dedicação foram fundamentais para moldar a pessoa que sou hoje. Agradeço por todos os sacrifícios que fez para me proporcionar uma vida digna e por sempre acreditar em mim, mesmo nos momentos mais difíceis. Seu exemplo de determinação e coragem sempre será uma inspiração para mim.

Néliton Cândido Francisco, meu noivo, que sempre me apoiou, me dá suporte, enfrenta tudo de mãos dadas comigo, obrigada pelo amor, carinho, paciência no dia a dia. Agradeço por ser meu companheiro de vida, por compartilhar meus sonhos e por estar sempre ao meu lado, nos momentos bons e ruins. Sua presença é meu porto seguro e sua confiança em mim me dá forças para seguir em frente.

Aos meus avós, Celso Fialho e Santa Francelino Fialho, por todos os ensinamentos, conselhos e exemplos de vida que me proporcionaram. Vocês são verdadeiros pilares da nossa família e sempre serão uma fonte de inspiração para mim. Agradeço pelas orações constantes, que sempre me deram forças e esperança nos momentos difíceis. Suas palavras de fé e amor foram um conforto para minha alma

Agradeço de coração às minhas tias, Célia Francelino Fialho e Cibele Francelino Fialho, por serem as minhas bases para estar onde estou. Muito obrigada pelos cuidados diários, por se responsabilizarem por mim quando criança, por dar suporte à minha mãe e terem me criado, e por me terem como filha. Espero poder retribuir todo esse cuidado, amor e carinho e proporcionar a vocês um futuro melhor.

Aos meus tios, César Francelino Fialho, o pioneiro profissional da família, que me inspirou a seguir na área da saúde. Ao Celso Fialho Filho, cuja dedicação em transformar e fornecer uma educação de qualidade para nossa comunidade indígena é uma fonte constante de admiração. Ao Celio Francelino Fialho, atual Cacique da Aldeia Bananal, por sua disponibilidade incansável em ajudar e por sua luta incessante por uma comunidade melhor. Ao Cerise Francelino Fialho, por seu apoio incondicional e por estar ao meu lado desde o ensino fundamental, suas orações foram um conforto para minha alma. E ao Cerizi Francelino Fialho, cuja luta diária pela nossa juventude indígena é uma fonte de inspiração e admiração. Sua dedicação incansável e sua paixão por ajudar os jovens indígenas a alcançarem seu potencial máximo são verdadeiramente inspiradoras.

Ao Professor Dr. Paulo Baltazar, por quem orei, e pedi a Deus para que o trouxesse de volta à vida depois de 30 dias internado devido ao COVID-19, e prometi que ainda o daria muito orgulho. Sua recuperação é um milagre que me enche de gratidão e esperança, e me inspira a honrar a vida e os valores que você representa com cada passo que dou.

Ao meu orientador Dr. Rinaldo Poncio Mendes, por sua orientação, apoio e insights valiosos ao longo deste processo. Seu comprometimento com a excelência acadêmica e sua dedicação ao meu desenvolvimento como pesquisador foram fundamentais para o sucesso deste estudo.

À minha coorientadora Dra. Marcia S. C. Melhem, por ser a minha luz quando eu mais precisei, por sua orientação e contribuições significativas para este trabalho. Sua experiência e conhecimento foram inestimáveis para a conclusão deste estudo.

Dr. James Venturini, pelo apoio, por me receber de braços abertos no Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (LABDIP-UFMS) para a realização da pesquisa.

Dra. Camila Marçon – Laboratório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias – Unidade de Pesquisa Experimental – Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp /

identificação dos isolados de Candida e manutenção em Bio-repositório com repiques periódicos.

Dra. Beatriz Aparecida de Souza Pereira - Laboratório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias – Unidade de Pesquisa Experimental – Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp / identificação dos isolados de Candida e manutenção em Bio-repositório com repiques periódicos.

Dra. Lídia Raquel de Carvalho – realização das análises estatísticas – Seção de Bioestatística do Departamento de Biodiversidade e Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu – Unesp.

À Dra. Juliana Possato Fernandes Takahashi, por coordenar e colaborar com a parte da análise proteômica do presente trabalho.

Às minhas colegas do laboratório de Micologia, em especial, à Bióloga Mestra Francine de Salles Dorneles, pelo carinho, companheirismo, ajuda na realização do projeto e pelos conhecimentos compartilhados. Sua ajuda e apoio foram fundamentais para a conclusão do trabalho. Agradeço também por sua paciência, incentivo e confiança contínua no projeto. Sua amizade foi um verdadeiro presente, e sou imensamente grata por tê-la na minha vida pessoal e profissional. À biomédica Dálity Rodrigues e a Hafsa Gharyb pela excelente e intensa colaboração para a finalização deste trabalho.

Aos colegas do LABDIP, em especial às Técnicas Taynara Nogueira Martins e Kássia Roberta. À Dra. Eliana Alvarenga de Brito, por me receberem com muito carinho, paciência e por todo ensinamento.

Além disso, sou grato pelo apoio financeiro fornecido pela CAPES, que tornou possível a realização deste estudo.

A todos os mencionados e a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este estudo, meu sincero obrigado.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.”

Nelson Mandela

RESUMO

Introdução. A denominação de *Candida*, como gênero de leveduras que apresentam características micológicas específicas, só foi oficializada em 1954. No contexto epidemiológico, são patógenos oportunistas encontrados em diversos ambientes, principalmente no corpo humano, podendo causar desde infecções superficiais até sistêmicas. O presente estudo focalizou a espécie *Candida glabrata*, desde a identificação molecular de isolados obtidos de diferentes espécimes clínicos de pacientes hospitalizados, sua distribuição segundo as unidades hospitalares e a avaliação da sensibilidade / resistência a compostos antifúngicos pertencentes a diferentes grupos farmacológicos. **Pacientes e Métodos.** Foram estudados isolados de vários espécimes clínicos de 80 pacientes atendidos em diferentes unidades de um hospital terciário. A identificação molecular foi feita utilizando-se a técnica MALDITOF MS e a avaliação da sensibilidade a antifúngicos foi realizada usando-se a metodologia preconizada pelo EUCAST e seis antifúngicos – um poliênico (anfotericina B desoxicolato - AmB), dois derivados triazólicos (fluconazol-FLC e voriconazol-VRC) e três equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina). **Resultados.** Todos os isolados foram identificados como *Candida glabrata stricto sensu*. As cepas apresentavam elevada sensibilidade à AmB, às três equinocandinas e ao VRC, mas sensibilidade intermediária ao FLC. A prevalência de resistência à AmB e ao VRC era maior que às equinocandinas. Embora ainda dentro das faixas de sensibilidade, as concentrações inibitórias mínimas de AmB, anidulafungina e micafungina do presente estudo eram maiores que as publicadas pelo EUCAST, tomadas como referência. **Conclusões.** O presente estudo permite concluir que as cepas de *Candida glabrata stricto sensu* predominam nos diferentes espécimes clínicos avaliados nesta região e que não são sensíveis ao fluconazol, motivo pelo qual este composto antifúngico não deve ser primeira escolha no tratamento de pacientes graves. A alta prevalência de concentrações inibitórias mínimas elevadas, embora ainda dentro da faixa de sensibilidade, indicam a necessidade de identificação de todas as amostras em nível de espécie e, para os isolados de *C. glabrata*, a realização rotineira do teste de sensibilidade antifúngica, cujos resultados devem ser divulgados ao corpo clínico.

Palavras-chave: *Candida glabrata*; MALDI-TOF MS; Candidíases. Compostos antifúngicos; Teste de sensibilidade antifúngica.

ABSTRACT

Introduction. The nomenclature of the *Candida* genus was accepted as an official name only in 1954, to accommodate a group of yeasts that presented specific mycological characteristics. In the epidemiological context, they are opportunistic pathogens found in several environments, but mainly in the human body, which can cause since superficial until systemic infections. The present study aimed the *Candda glabrata* – the molecular identification of the isolates obtained from different clinical specimens of hospitalized patients, its distribution as to the hospital units, and the evaluation of the susceptibility/resistance to antifungal compounds belonged to different pharmacological groups. **Patients and Methods.** Isolates from several clinical specimens obtained from 80 patients admitted at different hospital units of a tertiary hospital were studied. The molecular identification was performed using the MALDI-TOF MS, and the evaluation of the susceptibility antifungal testing was carried out according to the EUCAST procedures for six compounds – one polienic (amphotericin B deoxycholate – AmB), two triazole compounds (fluconazole-FLC and voriconazole-VRC), and three equinocandins (caspofungin, micafungin and anidulafungin). **Results.** All the isolates were identified as *Candida glabrata stricto sensu*. These strains presented susceptibility to AmB, to the three equinocandins, and to VRC, but intermediate susceptibility to FLC. The prevalence of resistance to AmB and to VRC was higher than to the equinocandins. Although into the susceptibility range, the minimal inhibitory concentration of AmB, anidulafungin, and micafungin found in the present study was higher than those published by EUCAST, taken as a reference. **Conclusions.** The present study permits to conclude that the strain *Candida glabrata stricto sensu* predominates in the different clinical specimens isolated from patients of this region, and that they are not susceptible to fluconazole. For this reason, this triazole compound cannot be the first choice to treat severe patients from this region. The high prevalence of elevated minimal inhibitory concentrations, although into the susceptibility range, indicates the need not only the identification of the *Candida* spp. at the level of species, but also the evaluation of the susceptibility profile of all the *Candida glabrata* isolates, whose results must be send to the clinical staff.

Keywords: *Candida glabrata*; MALDI-TOF MS; Candidiases; Antifungal compounds; Antifungal susceptibility testing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição de 80 isolados de <i>Candida glabrata</i> stricto sensu segundo a concentração inibitória mínima de equinocandinas.....	30
Figura 2 Distribuição de 80 isolados de <i>Candida glabrata</i> stricto sensu segundo a concentração inibitória mínima de AmB e triazólicos	30
Figura 3 Prevalência de isolados resistentes de <i>Candida glabrata</i> observada em 80 amostras de diferentes espécimes clínicos de pacientes admitidos em um hospital terciário	31
Figura 4 Prevalência de isolados resistentes de <i>Candida glabrata</i> observada em 54 amostras de urina de pacientes admitidos em um hospital terciário. Distribuição segundo composto antifúngico avaliado	32
Figura 5 Prevalência de isolados resistentes de <i>Candida glabrata</i> observada em 15 amostras de sangue de pacientes admitidos em um hospital terciário	33
Figura 6 Prevalência de isolados resistentes de <i>Candida glabrata</i> observada em seis amostras de secreção traqueal de pacientes admitidos em um hospital terciário.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição de 80 pacientes, admitidos no Hospital Estadual Bauru no período 2015 – 2022, com infecção por <i>Candida glabrata</i> , segundo unidade hospitalar em que foram admitidos. Teste do qui-quadrado para uma amostra	22
Tabela 2 Distribuição de 80 amostras de <i>Candida glabrata</i> , isoladas de pacientes atendidos no Hospital Regional Bauru no período 2015 - 2022, segundo espécime clínico. Teste do qui-quadrado para uma amostra Erro! Indicador não definido.	3
Tabela 3 Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC) de antifúngicos frente a 80 isolados clínicos de <i>Candida glabrata</i> , estado de São Paulo, 2015-2023	Erro! Indicador não definido. 9
Tabela 4 Comparação da prevalência de cepas de <i>Candida glabrata stricto sensu</i> resistentes ou não selvagens a diferentes compostos antifúngicos, determinada pela concentração inibitória mínima	31
Tabela 5 Distribuição de 80 isolados clínicos de <i>Candida glabrata stricto sensu</i> , de pacientes admitidos em um hospital terciário, segundo os resultados dos testes de sensibilidade a derivados triazólicos de primeira e segunda geração	34
Tabela 6 Comparação das concentrações inibitórias mínimas (mg/L) de equinocandinas e de derivados triazólicos, determinadas em 80 amostras de <i>Candida glabrata stricto sensu</i> . Teste de Kruskal-Wallis para equinocandinas e de Mann-Whitney para triazólicos	35
Tabela 7 Correlação entre as concentrações inibitórias mínimas de equinocandinas e de derivados triazólicos, determinados em 80 amostras de <i>Candida glabrata stricto sensu</i> . Coeficiente de correlação de Kendall	36
Tabela 8 Comparação entre as concentrações inibitórias mínimas de compostos antifúngicos, determinadas em <i>Candida glabrata stricto sensu</i> , com as observadas em isolados de <i>Candida glabrata</i> , determinadas pelo EUCAST, tomadas como grupo controle. Teste U de Mann-Whitney	36
Tabela 9 Distribuição estratificada dos valores de concentração inibitória mínima (mg/L) da Anfotericina B (AmB), determinados em amostras de <i>Candida glabrata lato sensu</i> . Comparação com achados de EUCAST (2024), com <i>Candida glabrata</i> , tomados como controles* Teste do qui-quadrado, seguido pelo teste de Goodman.	37

Tabela 10 Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (mg/L) da Anidulafungina (ANF), determinados em amostras de <i>Candida glabrata lato sensu</i> . Comparação com achados de EUCAST (2024), com <i>Candida glabrata</i> , tomados como controles* Teste do qui-quadrado, seguido pelo teste de Goodman	32
Tabela 11 Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (mg/L) da Micafungina (MCF), determinados em amostras de <i>Candida glabrata lato sensu</i> . Comparação com achados de EUCAST (2024), com <i>Candida glabrata</i> , tomados como controles* Teste do qui-quadrado, seguido pelo teste de Goodman.....	36
Tabela 12 Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (mg/L) do Fluconazol (FLC), determinados em amostras de <i>Candida glabrata lato sensu</i> . Comparação com achados de EUCAST (2024), com <i>Candida glabrata</i> , tomados como controles* Teste do qui-quadrado, seguido pelo teste de Goodman.....	37
Tabela 13 Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (mg/L) do Voriconazol (VRC), determinados em amostras de <i>Candida glabrata lato sensu</i> . Comparação com achados de EUCAST (2024), com <i>Candida glabrata</i> , tomados como controles* Teste do qui-quadrado, seguido pelo teste de Goodman.....	38
Tabela 14 Concentrações inibitórias mínimas 50% (MIC ₅₀) e 90% (MIC ₉₀) de compostos antifúngicos, avaliadas em 80 amostras de <i>Candida glabrata stricto sensu</i> , isoladas de pacientes admitidos em um hospital terciário. Relação com alguns dados da farmacocinética desses agentes	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

AmB: Anfotericina B

ANF: Anidulafungina

ATCC: *American type culture collection*

CSF: Caspofungina

CTI: Centro de Terapia Intensiva

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FLC: Fluconazol

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

ICS: Infecção de corrente sanguínea

MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry

MIC: *Minimal Inhibitory Concentration*, concentração inibitória mínima

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

TSA: Teste de sensibilidade antifúngica

VRC: Voriconazol

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 ASPECTOS GERAIS DO GÊNERO <i>CANDIDA</i> E DAS CANDIDÍASES	14
1.2 COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO POR <i>CANDIDA</i> SPP.	15
1.3 <i>CANDIDA GLABRATA</i>	18
1.4 <i>CANDIDA GLABRATA</i> – COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 PACIENTES	22
3.2 AMOSTRAS	22
3.3 ANÁLISE PROTEÔMICO	23
3.4 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA - TSA.....	24
3.5 CÁLCULO DA AMOSTRA	27
3.6 GRUPO CONTROLE.....	27
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
3.8 ASPECTOS ÉTICOS	28
4. RESULTADOS.....	28
4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR <i>MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION-TIME OF FLIGHT MASS ESPECTROMETRY (MALDI-TOF MS)</i>	28
4.2 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE A COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS	28
4.3 COMPARAÇÃO DE VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA 34	
4.4 CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS DO MESMO GRUPO FARMACOLÓGICO.....	35
4.5 COMPARAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS – GRUPO EXPERIMENTAL E GRUPO CONTROLE	36
4.6 CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS 50% E 90%	42
5. DISCUSSÃO	43

6. CONCLUSÕES	47
7. ANEXOS	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do gênero *Candida* e das candidíases

A primeira citação de candidíase foi feita por Hipócrates, em seu livro *Epidemics*, que descreveu lesão oral do tipo afta em dois pacientes com grave doença condição predisponente. Rosen von Rosenstein (1771) e Underwood (1784) registraram a presença de afta em crianças, registrando-a em textos pediátricos. A seguir, Véron (1835) relatou o caso de um recém-nascido com candidíase esofágica e sugeriu que a infecção tinha sido adquirida pela passagem na vagina. O agente causador da afta foi identificado por Langenbeck (1839), em raspado de lesão por afta em um paciente com tifo, embora o tenha considerado o agente da condição predisponente. A natureza dimórfica desses fungos foi demonstrada por Grawitz, em 1877, que descreveu a forma de levedura, a micelial e os clamidósporos. Várias publicações demonstraram que o fungo causador da afta também causava infecções sistêmicas

A denominação *Candida* foi introduzida por Berkhout (1923) para um grupo de leveduras ascospóridas que estavam incluídas no gênero *Monilia*, sugerido por Zopf em 1890. A denominação proposta permitia a separação dessas leveduras de certos fungos filamentosos isolados de frutas e folhas podres, que pertenciam ao gênero *Monilia*. Langeron & Guerra (1938), Diddens & Lodder (1942) e Lodder & Kreger-Van Rij (1952) apoiaram a denominação sugerida. Sua oficialização, no entanto, só ocorreu no VIII *Botanical Congress*, realizado em Paris, em 1954 (LACAZ, 1980; SEGAL, 1998).

Aspectos micológicos. *Candida* são leveduras cujas células são globosas ou ovoides, cilíndricas ou alongadas, normalmente não ogivais, apiculadas ou em forma de frasco, cuja reprodução se dá por brotamento multipolar. A formação de **pseudomicélio** é encontrada na maior parte das espécies, que é diferenciado em **pseudo-hifa** e blastoconídeos ou blastósporos. Micélio verdadeiro e clamidósporos podem ser formados (LACAZ, 1980; ALBY&BENNETT, 2010)

Aspectos epidemiológicos. Leveduras do gênero *Candida* raramente são isoladas de animais de sangue frio, da água e, quando presente no solo, estão relacionadas a excrementos humanos ou de animais. Podem ser isoladas de insetos, alimentos em fermentação, polpa de madeiras, bebidas alcoólicas e

leveduras de panificação. Algumas espécies podem viver de forma comensal no organismo do homem e de animais. No homem colonizam o trato gastrintestinal, orofaringe, dobras da pele, vagina, urina e fezes (LACAZ, 1980).

As leveduras deste gênero se comportam como agentes oportunistas, cuja patogenicidade está condicionada a fatores do hospedeiro, podendo desenvolver quadros clínicos variados, desde infecções superficiais até sistêmicas. Dessa forma, as candidíases podem acometer pele, unhas, mucosas oral, esofágica e vaginal e, em sua forma mais grave, a corrente sanguínea, provocando *sepse* – denominada candidemia (KOJIC, 2004). É importante registrar que as manifestações clínicas de candidíase diferem segundo o tipo de fator predisponente – pacientes com neutropenia apresentam disseminação hematogênica e candidíase hepato-esplênica, enquanto doentes com depressão da resposta imunocelular revelam infecção de membranas mucosas, com candidíase oral e candidíase esofágica, esta última sendo definidora de AIDS (Acquired immune deficiency syndrome) em infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).

1.2 Colonização e infecção por *Candida* spp.

O gênero *Candida* spp. faz parte da microbiota normal da boca de 25% a 50% dos indivíduos saudáveis, condição esta denominada colonização. *Candida albicans* é a espécie mais prevalente entre as colonizadoras, mas outras espécies de *Candida* também têm sido isoladas (ZIRKEL et al., 2012).

Assim como alguns outros microrganismos, várias espécies do gênero *Candida* podem colonizar mucosa, pele e trato digestivo, de modo transitório ou durante longos períodos. No entanto, deve-se sugerir alteração da microbiota quando presentes em diferentes sítios e quando determinado fungo for cultivado repetidamente do mesmo tipo de amostra clínica. O desenvolvimento demasiado de *Candida* spp., nestes sítios de colonização, pode facilitar sua invasão no tecido, principalmente em hospedeiros com condições predisponentes (GUINEA, 2014).

O gênero *Candida* é constituído por aproximadamente 200 espécies, 20 das quais estão relacionadas a infecções em seres humanos, entre as quais se destacam *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. No entanto, têm sido descritas espécies chamadas

emergentes, tal como *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspícua* e, em passado recente, *C. auris* (REX et al., 2008).

Como o gênero *Candida* faz parte da microbiota humana, ao causar doença ele se comporta como um patógeno oportunista, isto é, depende de um ou mais fatores de imunossupressão (PFALLER et al., 2010).

C. albicans é a espécie isolada com maior frequência em todo o mundo, como colonizadora e como causadora de infecções superficiais ou invasivas, em diferentes sítios anatômicos. Com potencial patogênico bastante conhecido, apresenta, como principais fatores de patogenicidade e virulência, capacidade de aderência a diferentes tipos de mucosa e epitélio, dimorfismo - com produção de pseudo-hifas que auxiliam na invasão tissular, termotolerância e produção de exoenzimas, como proteinase e fosfolipase (REX et al., 2008). Esta espécie revela-se naturalmente sensível a todas as drogas de uso sistêmico, porém casos de resistência adquirida a azólicos têm sido descritos, principalmente, em indivíduos que foram expostos por tempo prolongado a estes antifúngicos. A resistência à anfotericina B (AmB) é rara (NCCLS, 2002; NUCCI et al., 2013)

C. parapsilosis é comensal da pele humana e menos adaptada a superfícies mucosas, está associada à infecção de corrente sanguínea (ICS) por manipulação do paciente, sendo bem conhecida por causar infecções em crianças e neonatos. Esta espécie está, quase sempre, relacionada à presença de cateteres e sua grande habilidade em formar biofilmes favorece sua patogênese.⁵ *C. parapsilosis*, que era inicialmente considerada espécie única foi, desde os anos 90, considerada um complexo englobando três espécies: *C. parapsilosis (strictu sensu)*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* (EUCAST, 2017; ROMEO et al., 2009).

C. tropicalis pode se comportar como agente oportunista quando o hospedeiro se encontra neutropênico, quando há supressão da microbiota bacteriana pelo uso de antimicrobianos e na vigência de danos na mucosa gastrointestinal. Essa espécie é responsável por candidemias em pacientes com neoplasia, sendo mais frequentes em leucemias do que em tumores sólidos (RUIZ et al., 2005).

A espécie *C. glabrata*, por sua vez, também se encontra muito relacionada a outras duas espécies fenotipicamente semelhantes (*C.*

bracarensis e *C. nivariensis*), individualizadas apenas por análise molecular do DNA e assimilação da trealose. *C. nivariensis* tem se revelado multirresistente a antifúngicos, enquanto *C. bracarensis* tem patogenicidade e resistência a antifúngicos pouco conhecidos (COLOMBO et al., 2006; HINRICHSEN et al., 2008).

A epidemiologia das infecções por *C. glabrata* e *C. krusei* é diferente das demais espécies. Sua infecção ocorre em geral após uso profilático de antifúngicos, como por exemplo, o fluconazol (FLC) em pacientes com doença hematológica e não está associada ao uso de cateter e à antibioticoterapia prévia. As infecções por *C. krusei* apresentam a maior taxa de letalidade, seguida das causadas por *C. glabrata* (WILLE et al., 2013), e revela resistência natural ao FLC, o que talvez explique sua maior incidência em pacientes neutropênicos expostos a este antifúngico RUIZ et al., 2005). *C. glabrata* pode adquirir resistência ao longo da exposição ao FLC, (WILLE et al., 2013), o que pode justificar um aumento de seus índices de colonização ou de infecção observado em diferentes grupos de pacientes submetidos à exposição prolongada a este antifúngico (WILLE et al., 2013), Menor sensibilidade à AmB também vem sendo documentada nesta espécie (MORETTI et al., 2013).

Importante ressaltar que, apesar da taxonomia de muitos fungos de interesse médico ter sido atualizada, em publicação recente¹⁸ na qual *C. glabrata* e *C. krusei* foram reclassificadas como *Nakaseomyces glabrata* e *Pichia kudriavzevii*, respectivamente, os nomes anteriores dessas espécies foram mantidos neste projeto.

C. guilliermondii faz parte da microbiota normal da pele e das superfícies mucosas humanas, sendo recuperada com maior frequência de pacientes imunocomprometidos. É uma espécie com potencial de causar ICS, particularmente, em pacientes com neoplasia hematológica e internados em unidades de terapia intensiva (COLOMBO et al., 2013). Estas infecções apresentam epidemiologia similar à das causadas por *C. parapsilosis*, pois a invasão sanguínea por estas espécies guarda íntima relação com a presença de cateter (COLOMBO et al., 2013).

Recentemente foi identificado *Candida auris*, que se caracteriza por ser multidroga-resistente, comprometer pacientes imunossuprimidos e poder ser erroneamente identificada como *C. famata*, *C. haemulonii*, *C. sake*, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Rhodotorula glutinis*, por técnicas utilizadas em

laboratórios clínicos, tais como Vitek2®, API®, AuxaColor® e, inclusive, o Matrixassisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDITOF MS). Além disso, *C. auris* geralmente é resistente ao FLC e voriconazol (VRC) e, em alguns, casos à AmB e às equinocandinas, apresentando, assim, elevada taxa de letalidade (NEUFELD et al., 2015; GASPAR et al., 2015).

1.3 *Candida glabrata*

Candida glabrata foi inicialmente denominada *Cryptococcus glabratus* (Anderson, 1917) e *Torulopsis glabrata* (Anderson) Lodder et de Vries (1938) (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

C. glabrata é uma levedura haploide e produz colônias de cor creme, lisas e brilhantes, com pseudohifas ou fímbrias miceliais em ágar. As células são ovoides, com 2,5 x 4,6µm, e podem formar pequenos aglomerados, também, ovoides (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Apesar de sua incapacidade de se transformar de levedura a hifa ou secretar proteases, *C. glabrata* revela vários fatores de virulência, inclusive a produção de biofilmes (RODRIGUES et al., 2017; DENFERT&JANBON, 2015) [PRISTOV; GHANNOUM, 2019].

Desde o final do século XX tem se observado um progressivo aumento da incidência de infecções fúngicas invasivas, com predomínio das causadas pelo gênero *Candida*, em especial *C. albicans* (FRÍAS-DE-LEÓN et al., 2021). No entanto, o isolamento de *C. glabrata* foi e continua sendo cada vez mais frequente, em pacientes com *diabetes mellitus*, tumores sólidos, desnutrição, recém-nascidos e, por vezes, neoplasias hematológicas (FRÍAS-DE-LEÓN et al., 2021; BITAR et al., 2014; HAZEN, 1995).

As infecções por *Candida* spp. causam grande impacto em saúde pública por sua incidência em pacientes hospitalizados, em que *C. glabrata* foi responsável por 6,4% das infecções (BERNHARDT; KNOKE, 1997). A incidência de *C. glabrata* aumentou significativamente como agente de infecções em seres humanos, chegando a ser o segundo ou terceiro patógeno em casos de candidíases, principalmente em ambientes hospitalares. *C. glabrata* é com frequência responsável por resistência em pacientes hospitalizados (LEE et al., 2018) e apresenta maior incidência em adultos que em crianças e recém-

nascidos (SILVA et al., 2012). Além disso, em relação a outras espécies, que não *Candida albicans*, a mortalidade associada à *C. glabrata* é relativamente elevada – em torno de 50% em pacientes com câncer e 100% quando em complicações de transplante de medula óssea (LOCKHART et al., 2009; MIRANDA-ZAPICO et al., 2011).

O complexo *C. glabrata* é constituído pelas espécies patogênicas *Candida glabrata stricto sensu*, *C. bracarensis* e *C. nivariensis* (ALCOBA-FLÓREZ et al., 2005; CORREIA et al., 2006; TURNER&BUTLER, 2014). No entanto, estudo de 1595 isolados procedentes de todo o mundo revelou que apenas 1 (0,06%) era *C. nivariensis* e 2 (0,13%) eram *C. bracariensis* (LOCKHART et al., 2009). Além disso, estudo realizado com 16 cepas de *C. nivariensis*, isoladas de 12 hospitais do Reino Unido em dois anos, revelou menor sensibilidade a itraconazol, fluconazol e voriconazol (BORMAN et al., 2008). Esses dois estudos demonstram a baixa prevalência de *C. bracariensis* e de *C. nivariensis*, mas a menor sensibilidade desta última espécie a compostos triazólicos.

1.4 *Candida glabrata* – Compostos antifúngicos e mecanismos de resistência.

Compostos antifúngicos de três grupos farmacológicos têm sido utilizados no tratamento de infecções por *C. glabrata* – anfotericina B desoxicolato (AmB) e seus derivados lipídicos, derivados triazólicos – fluconazol (FLC) e voriconazol (VRC) e equinocandinas (EQCs) – caspofungina (CSF), anidulafungina (ANF) e micafungina (MCF).

A ação antifúngica da AmB depende de sua ligação à molécula do ergosterol, na membrana celular do fungo, constituindo o complexo polieno-esterol, que leva à formação de poros ou canais que alteram sua permeabilidade. (PALACIOS&SERRANO, 1978; ELLIS, 2002). Observa-se um aumento do influxo de prótons, que compromete a captação de nutrientes e que coincide com o efluxo de potássio. Uma adenosina trifosfatase translocadora de prótons, caracterizada na membrana citoplasmática de fungos, parece estar ligada à ação antifúngica da AmB (BOSSCHE et al., 1988). Os mecanismos de resistência se relacionam a mutações nas proteínas *ERG6* e *ERG11*, que alteram a enzima esterol 14- α -demetilase, levando à redução do conteúdo de ergosterol da

membrana celular e substituição do ergosterol por outros esteróis (HULL et al., 2012; VANDEPUTTE et al., 2008; FRÍAS-DE-LEÓN et al., 2021).

Os derivados triazólicos inibem a enzima 14- α -esterol demetilase, responsável pela biossíntese do ergosterol, importante componente da membrana celular. Essa ação leva à inibição do crescimento fúngico pela alteração da estrutura e da função da membrana celular (PRISTOV&GHANNOUM, 2019). Três são os principais mecanismos de resistência de fungos do gênero *Candida* aos triazólicos: a) desenvolvimento de bombas de efluxo, que eliminam os triazólicos, diminuindo sua atividade inibidora enzimática e suas consequências; as bombas de efluxo são o resultado da mutação dos genes *CDR1/CDR2* e *MDR1*, e constituem o principal mecanismo de resistência da *C. glabrata* aos triazólicos; b) alteração do sítio enzimático de ligação de azólicos à *C. glabrata*; esta alteração é codificada pelo gene *ERG11*; este mecanismo tem pequena participação no desenvolvimento de resistência de *C. glabrata* aos triazólicos; c) desenvolvimento de outra via metabólica (*bypass*) para produção de ergosterol, como resultado de mutações (SPAMPINATO&LEONARDI, 2013).

As equinocandinas – EQCs são lipopeptídeos que inibem a β -(1,3)-D-glucano sintase, responsável pela síntese de β -(1,3)-glucana que, juntamente com a quitina, constituem o esqueleto básico da parede celular fúngica, responsável pela integridade estrutural e por sua forma (LATGÉ, 2007), e que não são encontradas nas células humanas. A β -(1,3) D-glucano sintase é um complexo protéico formado pelo menos por sub-unidades catalíticas (Fksp) e um componente amplamente distribuído (Rho1). As EQCs se ligam à Fksp, que é codificada pelos genes *FKS1* e *FKS2* (KATIYAR et al., 2006; PARK et al., 2005). Assim, a mutação em duas regiões altamente conservadas de genes *FKS* levam à redução da sensibilidade de *C. glabrata* às EQCs – substituição de aminoácidos em Fksp1p (D632E) e em Fksp2p (F659V (CLEARY et al., 2008; KATIYAR et al., 2006; THOMPSON et al., 2008) [WALKER et al., 2010; GARCIA-EFFRON et al., 2009].

O uso intensivo do FLC em pacientes com diagnóstico presuntivo de candidíase, ou confirmado apenas em nível de espécie, assim como sua utilização profilática, levou à emergência de isolados resistentes em *C. glabrata*.

Sabe-se que, especificamente no caso desta espécie, a exposição prévia a azólicos é decisiva para sua proliferação(WILLE et al., 2013).

O interesse pelo estudo de *C. glabrata* reside no fato de ser um patógeno emergente, com a particularidade de que um número considerável de cepas pode ser resistente *in vitro* a antifúngicos triazólicos (MIRANDA-ZAPICO et al., 2011). Além disso, mostrou estar associada a internações hospitalares mais longas, com custos mais elevados do que nos casos de infecção por *C. albicans* (BERNHARDT; KNOKE, 1997). Por fim, os achados de que a incidência de infecção por espécies de *Candida* e de sua sensibilidade a compostos antifúngicos apresenta variações regionais (MARÇON, 2023), e poucos estudos identificaram em nível molecular ou por análise proteômica os isolados avaliados, reforçam a proposta do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar as espécies de *C. glabrata* isoladas de diferentes amostras clínicas de pacientes internados em um hospital de atendimento terciário.

2.2 Objetivos específicos

Este estudo teve como objetivos específicos:

- I) Investigar a prevalência de espécies crípticas nas diferentes amostras clínicas de que foram isoladas;
- II) Avaliar a sensibilidade dos isolados a compostos antifúngicos de diferentes grupos farmacológicos - fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina, anidulafungina e anfotericina B;
- III) Comparar a resistência a compostos antifúngicos de cada isolado, em função do espécime clínico do qual foi obtido.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Foram estudadas 80 isolados de *Candida glabrata* obtidas de pacientes do Hospital Estadual de Bauru, localizado na Região Centro-Oeste do Estado de São Paulo, Brasil.

Os pacientes se encontravam em diferentes unidades do Hospital, tais como de enfermarias (30 pacientes; 37,5%) e do Centro de Terapia Intensiva da Unidade de Emergência – CTI (12; 15,0%), como revela a tabela 1. A avaliação estatística revelou predomínio de amostras procedentes das enfermarias (tabela 1).

Tabela 1. Distribuição de 80 pacientes, admitidos no Hospital Estadual Bauru no período 2015 – 2022, com infecção por *Candida glabrata*, segundo unidade hospitalar em que foram admitidos. Teste do qui-quadrado para uma amostra.

Unidade hospitalar	Pacientes (número)	Pacientes (porcentagem)
Enfermarias	30	37,50
CTI da Unidade de Emergência	12	15,00
Unidade de Emergência	08	10,00
UTI do adulto	09	11,25
UTI da Unidade Coronariana	06	7,50
Clínica coronariana	04	5,00
UTI de queimados	04	5,00
Unidade de Quimioterapia	03	3,75
Ambulatório	01	1,25
Acolhimento	02	2,50
Pediatria	01	1,25
Total	80	100,0%

CTI – Centro de Terapia Intensiva; UTI – Unidade de Terapia Intensiva

Teste do qui-quadrado para uma amostra, para as cinco primeiras unidades e a soma das demais: $\chi^2 = 28,72$ $p < 0.001$

3.2 Amostras

As amostras, obtidas durante o período de 2015 a 2022, foram principalmente: urina (54 isolados, 67,5%), sangue (15; 18,8%) e secreção

traqueal 7,5%), como revela a tabela 2. A avaliação estatística revela que as amostras de urina predominaram (tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição de 80 amostras de *Candida glabrata*, isoladas de pacientes atendidos no Hospital Regional Bauru no período 2015 - 2022, segundo espécime clínico. Teste do qui-quadrado para uma amostra.

Espécime clínico	Pacientes (número)	Pacientes (porcentagem)
Urina	54	67,50
Sangue	15	18,75
Secreção traqueal	06	7,50
Abscesso intracavitário	01	1,25
Abscesso renal	01	1,25
Lavado bronco-alveolar	01	1,25
Aspirado de drenagem biliar	01	1,25
Aspirado de incisão cirúrgica	01	1,25
Total	80	100,00

$\chi^2 = 80,1$ $p < 0,001$

As amostras foram inoculadas no meio cromogênico CHROMagar *Candida*® (CHROMagar Microbiology, Difco, USA) e, a seguir, identificadas por método fenotípico de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio no sistema automatizado Vitek2® (bioMérieux, França) e armazenadas em freezer a -80°C.

Recuperação das culturas. Os isolados identificados como do complexo de espécies *C. glabrata* foram descongeladas e repicadas no meio cromogênico CHROMagar *Candida* (CHROMagar Microbiology, Difco, USA). As placas foram incubadas à temperatura de 35°C e as leituras realizadas após 24 e 48h de incubação. As colônias de leveduras puras foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura Sabouraud Dextrose (Oxoid, EUA).

3.3 Análise proteômico

A identificação foi realizada por método proteômico - Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz Acoplada a Espectrometria de Massa por Tempo de Voo (MALDI-TOF MS), sob supervisão da Dra. Juliana Possatto Fernandes Takahashi. Os isolados foram cultivados em ágar Sabouraud com cloranfenicol, seguido por isolamento em CHROMagar *Candida*® (Difco, USA) para purificação e novamente semeado em ágar Sabouraud com Cloranfenicol. Com o tempo

máximo de crescimento de 24 h, foi utilizado o método de extração em microtubo, com ácido fórmico e acetonitrila, recomendado para leveduras pelo fabricante do equipamento Microflex® (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemanha) (FRASER et al., 2015). Algumas colônias de cada isolado foram transferidas para um microtubo, contendo 1 mL de água purificada estéril, e a suspensão foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto. A suspensão foi centrifugada por 2 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi, então, cuidadosamente removido. Em seguida, foram adicionados 300 µL de água purificada estéril e 900 µL de etanol absoluto ao microtubo, homogeneizado em vórtex por 1 minuto e centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm, novamente. Todo sobrenadante foi removido para centrifugação do sedimento, por mais 2 minutos a 13.000 rpm, no intuito de remoção de todo resíduo de etanol. O sedimento foi desidratado seco em termo bloco a 37 °C por 5 a 10 minutos e adicionado de 10 a 100 µL de ácido fórmico a 70%, proporcionalmente, ao seu tamanho. Após homogeneização em vórtex por 1 minuto, o volume equivalente de acetonitrila foi adicionado e a amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e centrifugada novamente por 2 minutos a 13.000 rpm. Finalmente, foi pipetado 1 µL do sobrenadante sobre um dos 96 círculos (spot) marcados em uma placa metálica, em duplicada. As amostras, assim depositadas, após estarem secas em ar ambiente, foram adicionadas de 1 µL de matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico). Após nova secagem, a placa foi introduzida no equipamento MALDI-TOF MS para aquisição e análise (software Biotyper RTC 3.0) do espectro proteico (CLARK et al., 2013). Os resultados foram interpretados conforme pontuação obtida e segundo as seguintes recomendações do fabricante: 2.300 a 3.000 - identificação de espécie altamente provável; 2.000 a 2.299 - identificação segura de gênero e identificação provável de espécie; 1.700 a 1.999 - identificação provável de gênero; 0.000 a 1.699 - identificação não confiável (MARKLEIN et al., 2009; WOOLSTON et al., 2011).

3.4 Teste de sensibilidade antifúngica - TSA

Seis compostos antifúngicos foram adquiridos em forma de pó para análise (p.a.) (Sigma, USA) para determinação da sua concentração inibitória

mínima (MIC, mg/L) frente aos isolados de *C. glabrata*. Foram avaliados: AmB, equinocandinas – CSF, MCF e ANF, e derivados triazólicos - FLC e VRC. O TSA foi realizado pelo método de microdiluição em caldo, segundo as especificações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) no documento E.DEF 7.3.2 (Disponível em: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST E Def 7.3.2 Yeast testing definitive revised 2020.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7.3.2_Yeast_testing_definitive_revised_2020.pdf)). A solução-mãe de FCZ na concentração de 5120 mg/L foi preparada em água destilada e os demais antifúngicos na concentração de 1600 mg/L em DMSO (dimetilsulfóxido de sódio). As soluções de uso, diluídas à razão 2 em meio líquido RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Sigma, St. Louis, EUA), foram preparadas de modo que, após a adição do inóculo, apresentassem 10 concentrações, entre 0,0008 mL/L a 4 mL/L, com exceção de FLC (ao qual *C. glabrata* apresenta resistência adquirida) que foi analisado em 12 concentrações: 0,008 mg/L a 32 mg/L, atendendo à orientação da versão atualizada do documento europeu de referência.

Cada antifúngico foi distribuído, em alíquotas de 100 µL, em placa de microtitulação, desde a coluna 2 até a 11, correspondendo cada coluna a uma concentração. Para os testes, 100 µL de inóculo (1 a 5×10^5 ufc/mL) foi adicionado às placas, ficando nos poços contendo antifúngico, diluído à metade de sua concentração ($0,5$ a $2,5 \times 10^5$ ufc/mL). Em cada placa foram colocados inóculos de 6 leveduras, sendo as duas últimas linhas da placa (G e H) destinadas às cepas-padrão *C. krusei* ATCC (*American type culture collection*) 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, para controle interno de qualidade do teste. O controle de esterilidade do teste, preparado em toda a coluna 1, foi feito com o meio RPMI, sem antifúngico e sem inóculo. O controle de crescimento, denominado de controle positivo, foi colocado na coluna 12, sendo preparado com 100 µL de RPMI e 100 µL de cada inóculo. As placas foram tampadas e incubadas a 35°C, em estufa incubadora.

A leitura de turbidez, resultante do crescimento das cepas, foi realizada às 24h e quando o valor da densidade ótica (D.O.) foi $\geq 0,3$; caso contrário, nova leitura foi feita até 48h, com exceção dos testes com equinocandinas, sempre obtido às 24h. Para a leitura de D.O. foi utilizado filtro de 492 nm, sendo os

valores registrados em impressora, para posterior compilação e análise de resultados. A coluna 1, controle de esterilidade serviu como “branco” do espectrofotômetro. A MIC foi determinada no poço contendo a menor concentração que inibiu o crescimento completo (*inhibition concentration- IC100*) do inóculo nos testes com AmB. Nos testes com azóis e equinocandinas a MIC foi determinada no poço com inibição de 50% (IC50), ou mais, do crescimento em relação ao controle positivo.

Como forma de análise dos resultados, foram empregados os parâmetros de MIC₅₀ e MIC₉₀, definidos, respectivamente, como a concentração de cada fármaco necessária para inibir 50% e 90% dos isolados. Os cálculos e confecção de figuras foram realizados com Microsoft Office Excel. 2007.

Para interpretação da sensibilidade de acordo com MIC, foram utilizados valores de pontos de corte clínicos (*breakpoints*) e, na sua ausência, foram empregados pontos de corte epidemiológicos (ECOFFs). Os *breakpoints* e os ECOFFs adotados para o estudo foram recomendados pelo comitê EUCAST (EUCAST, 2023. Disponível em: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/EUCAST_BP_ECOFF_v_4.0.pdf). Para CSF, não há pontos de corte definidos e seguiu-se a recomendação de EUCAST em considerar sensíveis os isolados sensíveis à ANF (EUCAST, 2020. Disponível em: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/EUCAST_BP_ECOFF_v2.0_20-09-24.pdf).

Os *breakpoints* utilizados na interpretação dos resultados se encontram no quadro 1.

Quadro 1 – *Breakpoints* clínicos e epidemiológico de compostos antifúngicos para *Candida glabrata*, segundo as especificações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), 2023.

Composto antifúngico	Sensível	Intermediário	Resistente
Anfotericina B	≤1	...	>1
Anidulafungina	≤0,06	...	>0,06
Micafungina	≤0,03	...	>0,03
Caspofungina			
Fluconazol	≤0,001	>0,001 a ≤16	>16

Composto antifúngico	Selvagem	...	Não selvagem
Voriconazol*	≤1	...	>1

... não aplicável * *breakpoint* epidemiológico

3.5 Cálculo da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi feito para estudo que compara dois testes na mesma amostra e que considera o erro tipo α de 0,05, o tipo β de 0,20, a razão entre os dados discrepantes igual a 2,0 e a menor proporção entre os dados discordantes igual a 0,10. O cálculo revelou que a amostra deve ser de pelo menos 48 isolados (JEKEL et al., 2005).

3.6 Grupo controle

Os resultados de MIC frente aos isolados foram comparados com os publicados pelo EUCAST [EUCAST MIC and zone diameter distributions and ECOFFs. Disponível em:

https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecies%5D=126&search%5Bdisk_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50 [Acesso em 12/12/2024].

3.7 Análise estatística

A comparação de frequências na mesma amostra foi feita pelo teste do qui-quadrado para uma amostra. A comparação de frequências para amostras independentes foi feita pelo teste do qui-quadrado ou pela prova exata de Fisher. Quando mais de duas frequências foram comparadas utilizou-se o teste do qui-quadrado, seguido pelo teste de Goodman. A comparação de mais de duas frequências na mesma amostra foi feita pelo teste Q de Cochran. As diferenças foram consideradas significantes quando o valor de p foi igual ou menor que 0,05. Os testes de correlação foram feitos pela avaliação do coeficiente de correlação de Kendall. Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa SPSS versão 9.4, com exceção do teste de Goodman, que foi feito em programa padronização na Seção de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP.

3.8 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP, CAAE 69763623.7.0000.5411.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação dos isolados por *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS)

O método MALDI-TOF MS revelou que todos os isolados foram identificados como *Candida glabrata stricto sensu*, com escores entre 2,0 e 2,4.

4.2 Avaliação da sensibilidade a compostos antifúngicos

Todos os isolados submetidos à avaliação da atividade antifúngica dos seis antifúngicos. Os resultados se encontram na tabela 3 e nas figuras 1 e 2.

Tabela 3. Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC) de antifúngicos frente a 80 isolados clínicos de *Candida glabrata*, estado de São Paulo, 2015-2023.

Antifúngico	Número de isolados na MIC (mg/L):												
	0,008	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
Micafungina	5	5	70	0	0	0	0	0	0	0	na	na	na
Anidulafungina	0	0	36	43	0	0	0	1	0	0	na	na	na
Caspofungina*	11	11	56	2	0	0	0	0	0	0	na	na	na
Fluconazol	0	4	0	3	6	8	13	15	10	11	6	0	4
Voriconazol	0	10	3	2	10	14	25	9	3	4	na	na	na
Anfotericina B	na	0	0	0	1	6	16	48	4	5	na	na	na

na - não avaliada; * para CSF não há pontos de corte e isolados sensíveis à ANF foram considerados sensíveis à CSF.

Sensibilidade:

selvagem
não selvagem
sensível
sensibilidade intermediária
resistente

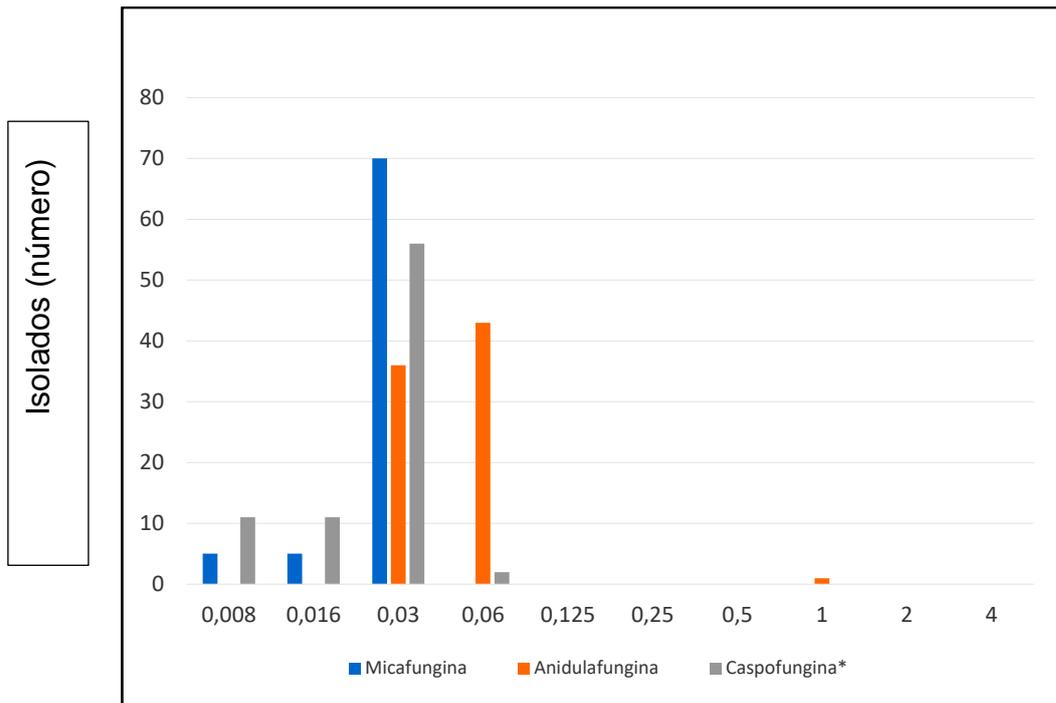


Figura 1 – Distribuição de 80 isolados de *Candida glabrata stricto sensu* segundo a concentração inibitória mínima de três equinocandinas.

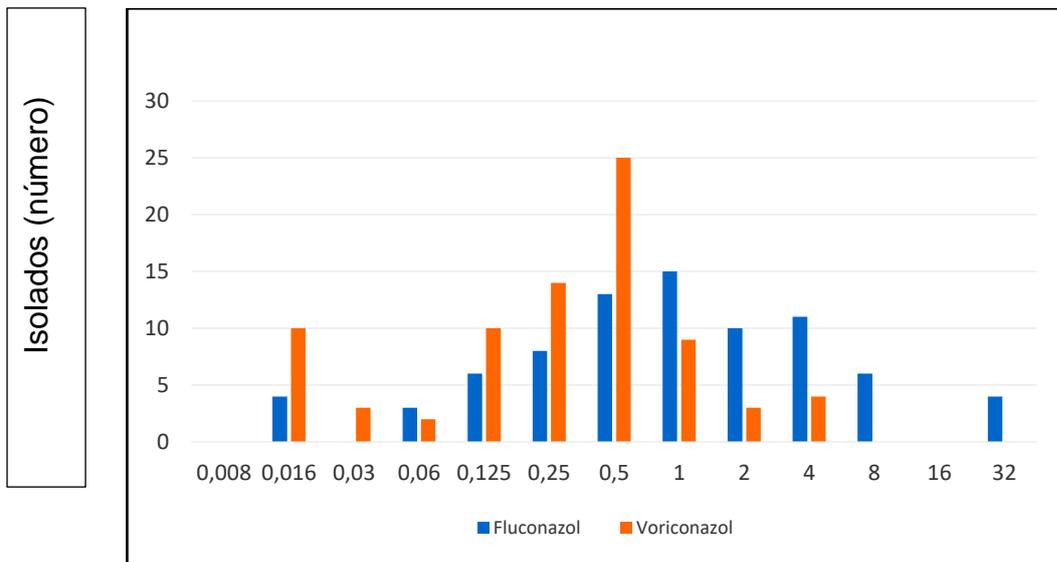


Figura 2 - Distribuição de 80 isolados de *Candida glabrata stricto sensu* segundo a concentração inibitória mínima de dois triazólicos.

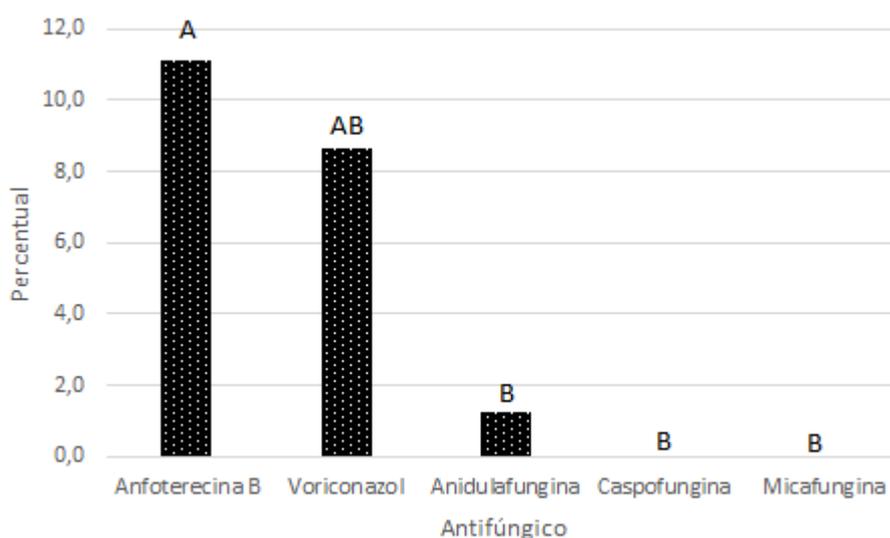
A avaliação dos 80 isolados revelou que a prevalência de amostras resistentes ou não selvagens era maior para AmB que para as equinocandinas, cabendo ao VRC uma posição intermediária (Tabela 4, Figura 3).

Tabela 4. Comparação da prevalência de cepas de *Candida glabrata stricto sensu* resistentes ou não selvagens a diferentes compostos antifúngicos, determinada pela concentração inibitória mínima. Teste Q de Cochran.

Espécime clínico	AmB	CSP	MCF	ANF	VRC	Valor de <i>p</i>
Todos (n=80)*	9 (11,3)a	- b	- b	1 (1,3) b	7 (8,8)ab	<0,0001
Urina (n=54)	6 (16,7)a	-b	-b	1 (2,8)b	4 (11,1)ab	0,0002
Sangue (n=15)	1 (6,7)	-	-	-	2 (13,3)	0,06
Secreção traqueal (n=6)	1 (16,7)	-	-	-	-	0,31

*Urina, sangue, secreção traqueal, abscesso intra-cavitário, abscesso renal, lavado bronco-alveolar, aspirado de drenagem biliar, aspirado de incisão cirúrgica; -: zero; anfotericina B (AmB); caspofungina (CSP); micafungina (MCF); anidulafungina (ANF); voriconazol (VRC).

Letras minúsculas comparam prevalências na mesma linha; prevalências seguidas da mesma letra ou não acompanhadas de letras não diferem entre si ($p>0,05$), enquanto frequências seguidas de letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p\leq 0,05$)

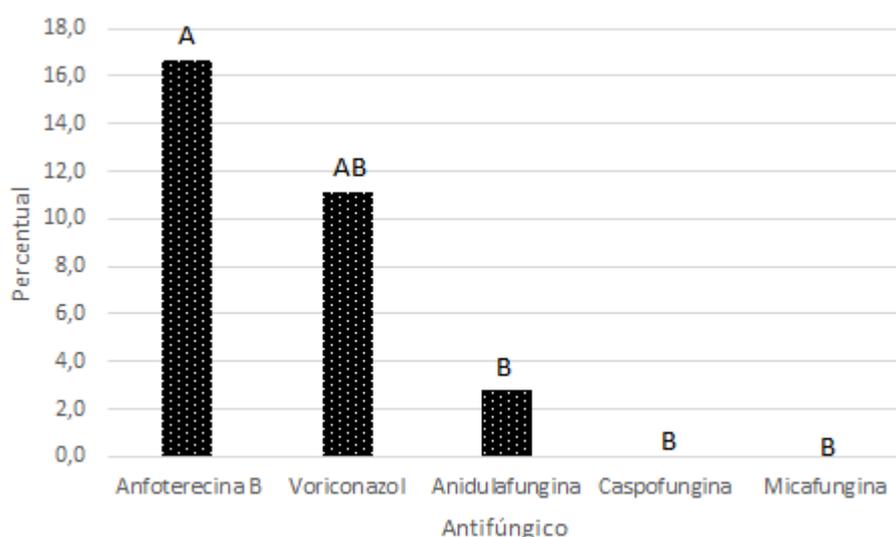


$p<0,0001$

Figura 3. Prevalência de isolados resistentes de *Candida glabrata* observada em 80 amostras de diferentes espécimes clínicos de pacientes admitidos em um

hospital terciário. Distribuição segundo composto antifúngico avaliado. Teste Q de Cochran. Frequências acompanhadas da mesma letra não diferem entre si ($p>0,05$), enquanto prevalências acompanhadas de letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p\leq 0,05$).

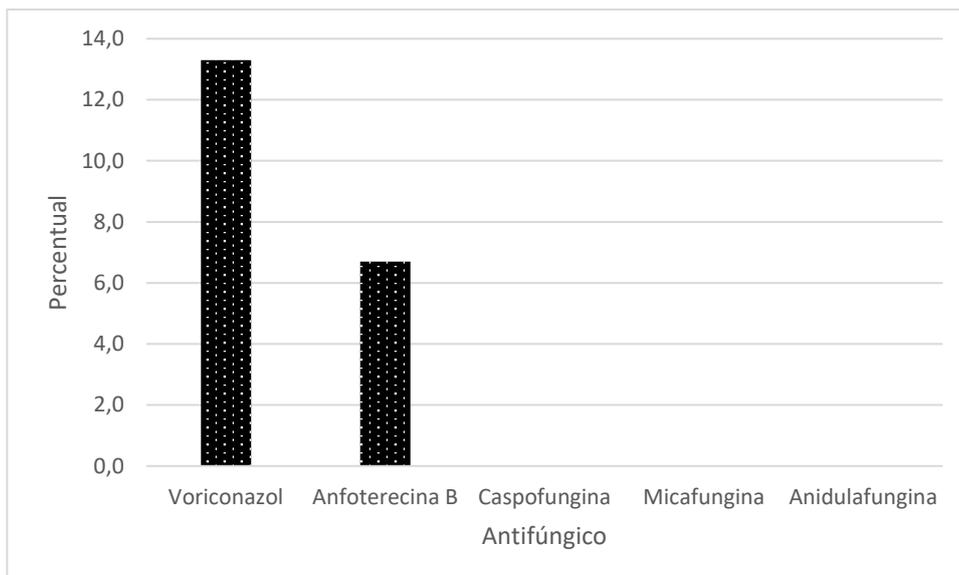
Achado semelhante foi observado quando foram avaliados os 54 isolados de urina (Tabela 2, Figura 4).



$p=0,0002$

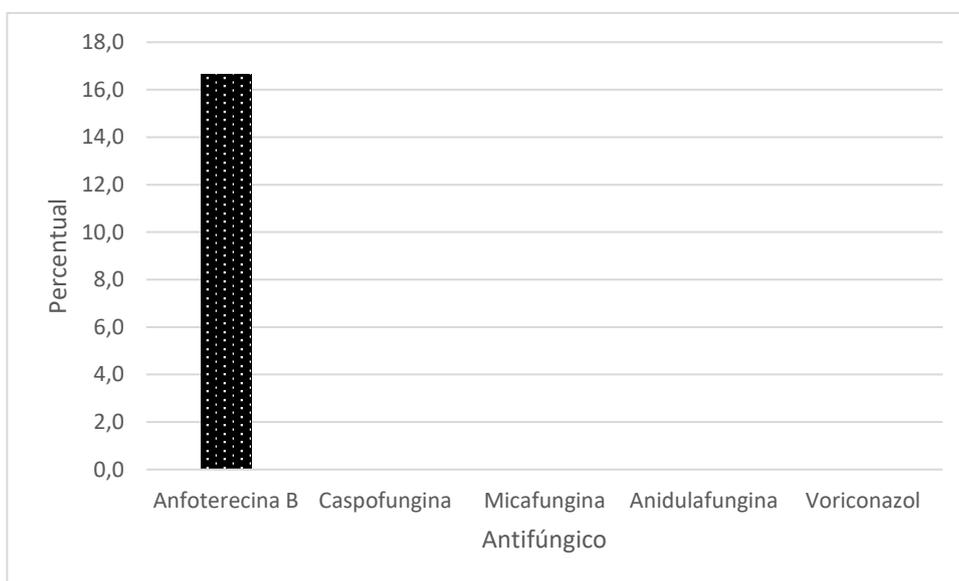
Figura 4. Prevalência de isolados resistentes de *Candida glabrata* observada em 54 amostras de urina de pacientes admitidos em um hospital terciário. Distribuição segundo composto antifúngico avaliado. Teste Q de Cochran. Frequências acompanhadas da mesma letra não diferem entre si ($p>0,05$), enquanto prevalências acompanhadas de letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p\leq 0,05$).

No entanto, a prevalência de isolados resistentes não apresentou diferença, segundo composto antifúngico avaliado, para amostras de sangue e de secreção traqueal (Tabela 2, Figuras 5 e 6).



$p = 0,06$

Figura 5. Prevalência de isolados resistentes de *Candida glabrata* observada em 15 amostras de sangue de pacientes admitidos em um hospital terciário. Distribuição segundo composto antifúngico avaliado. Teste Q de Cochran. Frequências não acompanhadas de nenhuma letra não diferem entre si ($p > 0,05$).



$p=0,31$

Figura 6. Prevalência de isolados resistentes de *Candida glabrata* observada em seis amostras de secreção traqueal de pacientes admitidos em um hospital terciário. Distribuição segundo composto antifúngico avaliado. Teste Q de Cochran. Frequências não acompanhadas de nenhuma letra não diferem entre si ($p > 0,05$).

Nenhum dos isolados de *C. glabrata* revelou-se sensível ao FLC – 76 apresentaram sensibilidade intermediária e quatro eram resistentes. Os quatro isolados resistentes ao FLC eram não selvagens ao VRC, mas três isolados com sensibilidade intermediária ao FLC já se mostraram não selvagens ao VRC (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição de 80 isolados clínicos de *Candida glabrata stricto sensu*, de pacientes admitidos em um hospital terciário, segundo os resultados dos testes de sensibilidade a derivados triazólicos de primeira e segunda geração.

	FLC / sensibilidade intermediária	FLC / resistente	Total
VRC / Selvagem	73 (91,25)	-	73 (91,25)
VRC/não selvagem	03 (3,75)	04 (5,00)	07 (8,75)
Total	76 (95,00)	04 (5,00)	80 (100,00)

FLC, fluconazol; VRC, voriconazol; () porcentagem

4.3 Comparação de valores de concentração inibitória mínima

As equinocandinas avaliadas apresentaram diferentes valores de MIC, sendo os valores de CSF e MCF mais baixos que os de ANF (tabela 6). Em relação aos derivados triazólicos, o VRC apresentou MIC menor que o FLC (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação das concentrações inibitórias mínimas (mg/L) de equinocandinas e de derivados triazólicos, determinadas em 80 amostras de *Candida glabrata stricto sensu*. Teste de Kruskal-Wallis para equinocandinas e de Mann-Whitney para triazólicos.

Equinocandina	Mediana	1º quartil	3º quartil	Média geométrica
Caspofungina	0,03 B	0,015	0,03	0,02
Anidulafungina	0,06 A	0,03	0,06	0,05
Micafungina	0,03 B	0,03	0,03	0,03
Valor de <i>p</i>	< 0,001			
Triazólicos	Mediana	1º quartil	3º quartil	Média geométrica
Voriconazol	0,50 B	0,13	0,50	0,26
Fluconazol	1,00 A	0,25	4,00	0,89
Valor de <i>p</i>	< 0,001			

Letra maiúsculas comparam valores de concentração inibitória mínima da mesma coluna; concentrações seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p>0,05$), enquanto as acompanhadas de letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($p\leq 0,05$).

4.4 Correlação entre as concentrações inibitórias mínimas de compostos antifúngicos do mesmo grupo farmacológico

A avaliação de correlação das concentrações inibitórias mínimas de equinocandinas revelou sua ausência em todos os pares estudados, embora os achados com CSF e ANF tenham sido os que mais se aproximaram da significância (Tabela 7). Ao contrário, os valores de MIC de FLC e VRC apresentaram correlação direta significativa (Tabela 7).

Tabela 7. Correlação entre as concentrações inibitórias mínimas de equinocandinas e de derivados triazólicos, determinados em 80 amostras de *Candida glabrata* stricto sensu. Coeficiente de correlação de Kendall.

Equinocandinas	Coeficiente r	Valor de p
Caspofungina e anidulafungina	-0,188	0,094
Caspofungina e micafungina	-0,063	0,576
Anidulafungina e micafungina	0,027	0,812
Compostos triazólicos	Coeficiente r	Valor de p
Fluconazol e voriconazol	0,607	0,000

4.5 Comparação entre as concentrações inibitórias mínimas de compostos antifúngicos – grupo experimental e grupo controle

A comparação entre o grupo estudado (experimental) e aqueles incluídos na página do EUCAST (controle) foi feita para toda a amostra e para a amostra estratificada.

As concentrações inibitórias mínimas observadas no presente estudo foram mais elevadas que as apresentadas pelo EUCAST, para AmB e equinocandinas. O inverso foi observado com o FLC; com MICs mais elevados no grupo EUCAST que no presente estudo; por fim, não houve diferença apenas para o VRC (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação entre as concentrações inibitórias mínimas de compostos antifúngicos, determinadas em *Candida glabrata* stricto sensu, com as observadas em isolados de *Candida glabrata*, determinadas pelo EUCAST, tomadas como grupo controle. Teste U de Mann-Whitney.

Composto antifúngico	Experimental	n	Controles	n	Valor de p
Anfotericina B	1,0 [0,50; 1,0]	80	0,13 [0,06; 0,25]	1394	< 0,001
Anidulafungina	0,06 [0,03; 0,06]	80	0,02 [0,01; 0,02]	392	< 0,001
Micafungina	1,0 [0,25; 4,0]	80	0,01 [0,01; 0,02]	418	<0,001
Fluconazol	1,0 [0,25; 2,0]	80	4,0 [4,0; 8,0]	1571	< 0,001
Voriconazol	0,25 [0,06; 1,0]	80	0,25 [0,13; 0,50]	5907	0,70

n, número de amostras; [] primeiro e terceiro quartil

A avaliação da comparação das concentrações inibitórias mínimas, distribuídas em faixas, será apresentada para cada composto antifúngico estudado (Tabelas 9 a 14).

AmB. Nas faixas de sensibilidade, a frequência de MICs foi maior no grupo experimental; fato oposto foi observado entre os resistentes (tabela 7).

Tabela 9. Distribuição estratificada dos valores de concentração inibitória mínima (mg/L) da Anfotericina B (AmB), determinados em amostras de *Candida glabrata lato sensu*. Comparação com achados de EUCAST (2024), com *Candida glabrata*, tomados como controles* Teste do qui-quadrado, seguido pelo teste de Goodman.

Faixas	Casos	Controles*
0,002 – 0,003	- b	69 (4,95 a)
0,06 – 1,0	71 (88,75) b	1324 (94,98) a
>1,0	09 (11,25) a	01 (0,07) b
Total	80 (100,00)	1394 (100,00)

p<0,0001

*EUCAST[https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecies%5D=126&search%5Bdisk_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50]

∴ zero () porcentagem calculada na coluna

AmB / *breakpoint*: sensível: ≤ 1,0 mg/L; resistente: > 1,0 mg/L

Letra minúsculas comparam valores de concentração inibitória mínima da mesma linha; concentrações seguidas de letras iguais não diferem entre si (p>0,05), enquanto as acompanhadas de letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (p≤0,05).

ANF. Na faixa superior de sensibilidade, a frequência de MICs foi maior no grupo experimental; fato oposto, embora discreto, foi observado entre os resistentes (tabela 10).

Tabela 10. Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (mg/L) da Anidulafungina (ANF), determinados em amostras de *Candida glabrata lato sensu*. Comparação com achados de EUCAST (2024), com *Candida glabrata*, tomados como controles* Teste do qui-quadrado, seguido pelo teste de Goodman.

Faixas	Experimental	Controles*
0,002 – 0,008	- b	153 (39,03) a
0,016 – 0,06	79 (98,75) a	219 (55,87) b
0,125 – 0,5	- b	16 (4,08) a
1 – 8	01 (1,25) a	04 (1,002) a
Total	80 (100,00)	392 (100,00)

p<0,0001

*EUCAST [https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecies%5D=126&search%5Bdisk_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50]

-: zero () porcentagem calculada na coluna

ANF / *break point*: sensível: ≤ 0,06 mg/L; resistente: > 0,06 mg/L

Letra minúsculas comparam valores de concentração inibitória mínima da mesma linha; concentrações seguidas de letras iguais não diferem entre si (p>0,05), enquanto as acompanhadas de letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (p≤0,05).

MCF. Nas faixas de sensibilidade, as menores MICs predominaram nos controles, enquanto as maiores nas amostras estudadas (Tabela 11).

Tabela 11. Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (mg/L) da Micafungina (MCF), determinados em amostras de *Candida glabrata lato sensu*. Comparação com achados de EUCAST (2024), com *Candida glabrata*, tomados como controles* Teste do qui-quadrado, seguido pelo teste de Goodman.

Faixas	Experimental	Controles*
0,002 – 0,008	05 (6,25) b	272 (65,07) a
0,016 – 0,03	75 (93,75) a	135 (32,30) b
0,06 – 0,25	- a	07 (1,67) a
0,5 - 2	- a	04 (0,96) a
Total	80 (100,00)	418 (100,00)

p<0,0001

*EUCAST [https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecies%5D=126&search%5Bdisk_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50]

∴ zero () porcentagem calculada na coluna

MCF / *breakpoint*: sensível ≤ 0,03 mg/L; resistente: > 0,03 mg/L

Letra minúsculas comparam valores de concentração inibitória mínima da mesma linha; concentrações seguidas de letras iguais não diferem entre si (p>0,05), enquanto as acompanhadas de letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (p≤0,05).

FLC. Nenhuma das amostras dos dois grupos revelou-se sensível ao FLC. Entre as faixas de sensibilidade intermediária, as menores MICs predominaram no grupo de estudo, enquanto as maiores no grupo controle (Tabela 12).

Tabela 12. Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (mg/L) do Fluconazol (FLC), determinados em amostras de *Candida glabrata lato sensu*. Comparação com achados de EUCAST (2024), com *Candida glabrata*, tomados como controles* Teste do qui-quadrado, seguido pelo teste de Goodman.

Faixas	Experimental	Controles*
0,002 – 0,03	04 (5,00) a	- b
0,06 – 1,0	45 (56,25) a	58 (3,69) b
2 – 16	27 (33,75) b	1296 (82,50) a
32 – 64	04 (5,00) a	161 (10,25) a
128	- b	56 (3,56) a
Total	80 (100,00)	1571 (100,00)

p<0,0001

*EUCAST[https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecies%5D=126&search%5Bdisk_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50]

∴ zero () porcentagem calculada na coluna

FLC /breakpoints: sensível ≤ 0,001 mg/L; intermediário: > 0,001 a ≤ 16; resistente: > 16 mg/L

Letra minúsculas comparam valores de concentração inibitória mínima da mesma linha; concentrações seguidas de letras iguais não diferem entre si (p>0,05), enquanto as acompanhadas de letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (p≤0,05).

VRC. A frequência de MICs resistentes foi baixa nos grupos experimental e controle, que não diferiram entre si. Entre as faixas de sensibilidade, as maiores MICs predominaram no grupo de estudo (Tabela 13).

Tabela 13. Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (mg/L) do Voriconazol (VRC), determinados em amostras de *Candida glabrata lato sensu*. Comparação com achados de EUCAST (2024), com *Candida glabrata*, tomados como controles* Teste do qui-quadrado, seguido pelo teste de Goodman.

Faixas	Experimental	Controles*
0,002 – 0,016	10 (12,50) a	146 (2,47) b
0,03 – 0,25	29 (36,25) b	3976 (67,31) a
0,5 – 1,0	34 (42,50) a	1239 (20,98) b
2 – 4	07 (8,75) a	423 (7,16) a
8 – 16	- a	115 (1,95) a
32 – 64	- a	08 (0,13) a
Total	80 (100,00)	5907 (100,00)

p<0,0001

*EUCAST[https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecies%5D=126&search%5Bdisk_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50]

-: zero () porcentagem calculada na coluna

VRC / *break point* epidemiológico: selvagem: ≤ 1,0; não selvagem: > 1,0 mg/L

Letra minúsculas comparam valores de concentração inibitória mínima da mesma linha; concentrações seguidas de letras iguais não diferem entre si (p>0,05), enquanto as acompanhadas de letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (p≤0,05).

4.6 Concentrações inibitórias mínimas 50% e 90%

As concentrações inibitórias mínimas 50% e 90%, avaliadas em amostras de *C. glabrata stricto sensu*, foram inferiores à maior concentração sérica alcançada pelos compostos antifúngicos avaliados, exceto o FLC. No entanto, somente o VRC apresenta níveis líquidos superiores às concentrações inibitórias mínimas. Embora os níveis urinários de FLC sejam elevados, encontram-se abaixo de suas concentrações inibitórias mínimas. (Tabela 14)

Tabela 14. Concentrações inibitórias mínimas 50% (MIC₅₀) e 90% (MIC₉₀) de compostos antifúngicos, avaliadas em 80 amostras de *Candida glabrata stricto sensu*, isoladas de pacientes admitidos em um hospital terciário. Relação com alguns dados da farmacocinética desses agentes.

Antifúngico	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	C _{max} (mg/L)*	LCR (%)*	Urina (%)*
Anfotericina B	1,0	1,0	0,5-2,0	0-4	3-20
Caspofungina	0,03	0,03	0,27 0	<5	<2
Anidulafungina	0,06	0,06	0,83	<5	<2
Micafungina	0,03	0,03	0,24	<5	<2
Fluconazol	1,0	8,0	0,7	>60	90
Voriconazol	0,5	1,0	4,6	60	<2

*Dados extraídos de Ashey et al. (2006)⁽¹⁾; C_{max}: concentração sérica máxima; LCR: líquido cefalorraquidiano / difusão (%); urina / difusão (%)

5. DISCUSSÃO

Os isolados de *C. glabrata* têm sido estudados em avaliações de fungos do gênero *Candida*, em especial como agentes de candidemias, diferentemente do que foi realizado nesta pesquisa (TADEC et al., 2016 & PFALLER et al., 2010). Todos os estudos clínicos que serão citados, realizados no Brasil e em países desenvolvidos, identificaram as espécies de *C. glabrata lato sensu*, mesmo quando utilizaram métodos moleculares. Isto indica que o presente estudo é um dos poucos que pesquisou as espécies do complexo *C. glabrata*.

As publicações de 2013 destacaram o aumento da prevalência de *C. glabrata* como agente de candidemias no Brasil, que passou a ser reconhecida como espécie emergente (MORETTI et al., 2013; COLOMBO et al., 2013; NUCCI et al., 2013) especialmente quando se compara com estudo realizado sete anos antes (COLOMBO et al., 2006). Publicações brasileiras posteriores (DOI et al., 2016; MEDEIROS et al., 2019), revisão sistemática (MATTA et al., 2017 e estudos realizados em outros países - Japão (KAKEYA et al., 2018), Suécia (LINDBERG et al., 2019) e Estados Unidos (TSAY et al., 2020) demonstraram a universalidade deste achado. É interessante registrar que um estudo chileno revelou prevalências muito elevadas de *C. glabrata* no período 2000 – 2006, igual a 25,8%, que se reduziu a ainda elevados 10,3% no período 2007 -2013, demonstrando que essa tendência se antecipou no Chile (SIRI et al., 2017).

A identificação de isolados clínicos de *Candida* spp. em nível de espécie é fundamental para a escolha do tratamento, a ser prescrito, tendo em vista a diferença de sensibilidade aos compostos antifúngicos (COLOMBO et al., 2013 & NUCCI et al., 2013), também demonstrada no presente estudo. A utilização da técnica MALDI-TOF MS oferece uma identificação rápida e precisa (MARKLEIN et al., 2009). Essa técnica permite a aquisição de perfis específicos de proteínas, que atuam como "assinaturas" moleculares distintas. Esses padrões são, então, comparados com um banco de dados de referência, possibilitando a identificação precisa da cepa em questão (MARKLEIN et al., 2009; WOOLSTON et al., 2011). Os escores observados, que variaram entre 2,0 e 2,4, são indicativos de grande confiabilidade na identificação da espécie dos isolados que, independentemente do material clínico avaliado e da unidade hospitalar de origem, foram identificados como *Candida glabrata stricto sensu*.

A identificação das espécies crípticas de *Candida glabrata* tem grande valor epidemiológico. Sua importância clínica depende da avaliação da sensibilidade a compostos antifúngicos, especialmente se forem diferentes de uma espécie críptica para outra. No presente estudo, todos os isolados eram da mesma espécie críptica, o que impossibilitou a comparação de sensibilidade inicialmente proposta. Do ponto de vista epidemiológico, ficou caracterizada a importância dessa identificação.

Os resultados de TSA de isolados de *C. glabrata* revelaram maior prevalência de resistência à AmB e ao VRC que às três equinocandinas avaliadas, quando todos os 80 isolados ou os 54 de urina foram avaliados. Além disso, nenhum isolado foi sensível ao FLC, que revelou elevada prevalência de sensibilidade intermediária. Estes achados corroboram os de Tadeu et al. (2016) realizado em pacientes de um hospital da França, com candidemia, em relação ao FLC, que observaram $MIC_{90} \geq 256 \mu\text{g}/\text{m}$ e à CSF (100% de isolados sensíveis, baseados em *break points* propostos por Arendrup et al., 2012), e bastante próximos dos da AmB (100% de isolados sensíveis). Os resultados do presente estudo também confirmam os achados de Pfaller e colaboradores (2012), que avaliaram o *cut off* epidemiológico para AmB, encontrando apenas 3% com valores acima de 1,0 mg/L. Estudo recente, realizado com isolados de paciente internados em 22 hospitais do Estado de São Paulo, identificou 14 (9,7%) isolados de *C. glabrata*; a prevalência de resistência ao FLC e ao VRC foi igual a 2,8%, similar aos 5,0% observados no presente estudo [Rodrigues et al., 2021].

As equinocandinas inibem a síntese de 1,3- β -glucana, um dos constituintes da parede celular de fungos, reduzindo sua integridade e levando à sua ruptura e, por fim, à morte celular. Os compostos estudados –CSP, MCF e ANF apresentam grande similaridade estrutural e espectro antifúngico praticamente idêntico. Elas são fungicidas para espécies de *Candida*, inclusive para isolados resistentes a outros compostos antifúngicos (PFALLER et al., 2008). As MICs da ANF eram mais elevadas que as da CSP e MCF, embora em apenas uma diluição. Estudo que avaliou essa equinocandina revelou MIC_{90} de 0,03mg/L, 0,06 mg/L e 0,012mg/L, respectivamente, achado que difere do presente estudo [Lindberg et al., 2019]. Além disso as MICs das diferentes equinocandinas não apresentaram correlação quando avaliadas duas a duas.

Essas pequenas diferenças talvez possam ser explicadas por alterações induzidas por componentes séricos (PADERU et al., 2007).

O anel imidazólico confere atividade antifúngica a uma variedade de compostos orgânicos sintéticos, inclusive os que receberam uma N-substituição, denominados triazóis, que apresentam o mesmo mecanismo de ação, maior espectro antifúngico e menor atividade sobre a síntese de esteróis humanos. Os derivados azólicos reduzem a concentração de ergosterol, que é fundamental para a membrana citoplasmática de fungos. FLC e VRC, que apresentam grande similaridade estrutural, mostraram correlação direta de suas MICs, embora revelem grande diferença de sensibilidade frente à *C. glabrata stricto sensu*, a maioria dos isolados mostra sensibilidade intermediária ao FLC e padrão selvagem ao VRC.

As MICs de isolados de *C. glabrata* do grupo experimental - do presente estudo e do EUCAST - constituído por amostras procedentes de muitos países, foram distribuídas por faixas e comparadas. As faixas de sensibilidade com concentrações inibitórias mínimas mais elevadas apresentavam maior prevalência no grupo experimental que no grupo EUCAST para AmB, ANF e MCF; essas frequências eram menores no grupo de estudo para FLC e iguais para VRC. Esses resultados demonstram uma progressão dos isolados do presente estudo para níveis de resistência à AmB, ANF e MCF. Por esse motivo, a utilização de todos os compostos antifúngicos, em especial AmB, ANF e MCF, deve estar apoiada em identificação rigorosa do agente causal e avaliação de sua sensibilidade a compostos antifúngicos, com a finalidade de retardar a emergência de isolados resistentes. A ausência de dados da CSP no grupo EUCAST impossibilitou essa avaliação para este antifúngico.

As variáveis MIC₅₀ e MIC₉₀ são de grande importância para a avaliação da sensibilidade de compostos antifúngicos e devem ser analisadas frente aos níveis por eles alcançados nos sítios de infecção, entre os quais são de maior importância os séricos, líquóricos e urinários. Quatro dos cinco compostos antifúngicos analisados apresentavam níveis séricos superiores aos respectivos MIC₉₀ para *C. glabrata*, em que apenas o FLC constituiu-se em exceção. Apesar de a taxa de difusão de FLC e de VRC para o líquido cefalorraquidiano serem elevadas, apenas o VRC poderia ser indicado para o tratamento de infecções por *C. glabrata*, em função de suas MICs. No entanto, sua baixa concentração

urinária em forma ativa constitui fator impeditivo de sua administração oral ou intravenosa para tratamento de infecção urinária por *C. glabrata* (ASHLEY et al., 2006). Por fim, quando os testes de sensibilidade antifúngica indicarem o uso de AmB, se o sítio da infecção for o líquido cefalorraquidiano, deve-se dar preferência à sua formulação lipossomal que, nas doses utilizadas, alcançam níveis terapêuticos (ASHLEY, 2019).

As MICs de AmB confirmaram os achados de estudos prévios [Colombo et al., 2006; Doi et al., 2016; Nucci et al., 2017; Lindberg et al., 2019]. As MICs do FCL variaram, de um estudo para outro, em até três diluições – a MIC₉₀ (mg/L) foi de 8 no presente estudo, 32 no de Colombo et al. (2006), 64 no de Colombo et al. (2013), 16 no de Nucci et al. (2013) e 16 no de Lindberg et al. (2019). A MIC₉₀ (mg/L) do VRC também apresentou variações significativas – foi de 1 no presente estudo, de 1 no de Colombo et al. (2006), de 4 no de Colombo et al. (2013) 0,5 no de Nucci et al. (2013) e de 1 no de Lindberg et al. (2019). A MIC₉₀ (mg/L) da ANF também apresentou variações – foi igual a 0,06 no presente estudo, 0,125 no de Nucci et al. (2013) e de 0,03 no de Lindberg et al. (2019). Por fim, a MIC₉₀ (mg/L) foi de 0,03 no presente estudo e de 0,012 no de Lindberg et al. (2019). Essas variações temporais e regionais indicam a necessidade de se manter a realização rotineira de testes de sensibilidade antifúngica em laboratórios de referência, cujos resultados devem ser divulgados periodicamente, para que o paciente receba o tratamento mais apropriado e para que se retarde a emergência de isolados resistentes.

A publicação recente de uma revisão da literatura sobre *Candida glabrata* (FRÍAS-DE-LEÓN et al., 2021) permitiu comparar os resultados do presente estudo com os observados em isolados de todos os continentes (Anexo I). Esta comparação revelou que a amostra estudada foi de tamanho satisfatório, uma vez que poucos trabalhos apresentaram mais de 80 isolados. Além disso, não são numerosos os estudos que abordaram AmB, EQCs e VRC, cabendo ao FLC o maior número de trabalhos. Por fim, embora tenham sido grandes as variações regionais, os resultados do presente estudo estão de acordo com a média dos observados na literatura em relação às equinocandinas – baixa prevalência de resistência e ao FLC – elevada frequência de sensibilidade intermediária. No entanto, as diferenças observadas se referem à resistência ao VRC - menor no presente estudo, e à AMB – bem maior na amostra avaliada. Considerando-se

que a AmB é uma alternativa ao tratamento de pacientes com isolados resistentes ao FLC, este achado deve passar a ser levado em consideração ao se decidir por sua indicação. Por fim, embora a resistência de *C. glabrata* à ANF esteja dentro do observado em outras regiões do mundo, é muito importante enfatizar a identificação de um caso na amostra avaliada.

O presente estudo apresenta a limitação de se referir à avaliação de isolados de um único hospital, embora os achados de outras unidades tenham sido referidas na discussão. Além disso, como a prevalência de infecção por *C. glabrata* e sua sensibilidade a compostos antifúngicos variam em função do país e da região estudada (MARÇON, 2023), esta contribuição pode ser considerada relevante. Por outro lado, deve-se estimular a identificação molecular dos isolados do complexo *Candida glabrata*, para se avaliar a prevalência e sensibilidade das diferentes espécies crípticas. Os laboratórios de referência terão um papel central na execução deste estudo.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo, realizado em isolados do complexo *C. glabrata*, de diferentes espécimes clínicos, dão suporte às seguintes conclusões:

1. Todos os isolados foram identificados como *C. glabrata stricto sensu*.
2. Os isolados apresentavam elevada sensibilidade à AmB, equinocandinas – CSF, ANF e MCF, e VRC, mas sensibilidade intermediária ao FLC;
3. A prevalência de resistência era mais elevada à AmB e ao VRC que às equinocandinas, na avaliação de isolados de todas as amostras e dos isolados de urina, e apresentava tendência de ser maior naqueles de amostras de sangue;
4. As faixas de sensibilidade em concentrações inibitórias mínimas mais elevadas de AmB, ANF e MCF apresentavam maior prevalência no presente estudo que nas amostras do EUCAST, tomada como representativa global

7. ANEXOS

ANEXO 1

Avaliação da sensibilidade de isolados clínicos de *Candida glabrata* a compostos antifúngicos – anfotericina B (AmB), caspofungina (CSF), micafungina (MCF), anidulafungina (ANF), fluconazol (FLC) e voriconazol (VRC). Comparação entre os achados do presente estudo com os de Frías-De-León et al. (2021).

Antifúngico	Artigos (n)	Isolados (n)	Resistentes (%) Intermediário (%)*	Estudo (n=80) Resistentes (%) Intermediário (%)*
AmB	10	575	2,8 [0-100]	8,8
CSF	11	8.103	1,4 [0-33,5]	-
MCF	08	7.899	0,6 [0-10,0]	-
ANF	04	7.963	1,6 [0-47,7]	1,3
FLC*	11	1.273	86,6 [11,1-100]*	95,0
FLC	22	1.496	20,1 [0-100]	5,0
VRC	10	997	14,5 [0-43,4]	8,8

n: número; - : zero; Fluconazol* (FLC*): sensibilidade intermediária

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBY, Kevin; BENNETT, Richard J. Sexual reproduction in the *Candida* clade: cryptic cycles, diverse mechanisms, and alternative functions. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 67, n. 19, p. 3275-3285, 15 jun. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-010-0421-8>.
- ALCOBA-FLÓREZ, Julia; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, Sebastián; CANO, Josep; GUARRO, Josep; PÉREZ-ROTH, Eduardo; ARÉVALO, María del Pilar. Phenotypic and Molecular Characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a Possible New Opportunistic Fungus. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 43, n. 8, p. 4107-4111, ago. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.43.8.4107-4111.2005>.
- ASHLEY, Elizabeth S. Dodds; LEWIS, Russell; LEWIS, James S.; MARTIN, Craig; ANDES, David. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. S28-S39, 1 ago. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/504492>.
- ASHLEY, Elizabeth Dodds. Antifungal Drugs: special problems treating central nervous system infections. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 97, 11 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof5040097>.
- BERKHOUT, CM. De shimmelgeschlachten Monilia, Oidium, Oospora em Torula. Dissertation, University of Utrecht, 1923.
- BERNHARDT, H.; KNOKE, M.. Mycological Aspects of Gastrointestinal Microflora. **Scandinavian Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 32, n. 222, p. 102-106, jan. 1997. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00365521.1997.11720731>.
- BITAR, Dounia *et al.* Population-Based Analysis of Invasive Fungal Infections, France, 2001–2010. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 20, n. 7, p. 1163-1169, jul. 2014. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2007.140087>.
- BORMAN, Andrew M.; PETCH, Rebecca; LINTON, Christopher J.; PALMER, Michael D.; BRIDGE, Paul D.; JOHNSON, Elizabeth M.. *Candida nivariensis*, an Emerging Pathogenic Fungus with Multidrug Resistance to Antifungal Agents. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 933-938, mar. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02116-07>.
- BOSSCHE, Hugo Vanden; MARICHAL, Patrick; GORRENS, Jos; GEERTS, Hugo; JANSSEN, Paul A. J.. Mode of Action Studies: basis for the search of new antifungal drugs. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**,

[S.L.], v. 544, n. 1, p. 191-207, dez. 1988. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb40404.x>.

CLARK, Andrew E.; KALETA, Erin J.; ARORA, Amit; WOLK, Donna M.. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 547-603, jul. 2013. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00072-12>.

CLEARY, John D.; GARCIA-EFFRON, Guillermo; CHAPMAN, Stanley W.; PERLIN, David S.. Reduced *Candida glabrata* Susceptibility Secondary to an FKS1 Mutation Developed during Candidemia Treatment. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 52, n. 6, p. 2263-2265, jun. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01568-07>.

COLOMBO, Arnaldo L.; NUCCI, Marcio; PARK, Benjamin J.; NOUÉR, Simone A.; ARTHINGTON-SKAGGS, Beth; MATTA, Daniel A. da; WARNOCK, David; MORGAN, Juliette. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 44, n. 8, p. 2816-2823, ago. 2006. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00773-06>.

COLOMBO, Arnaldo L.; GARNICA, Marcia; CAMARGO, Luis Fernando Aranha; CUNHA, Clovis Arns da; BANDEIRA, Antonio Carlos; BORGHI, Danielle; CAMPOS, Tatiana; SENNA, Ana Lucia; DIDIER, Maria Eugenia Valias; DIAS, Viviane Carvalho. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 38-44, jan. 2013. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2012.698024>.

CORREIA, A; SAMPAIO, P; JAMES, S; PAIS, C. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 56, n. 1, p. 313-317, 1 jan. 2006. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64076-0>.

D'ENFERT, Christophe; JANBON, Guilhem. Biofilm formation in *Candida glabrata*: what have we learnt from functional genomics approaches?. **Fems Yeast Research**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 111, 16 dez. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsyr/fov111>.

Diddens HA, Lodder J (ed). *Die Anaskosporogenen Hefen*, II Hälfte. North-Holland Publishing Co.; 1942, 487p.

DOI, André Mario; PIGNATARI, Antonio Carlos Campos; EDMOND, Michael B.; MARRA, Alexandre Rodrigues; CAMARGO, Luis Fernando Aranha; SIQUEIRA, Ricardo Andreotti; MOTA, Vivian Pereira da; COLOMBO, Arnaldo Lopes. Epidemiology and Microbiologic Characterization of

Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. e0146909, 25 jan. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>.

ELLIS, David. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 7-10, 1 jan. 2002. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jac/49.suppl_1.7.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). DOCUMENT E.DEF 7.3.1 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. 2017.

EUCAST. EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.2**: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. [s.l.]: Eucast, 2020. 23 p.

FRASER, Mark; BROWN, Zoe; HOULDSWORTH, Marian; BORMAN, Andrew M.; JOHNSON, Elizabeth M.. Rapid identification of 6328 isolates of pathogenic yeasts using MALDI-ToF MS and a simplified, rapid extraction procedure that is compatible with the Bruker Biotyper platform and database. **Medical Mycology**, [S.L.], p. 085, 21 nov. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myv085>.

FRÍAS-DE-LEÓN, María Guadalupe; HERNÁNDEZ-CASTRO, Rigoberto; CONDE-CUEVAS, Esther; GARCÍA-CORONEL, Itzel H.; VÁZQUEZ-ACEITUNO, Víctor Alfonso; SORIANO-URSÖA, Marvin A.; FARFÁN-GARCÍA, Eunice D.; OCHARÁN-HERNÁNDEZ, Esther; RODRÍGUEZ-CERDEIRA, Carmen; ARENAS, Roberto. Candida glabrata Antifungal Resistance and Virulence Factors, a Perfect Pathogenic Combination. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 1529, 22 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13101529>.

GARCIA-EFFRON, Guillermo; LEE, Samuel; PARK, Steven; CLEARLY, John D.; PERLIN, David S.. Effect of Candida glabrata FKS1 and FKS2 Mutations on Echinocandin Sensitivity and Kinetics of 1,3-β- d -Glucan Synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 53, n. 9, p. 3690-3699, set. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00443-09>.

GASPAR, Gilberto Gambero; MENEGUETI, Mayra Gonçalves; AUXILIADORA-MARTINS, Maria; BASILE-FILHO, Anibal; MARTINEZ, Roberto. Evaluation of the predictive indices for candidemia in an adult intensive care unit. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 77-82, fev. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0292-2014>.

HAZEN, K C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 462-478, out. 1995. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.8.4.462>.

HULL, Claire M.; PARKER, Josie E.; BADER, Oliver; WEIG, Michael; GROSS, Uwe; WARRILOW, Andrew G. S.; KELLY, Diane E.; KELLY, Steven L.. Facultative Sterol Uptake in an Ergosterol-Deficient Clinical Isolate of *Candida glabrata* Harboring a Missense Mutation in ERG11 and Exhibiting Cross-Resistance to Azoles and Amphotericin B. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 56, n. 8, p. 4223-4232, ago. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.06253-11>.

JEKEL, J.F.; KATZ, D.L.; ELMORE, J.G. Tamanho da amostra, randomização e teoria da probabilidade. _____. **Epidemiologia, estatística e Medicina Preventiva. Artmed 2ed., Porto Alegre, Brasil**, p. 205-219, 2005.

KAKEYA, Hiroshi; YAMADA, Koichi; KANEKO, Yukihiro; YANAGIHARA, Katsunori; TATEDA, Kazuhiro; MAESAKI, Shigefumi; TAKESUE, Yoshio; TOMONO, Kazunori; KADOTA, Jun-Ichi; KAKU, Mitsuo. National Trends in the Distribution of *Candida* Species Causing Candidemia in Japan from 2003 to 2014. **Medical Mycology Journal**, [S.L.], v. 59, n. 1, p. E19-E22, 2018. The Japanese Society for Medical Mycology. <http://dx.doi.org/10.3314/mmj.17-00014>.

KATIYAR, Santosh; PFALLER, Michael; EDLIND, Thomas. *Candida albicans* and *Candida glabrata* Clinical Isolates Exhibiting Reduced Echinocandin Susceptibility. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 50, n. 8, p. 2892-2894, ago. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00349-06>.

KOJIC, Erna M.; DAROUICHE, Rabih O.. *Candida* Infections of Medical Devices. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 255-267, abr. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.17.2.255-267.2004>.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.e.. Medical mycology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 504-504, dez. 1992. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46651992000600018>.

LACAZ, C. S.; SALEBIAN, A.; MENDES, M. J. S.; TAKA HASHI, N. & NAGAO, M. T. - Ecologia das leveduras do gênero *Candida*. In: LACAZ, C. S., org. - *Candidiases*. São Paulo, EPU, EDUSP, 1980. p.47-54.

LANGENBECK B. Auffingung von Pilzen aus der Schleimhaut der Speiseröhre einer Typhus-Leiche Neue Not Geb Natur-u-Heilk (Froriep), 1839; 12: 145 – 147.

LANGERON A, Guerra P. Nouvelles recherches de zymology médicale. Ann Parasitol Humaine et Comp 1938; 16: 162, 430 e 481.

LATGÉ, Jean-Paul. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 279-290, 14 set. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x>.

LEE, Keunsook K.; KUBO, Karen; ABDELAZIZ, Jehan Abdelmoneim; CUNNINGHAM, Iain; DANTAS, Alessandra de Silva; CHEN, Xiaolin; OKADA, Hiroki; OHYA, Yoshikazu; GOW, Neil A.R.. Yeast species-specific, differential inhibition of β -1,3-glucan synthesis by poacic acid and caspofungin. **The Cell Surface**, [S.L.], v. 3, p. 12-25, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcsw.2018.09.001>.

LINDBERG, Erika; HAMMARSTRÖM, Helena; ATAOLLAHY, Nasser; KONDORI, Nahid. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, 7 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-40280-8>.

LOCKHART, Shawn R.; MESSER, Shawn A.; GHERNA, Michael; BISHOP, Justin A.; MERZ, William G.; PFALLER, Michael A.; DIEKEMA, Daniel J.. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a Large Global Collection of *Candida glabrata* Isolates: comparison to the literature. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 47, n. 4, p. 1216-1217, abr. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02315-08>.

LODDER J, Kreger-Van Rij NJW. The yeasts. A taxonomic study. Amsterdam, North-Holland Publ Co., 1952.

MARÇON, Camila; SILVEIRA, Mônica da; CORREA, Adriana A.P. Feltrin; LEVORATO, Adrielle Dandara; MELHEM, Marcia de Souza Carvalho; BONFIETTI, Lucas Xavier; CARVALHO, Lidia Raquel de; MORIS, Daniela Vanessa; MENDES, Rinaldo Poncio. DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE AGENTES DE CANDIDEMIA EM UM HOSPITAL PÚBLICO BRASILEIRO. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 25, p. 101434, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2020.101434>.

MARÇON, Camila. **Distribuição de espécies e perfil de sensibilidade de agentes de candidemia em hospitais terciários da América Latina - revisão sistemática e meta-análise**. 2023. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doenças Tropicais., Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2023. Disponível em: <https://hdl.handle.net/11449/251120>. Acesso em: 05 jan. 2024.

MARKLEIN, G.; JOSTEN, M.; KLANKE, U.; MÜLLER, E.; HORRÉ, R.; MAIER, T.; WENZEL, T.; KOSTRZEWA, M.; BIERBAUM, G.; HOERAUF,

A.. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 47, n. 9, p. 2912-2917, set. 2009. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00389-09>.

MATTA, Daniel da; SOUZA, Ana; COLOMBO, Arnaldo. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of Candida Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 24, 17 maio 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof3020024>.

MEDEIROS, Mariana Araújo Paulo de; MELO, Ana Patrícia Vieira de; BENTO, Aurélio de Oliveira; SOUZA, Luanda Bárbara Ferreira Canário de; BEZERRA NETO, Francisco de Assis; GARCIA, Jarmilla Bow-Ltaif; ZUZA-ALVES, Diana Luzia; FRANCISCO, Elaine Cristina; MELO, Analy Salles de Azevedo; CHAVES, Guilherme Maranhão. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: a six-year retrospective study. **Plos One**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. e0221033, 22 ago. 2019. Public Library of Science (PLoS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0221033>.

MIRANDA-ZAPICO, I.; ERASO, E.; HERNANDEZ-ALMARAZ, J. L.; LOPEZ-SORIA, L. M.; CARRILLO-MUNOZ, A. J.; HERNANDEZ-MOLINA, J. M.; QUINDOS, G.. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 66, n. 10, p. 2315-2322, 26 jul. 2011. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr298>.

MORETTI, Maria Luiza; TRABASSO, Plinio; LYRA, Luzia; FAGNANI, Renata; RESENDE, Mariangela Ribeiro; CARDOSO, Luis Gustavo de Oliveira; SCHREIBER, Angélica Zaninelli. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. **Medical Mycology**, [S.L.], v. 51, n. 3, p. 225-230, abr. 2013. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2012.708107>.

NEUFELD, Paulo Murillo; MELHEM, Marcia de Souza Carvalho; SZESZS, Maria Walderez; RIBEIRO, Marcos Dornelas; AMORIM, Efigênia de Lourdes Teixeira; SILVA, Manuela da; LAZÉRA, Marcia dos Santos. Nosocomial candidiasis in Rio de Janeiro State: distribution and fluconazole susceptibility profile. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 477-484, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/s1517-838246220120023>.

NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. NCCLS document M27-A2. Wayne, PA: NCCLS, 2002.

NUCCI, Marcio; QUEIROZ-TELLES, Flavio; ALVARADO-MATUTE, Tito; TIRABOSCHI, Iris Nora; CORTES, Jorge; ZURITA, Jeannete; GUZMAN-BLANCO, Manuel; SANTOLAYA, Maria Elena; THOMPSON, Luis; SIFUENTES-OSORNIO, Jose. Epidemiology of Candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. e59373, 19 mar. 2013. Public Library of Science (PLoS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059373>.

PADERU, Padmaja; GARCIA-EFFRON, Guillermo; BALASHOV, Sergey; DELMAS, Guillaume; PARK, Steven; PERLIN, David S.. Serum Differentially Alters the Antifungal Properties of Echinocandin Drugs. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 51, n. 6, p. 2253-2256, jun. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01536-06>.

PARK, S.; KELLY, R.; KAHN, J. Nielsen; ROBLES, J.; HSU, M.-J.; REGISTER, E.; LI, W.; VYAS, V.; FAN, H.; ABRUZZO, G.. Specific Substitutions in the Echinocandin Target Fks1p Account for Reduced Susceptibility of Rare Laboratory and Clinical *Candida* sp. Isolates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 49, n. 8, p. 3264-3273, ago. 2005. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/aac.49.8.3264-3273.2005>.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; KROEGER, J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J.. In Vitro Susceptibility of Invasive Isolates of *Candida* spp. to Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin: six years of global surveillance. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 150-156, jan. 2008. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01901-07>.

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; MOET, G. J.; JONES, R. N.. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest Methods with the CLSI Broth Microdilution Method for Echinocandin Susceptibility Testing of *Candida* Species. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 48, n. 5, p. 1592-1599, maio 2010. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02445-09>.

PFALLER, M. A.; ESPINEL-INGROFF, A.; CANTON, E.; CASTANHEIRA, M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DIEKEMA, D. J.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GHANNOUM, M.; JONES, R. N. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B, Flucytosine, and Itraconazole and *Candida* spp. as Determined by CLSI Broth Microdilution. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 50, n. 6, p. 2040-2046, jun. 2012. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00248-12>.

PRISTOV, K.e.; GHANNOUM, M.A.. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 25, n. 7, p. 792-798, jul. 2019. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028>.

PURISCO, Sonia U.; MARTINS, Marilena A.; SZESZS, Maria W.; SILVA, Dulcilena M. Castro e; PUKINSKAS, Sandra R.B.s.; BONFIETTI, Lucas X.; BAEZ, Andres A.; MELHEM, Marcia S.C.. Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and the Clinical Laboratory Standards Institute BMD method for non-Candida albicans and non-C. tropicalis bloodstream isolates from eleven. **Fems Yeast Research**, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 890-896, 14 set. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00838.x>.

REX JH, ALEXANDER BD, ANDES D, ARTHINGTON-SKAGGS B, BROWN SD, CHATURVEDI V, et al. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition. Clin Lab Stand Inst. 2008;(April):1–25.

ROMEO, Orazio; SCORDINO, Fabio; PERNICE, Ida; LOPASSO, Carla; CRISEO, Giuseppe. A multiplex PCR protocol for rapid identification of Candida glabrata and its phylogenetically related species Candida nivariensis and Candida bracarensis. **Journal Of Microbiological Methods**, [S.L.], v. 79, n. 1, p. 117-120, out. 2009. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.07.016>.

ROSEN von ROSENSTEIN N. Underrattelse om barns sjukdomar och deras bote-medal. Stockholm, Wennbert & Nordstrom, 1771.

ROBIN CP. Histoire naturelle des végétaux. Parasites qui croissant sur l'homme et sur les animaux vivants. Paris, Bailliere, 1853.

RODRIGUES, Célia; RODRIGUES, Maria; SILVA, Sónia; HENRIQUES, Mariana. Candida glabrata Biofilms: how far have we come?. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 11, 1 mar. 2017. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/jof3010011>.

RODRIGUES, D.K.B.; BONFIETTI, L.X.; GARCIA, R.A.; ARAUJO, M.R.; RODRIGUES, J.s.; GIMENES, V.M.F.; MELHEM, M.s.C.. Antifungal susceptibility profile of Candida clinical isolates from 22 hospitals of São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [S.L.], v. 54, n. 9, p. 10928, 2021. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x2020e10928>.

RUIZ, L.s.; SUGIZAKI, M.F.; MONTELLI, A.C.; MATSUMOTO, F.e.; PIRES, M.F.C.; SILVA, B.C.M. da; SILVA, E.H.; GANDRA, R.F.; SILVA, E. Gonçalves da; AULER, M.e.. Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the public hospital, botucatu, são

paulo. **Journal de Mycologie Médicale**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 13-21, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2004.12.002>

SEGAL, E, Elad D. *Candida species and Blastoschizomyces capitatus*. *Topley Wilson's Microbiol Microb Infect*. 1998;4:423–60. [[Google Scholar](#)].

SILVA, Sónia; NEGRI, Melyssa; HENRIQUES, Mariana; OLIVEIRA, Rosário; WILLIAMS, David W.; AZEREDO, Joana. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 288-305, mar. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>.

SIN, Leonardo; LEGARRAGA, Paulette; GARCÍA, Patricia; GONZÁLEZ, Tamara; RABAGLIATI, Ricardo. Cambios clínicos y epidemiológicos de candidemias en pacientes adultos desde 2000 a 2013. **Revista Chilena de Infectología**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 19-26, fev. 2017. SciELO Agencia Nacional de Investigacion y Desarrollo (ANID). <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182017000100003>.

SPAMPINATO, Claudia; LEONARDI, Darío. *Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: traditional and alternative antifungal agents*. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2013, p. 1-13, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/204237>.

SUBRAMANYA, Supram Hosuru; BARAL, Bharat Prasad; SHARAN, Nawal Kishor; NAYAK, Niranjan; METOK, Yang; SATHIAN, Brijesh; BAIRY, Indira; GOKHALE, Shishir. Antifungal susceptibility and phenotypic virulence markers of *Candida* species isolated from Nepal. **Bmc Research Notes**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 543, 2 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-017-2852-x>.

TADEC, Laurent; TALARMIN, Jean-Philippe; GASTINNE, Thomas; BRETONNIÈRE, Cédric; MIEGEVILLE, Michel; PAPE, Patrice Le; MORIO, Florent. Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: a 7 :year study. **Mycoses**, [S.L.], v. 59, n. 5, p. 296-303, 25 jan. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/myc.12470>.

THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.3, E.Def 9.3 and E.Def 11.0 procedures. Version 2, 2020. <http://www.eucast.org>.
Disponível em:
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/EUCAST_BP_ECOFF_v2.0_20-09-24.pdf

THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for

yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.4, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures. Version 4.0, 2023. <http://www.eucast.org>.

THOMPSON, George R.; WIEDERHOLD, Nathan P.; VALLOR, Ana C.; VILLAREAL, Nyria C.; LEWIS, James S.; PATTERSON, Thomas F.. Development of Caspofungin Resistance following Prolonged Therapy for Invasive Candidiasis Secondary to *Candida glabrata* Infection. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 52, n. 10, p. 3783-3785, out. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00473-08>.

TSAY, Sharon V; MU, Yi; WILLIAMS, Sabrina; EPSON, Erin; NADLE, Joelle; BAMBERG, Wendy M; BARTER, Devra M; JOHNSTON, Helen L; FARLEY, Monica M; HARB, Sasha. Burden of Candidemia in the United States, 2017. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], p. e449-e453, 28 fev. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa193>.

TURNER, S. A.; BUTLER, G.. The *Candida* Pathogenic Species Complex. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [S.L.], v. 4, n. 9, p. a019778-a019778, 1 set. 2014. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a019778>.

UNDERWOOD, M. **A Treatise on the Diseases of Children, with Directions for the Management of Infants from the Birth ; Especially Such as are Brought Up by Hand**. London: J. Mathews, 1784. 288 p.

VANDEPUTTE, Patrick; TRONCHIN, Guy; LARCHER, Gérald; ERNOULT, Emilie; BERGÈS, Thierry; CHABASSE, Dominique; BOUCHARA, Jean-Philippe. A Nonsense Mutation in the ERG6 Gene Leads to Reduced Susceptibility to Polyenes in a Clinical Isolate of *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 52, n. 10, p. 3701-3709, out. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00423-08>.

VERON: mémoire sur le muguet. Arch Gen Med 1835; 8: 466.

WALKER, Louise A.; GOW, Neil A.R.; MUNRO, Carol A.. Fungal echinocandin resistance. **Fungal Genetics And Biology**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 117-126, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2009.09.003>.

WILKINSON, J. Stuart. SOME REMARKS UPON THE DEVELOPMENT OF EPIPHYTES. **The Lancet**, [S.L.], v. 54, n. 1365, p. 448-451, out. 1849. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)63203-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(00)63203-8).

WILLE, Marcos Paulo; GUIMARAES, Thais; FURTADO, Guilherme Henrique Campos; COLOMBO, Arnaldo Lopes. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 108, n. 3,

p. 288-292, maio 2013. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762013000300005>.

WOOLSTON, Benjamin M.; SCHLAGNHAUFER, Carl; WILKINSON, Jack; LARSEN, Jeffrey; SHI, Zhixin; MAYER, Kimberly M.; WALTERS, Donald S.; CURTIS, Wayne R.; ROMAINE, C. Peter. Long-Distance Translocation of Protein during Morphogenesis of the Fruiting Body in the Filamentous Fungus, *Agaricus bisporus*. **Plos One**, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 1-9, 6 dez. 2011. Public Library of Science (PLoS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028412>.

ZENG, Zhang-Rui; TIAN, Gang; DING, Yin-Huan; YANG, Kui; LIU, Jin-Bo; DENG, Jian. Surveillance study of the prevalence, species distribution, antifungal susceptibility, risk factors and mortality of invasive candidiasis in a tertiary teaching hospital in Southwest China. **Bmc Infectious Diseases**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 939, 7 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-019-4588-9>.

ZENKER W. Encephalitis mit Pilzentwicklung in Gehirn. Jahrb Ges Natur-u-Heilk (Dresden) 1862; 51 – 52.

ZIRKEL, Janina; KLINKER, Hartwig; KUHN, Anna; ABELE-HORN, Marianne; TAPPE, Dennis; TURNWALD, Doris; EINSELE, Hermann; HEINZ, Werner J.. Epidemiology of Candida blood stream infections in patients with hematological malignancies or solid tumors. **Medical Mycology**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 50-55, jan. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2011.587211>.

ZOPF W. Die pilze im morphologischer, physiologischer, biologischer und systematischer richtung. Breslan, Trewendt, 1890.