

**DALITY KEFFELEN DE BARROS RODRIGUES**

**Distribuição das espécies de *Candida* em isolados de corrente sanguínea no estado de São Paulo: identificação e perfil de sensibilidade antifúngica**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria do Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo para obtenção do Título de Mestra em Ciências.

**Área de concentração:** Vigilância em Saúde Pública.

**Orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.(a). Marcia de Souza Carvalho Melhem.

**SÃO PAULO  
2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Rodrigues, Dality Keffelen de Barros

Distribuição das espécies de crípticas de *Candida* em isolados de corrente sanguínea: identificação e perfil de sensibilidade antifúngica / Dality Keffelen de Barros Rodrigues. – 2020.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Vigilância em Saúde.

Orientação: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem.

1. Candidemia. 2. Resistência a medicamentos/genética. 3. Candida. 4. Equinocandinas.

SES/CCD/CD - 417/2020

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

## DEDICATÓRIA

Cristo.

“Que posso eu oferecer a Deus, o Senhor, por tudo de bom que ele me tem dado?” Salmos 116:12.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Deus pai, Deus filho e ao Espírito Santo. “Tudo de bom que fazemos, vêm de Deus”.

Aos meus pais pelo amor, inesgotável apoio e paciência.

Á Dra. Marcia Melhem pelo conhecimento compartilhado e confiança.

Ao Instituto Adolfo Lutz, ao Núcleo de Micologia, a Parasitologia e suas alunas, ao programa de Pós-graduação e todos seus funcionário e professores.

Aos amigos e colegas que conheci durante esse período, em especial Rosângela Garcia e Lidiane de Oliveira, pelo companheirismo.

Esse trabalho foi desenvolvido no Centro de Parasitologia e Micologia, Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, e teve apoio da Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo FAPESP 2018/18996-9) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior é uma fundação vinculada ao Ministério da Educação do Brasil - CAPES

## RESUMO

Candidemias caracterizam um grave problema de saúde pública em todo mundo pela alta mortalidade dos casos, onde as espécies apresentam variação epidemiológica e na sensibilidade aos antifúngicos. Objetivou-se demonstrar a frequência de espécies de *Candida*, enfatizando as espécies crípticas e caracterizar o perfil de sensibilidade antifúngica de cepas em casos de candidemia, internados em hospitais do estado de São Paulo, onde Instituto Adolfo Lutz é o laboratório de referência. As cepas, únicas de cada paciente, foram recebidas de 22 hospitais públicos gerais, filantrópico, escola e especializado em infectologia. A identificação fenotípica para determinação dos complexos deu-se por análise morfológica e bioquímica, por métodos auxanográficos. Para discriminar espécies crípticas aplicaram-se técnicas moleculares das mais simples às complexas, sendo elas: PCR, PCR-RFLP, MALDI-TOF e sequenciamento. Os antifúngicos utilizados nos testes de sensibilidade foram: fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina, anidulafungina e anfotericina B. Nos anos de 2017 e 2018, foram estudadas 144 cepas de candidemia com as seguintes espécies crípticas: *C. parapsilosis sensu stricto* (47/144; 32,6%), *C. orthopsilosis* (4/144; 2,7%), *C. metapsilosis* (2/144; 1,4%), *C. albicans* ssss (40/144; 27,8%), *C. dubliniensis* (2/144, 1,4%), *C. glabrata* (14/144; 9,7%), *C. haemulonii* (2/144; 1,4%), *C. haemulonii var. vulnera* (3/144; 2,1); *C. duobushaemulonii* (1/144; 0,7%) e *C. guilliermondii* (2/144; 1,4%). As demais espécies foram: *C. tropicalis* (21/144; 14,6%), *C. krusei* (4/144; 2,8%), *C. pelliculosa* (1/144; 0,7%) e *C. kefyr* (1/144; 0,7%). Para FCZ foram encontradas 3 cepas de *C. parapsilosis* (3/46; 6,5%; 0,12- $\geq$ 64  $\mu$ g/mL) e em uma de *C. tropicalis* (1/21; 4,76%; 64  $\mu$ g/mL) resistentes; observou-se uma cepa *non-wild type* de *C. guilliermondii* (1/2; 50%; 64  $\mu$ g/mL) e altos MICs para 2 cepas de *C. haemulonii var. vulnera* (2/3; 66,6%; 16-32  $\mu$ g/mL) e para a única cepa de *C. duobushaemulonii* (64  $\mu$ g/mL). Alta taxa de cepas *non-wild type* ao VCZ (6/14; 42,8%) foi encontrada em *C. glabrata*. Reafirma-se neste estudo que as espécies do complexo *C. haemulonii*, consideradas multirresistentes aos antifúngicos, despontam com maior frequência em nosso estado, se comparado aos dados da literatura. De acordo com os resultados obtidos, a identificação por métodos moleculares representou importante estratégia para demonstrar a variedade de espécies causais de candidemias e alertar para necessidade de terapias apropriadas. A determinação de espécies crípticas propensas à resistência pode ter impacto na sobrevivência de pacientes por fornecer subsídios para terapia empírica com base no perfil epidemiológico da candidemia em cada hospital, região e país.

**Palavras-chave:** candidemia; resistência antifúngica; *Candida haemulonii*; equinocandinas

## ABSTRACT

Candidemia is a serious public health problem worldwide due to the high mortality of the cases. The species present epidemiological diversity and different profiles of sensitivity to antifungals. The aim is to show the frequency of *Candida* species, emphasizing the cryptic species and to characterize the antifungal sensitivity profile of strains in cases of candidemia, admitted to hospitals in the state of São Paulo, where Adolfo Lutz Institute is the reference laboratory. The strains, unique to each patient, were received from 22 general public hospitals, philanthropic, school, and specialized in infectious diseases. The phenotypic identification to determine the complex was done by morphological and biochemical analysis, using auxanographic methods. To discriminate cryptic species, molecular techniques from the simplest to the most complex were applied, namely: PCR, PCR-RFLP, MALDI-TOF, and Sequencing. The antifungals used in the susceptibility tests were: fluconazole, voriconazole, caspofungin, micafungin, anidulafungin and amphotericin B. In the years 2017 and 2018, 144 strains of candidemia were studied with the following cryptic species: *C. parapsilosis sensu stricto ss* (47/144; 32.6%), *C. orthopsilosis* (4/144; 2.7%), *C. metapsilosis* (2/144; 1.4%), *C. albicans ssss* (40/144; 27.8%), *C. dubliniensis* (2/144, 1.4%), *C. glabrata* (14/144; 9.7%), *C. haemulonii* (2/144; 1.4%), *C. haemulonii var. vulnera* (3/144; 2.1); *C. duobushaemulonii* (1/144; 0.7%) and *C. guilliermondii* (2/144; 1.4%). The other species were: *C. tropicalis* (21/144; 14.6%), *C. krusei* (4/144; 2.8%), *C. pelliculosa* (1/144; 0.7%) and *C. kefyr* (1/144; 0.7%). Resistance to FCZ was found in 3 strains of *C. parapsilosis* (3/46; 6.5%; 0.12- $\rightarrow$  64  $\mu$ g / mL) and 1 of *C. tropicalis* (1/21; 4.76%; 64  $\mu$ g / mL) and non-wild type for a strain of *C. guilliermondii* (1/2; 50%; 64  $\mu$ g / mL) and high MICs for 2 *C. haemulonii var. vulnera* (2/3; 66.6%; 16-32  $\mu$ g / mL) and in the single strain of *C. duobushaemulonii* (64  $\mu$ g / mL). A high rate of non-wild type to VCZ (6/14; 42.8%) was found for *C. glabrata*. It is reaffirmed in this study that the species of the *C. haemulonii* complex, considered multiresistant to antifungals, appear more frequently in our state when compared to the literature data. According to the results, the identification by molecular methods becomes an important tool for the construction of surveillance strategies in hospitals. The determination of cryptic species prone to resistance may have an impact on patient survival by providing subsidies for empirical therapy based on the epidemiological profile of candidemia in each hospital, region, and country.

**Keywords:** candidemia; drug resistance; *Candida*; echinocandins

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AmB** – anfotericina B

**ANF** – anidulafungina

**ATCC** – *American Type Culture Collection*

**C. albicans** – *Candida albicans*

**CAS** – caspofungina

**CBS** – *Centraalbureau voor Sshimmelcultures*

**CDC** - *Centers for Disease Control and Prevention*

**C. dubliniensis** – *Candida dubliniensis*

**C. duobushaemulonii** – *Candida duobushaemulonii*

**C. glabrata** – *Candida glabrata*

**CHROMAgar** – meio cromogênico

**C. guilliermondii** – *Candida guilliermondii*

**C. haemulonii** – *Candida haemulonii*

**C. haemulonii var. vulnera** – *Candida haemulonii var. vulnera*

**C. krusei** – *Candida krusei*

**C. kefyr** – *Candida kefyr*

**C. metapsilosis** – *Candida metapsilosis*

**C. orthopsilosis** – *Candida orthopsilosis*

**C. parapsilosis** – *Candida parapsilosis*

**C. pelliculosa** – *Candida pelliculosa*

**C. pseudohaemulonii** – *Candida pseudohaemulonii*

**C. vulturna** – *Candida vulturna*

**CSLI** – *Clinical Laboratories Standards Institute*

**C. tropicalis** – *Candida tropicalis*

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**EDTA** – etilenodiamino tetra-acético

**Epidemiological Cutoff Values** – ECV

**EUCAST** – *European Committee for Antibiotic Susseptibility Testing*

**FCZ** – fluconazol

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IRAS** – infecções relacionadas à assistência à saúde

**ITS** – *internal transcribed spacer*

**ITZ** – itraconazol

**mL** – mililitro

**LACEN** – laboratório central de referência

**MALDI-TOF MS** – *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*

**MIC** – *Minimum inhibitory concentration* - Concentração inibitória mínima

**MICA** – micafungina

**µg** – micrograma

**MG** – média geométrica

**PCR** – *Polimerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da polimerase

**PDUI** – Plano de Desenvolvimento Urbano Integrado

**RFLP** – *Restriction Fragment Length Polymorphism* - Técnica do polimorfismo de comprimento de fragmentos

**ss** – *sensu stricto*

**SENTRY** – *Antifungal Surveillance Program*

**TBE** – Tris/Borato/EDTA

**VCZ** – voriconazol

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Exemplo de colônias de espécies de *Candida* em CHROMAgar *Candida*® para identificação presuntiva de complexo de espécies e verificação de pureza.....**24**

**Figura 2** - Placas de microtitulação e meio RPMI-1640, dentro de cabine de segurança biológica, para testes de sensibilidade a fármacos antifúngicos de cepas de *Candida* isoladas de corrente sanguínea.....**29**

**Figura 3** - Gráficos da distribuição de 144 cepas de *Candida*, por categoria de hospital de origem no Estado de São Paulo entre os anos de 2017-2018.....**31**

**Figura 4** - Distribuição dos municípios de origem de 144 cepas de *Candida* em casos de candidemia, Estado de São Paulo (2017-2018).....**33**

**Figura 5** – Gel de agarose dos produtos de PCR amplificados, para diferenciação das espécies *C. albicans* (C.A) e *C. dubliniensis* (C.D). Cepas controle positivo (+) das duas espécies; controle negativo (C-) e peso molecular com 100 pares de bases (P.M).....**35**

**Figura 6** – Gel de agarose dos produtos de PCR-RFLP amplificados para diferenciação das espécies *C. parapsilosis* ss (C.P), *C. orthopsilosis* (C.O) e *C. metapsilosis* (C.M). Cepas controle positivo (+) das 3 espécies; controle negativo (C-) e peso molecular com 100 pares de bases (PM).....**36**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Distribuição de complexos e espécies de *Candida* de corrente sanguínea, de 22 hospitais no estado de São Paulo, segundo ano de isolamento.....**34**

**Tabela 2** - Distribuição de espécies de 144 cepas de corrente sanguínea, obtidas de 22 hospitais, estado de São Paulo, Brasil, 2017-2018.....**35**

**Tabela 3** - Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 6 fármacos antifúngicos frente a 142 cepas sanguíneas de *Candida*, segundo espécie ou complexo, estado de São Paulo, 2017-2018.....**39**

**Tabela 4** - Síntese da sensibilidade de 144 cepas de *Candida*, isoladas de corrente sanguínea, provenientes de 18 hospitais, 2017-2018, São Paulo, Brasil.....**41**

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1** – Concentração inibitória mínima (MIC, em ug/mL) de 6 antifúngicos frente a 42 cepas de corrente sanguínea do complexo *C. albicans*. FCZ, fluconazol; VCZ, voriconazol; AmB, anfotericina B; CAS, caspofungina; MICA, micafungina; ANF, anidulafungina.....**45**

**Gráfico 2** - Concentração inibitória mínima (MIC, em ug/mL) de 6 antifúngicos frente a 40 cepas de corrente sanguínea de *C. albicans* ss. FCZ, fluconazol; VCZ, voriconazol; AmB, anfotericina B; CAS, caspofungina; MICA, micafungina; ANF, anidulafungina.....**45**

**Gráfico 3** - Concentração inibitória mínima (MIC em ug/mL) de 6 antifúngicos frente a 21 cepas de corrente sanguínea de *Candida tropicalis*. FCZ, fluconazol; VCZ, voriconazol; AmB, anfotericina B; CAS, caspofungina; MICA, micafungina; ANF, anidulafungina.....**46**

**Gráfico 4** - Concentração inibitória mínima (MIC em ug/mL) de 6 antifúngicos frente a 14 cepas de corrente sanguínea do complexo *C. glabrata*. FCZ, fluconazol; VCZ, voriconazol; AmB, anfotericina B; CAS, caspofungina; MICA, micafungina; ANF, anidulafungina.....**46**

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1 Espécies crípticas</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1.2 Epidemiologia</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2 Tratamento</b> .....	<b>18</b>
<b>1.3 Resistência a antifúngicos</b> .....	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 Objetivos gerais</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Origem das cepas</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2 Confirmação dos fenótipos</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3 Identificação molecular das cepas de complexos de espécies</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3.1 Análise de DNA</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3.2 Análise proteômica</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4 Teste de sensibilidade a antifúngicos</b> .....	<b>27</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>56</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* está entre aqueles que causam maior número de infecções na corrente sanguínea e é o segundo microrganismo mais comum em unidade de tratamento intensivo após *Staphylococcus aureus*, suscitando um grande número de hospitalizações e mortes, em diversos países ao redor do mundo (Pfaller e Castanheira, 2016). Uma vez comensais, esses microrganismos passam a causar infecções através de alterações fisiológicas que podem ser induzidas a partir do uso de imunossupressores ou pelo uso prolongado de antibióticos, em pacientes que passaram por procedimentos invasivos, que fazem uso de cateteres venosos ou de nutrição parenteral ou ainda que possuam doenças de base como distúrbios hematológicos, câncer e *diabetes mellitus* (Pappas et al., 2018; Nucci et al., 2010). As taxas de mortalidade pela micose, no Brasil, podem ultrapassar 50%, dependendo do estado de saúde do paciente, valor este superior ao de relatos na Europa e América do Norte. (Doi et al., 2016; Canela et al., 2018).

A candidemia é a infecção de corrente sanguínea induzida por fungos do gênero *Candida* spp. O número de casos é crescente, especialmente em hospitais terciários do Brasil, gerando alto custo financeiro e resultando em um problema de Saúde Pública no país (Wille et al., 2013). A frequência da doença varia em função da região geográfica, das características do paciente e das práticas hospitalares (Pfaller et al., 2019). Mais de 30 espécies já foram relacionadas à candidemia, contudo, apenas 5 são responsáveis pela extensa maioria (>92%) dos casos, sendo estas: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (Fu et al., 2017). A espécie *C. albicans sensu stricto* (ss) é responsável por mais de 50% das infecções, contudo, desponta o aumento de incidência de espécies não-*C. albicans*, em todo mundo (Lovero et al., 2016). Um exemplo é *C. glabrata* ss, comum na América do Norte e em países da Europa, que é apontada como um possível agente etiológico emergente no Brasil (Moretti et al., 2013; Pascualotto et al., 2008). Na África do Sul e Ásia também é evidenciado um grande número de casos de infecções por não-*C. albicans* (Kreuschsh e Karstaedt, 2013; Tan et al., 2015).

Algumas condições médicas subjacentes já foram descritas para os casos de candidemia. Infecções por *C. glabrata* ss e *C. krusei* estão relacionadas a transplantados de medula-óssea, *C. tropicalis* a pacientes neutropênicos e *C. parapsilosis* ao uso de cateteres, a recém-nascidos e às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (Pfaller e Castanheira, 2016).

Há escassez de dados sobre etiologia e perfil de sensibilidade das espécies causadoras de candidemia em nosso país, associada à pouca quantidade de estudos que empregaram técnicas moleculares para determinação exata das espécies, dentro de seus complexos. Assim, estudos que visem determinar, com exatidão, os agentes causais e eficácia *in vitro* de fármacos antifúngicos frente a esses agentes são importantes para manejo clínico e controle desse importante quadro.

### **1.1 Espécies crípticas**

As espécies de *Candida*, em regra, não se diferenciam muito estruturalmente, sendo difícil seu diagnóstico na rotina laboratorial por simples análise morfológica; logo, as provas fenotípicas com base em microscopia, devem ser complementadas com provas bioquímicas de assimilação, e principalmente, ensaios moleculares do DNA para determinação correta das espécies (Xavier et al., 2013).

A identificação acurada da etiologia da candidemia atende à demanda dos casos infectados e, também, representa subsídio importante para estudos epidemiológicos sobre distribuição das espécies em determinado período e local. As análises moleculares permitem discriminar espécies, cujos fenótipos são muito semelhantes ou idênticos. Estas espécies também apresentam diferentes perfis de sensibilidade a antifúngicos, sendo a sua discriminação importante para a clínica (Wickes e Wiederhold, 2018)

O complexo *C. albicans* é representado pelas espécies: *C. albicans* ss, que é a mais amplamente estudada; *C. dubliniensis*, descrita por Sullivan et al. (1995), comum em infecções de candidíase oral (Turner e Butler, 2014) e uma terceira espécie, *C. africana*, extremamente rara, descrita em 1995 como uma variação de *C. albicans sensu stricto* (ss), mas com incapacidade de formar clamidósporos (Romeo e Criseo, 2008).

Tavanti et al. (2005; 2007), analisando fenótipos de *C. parapsilosis*, verificaram polimorfismos e diferenças moleculares entre cepas dessa espécie, as quais foram, então, divididas em 3 grupos e, posteriormente, classificadas em 3 espécies distintas, dentro de um complexo, contendo: *C. parapsilosis* ss segunda espécie mais frequente de candidemia em vários países da América Latina, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Estas espécies possuem alterações genéticas que as tornam menos sensíveis aos antifúngicos da classe das equinocandinas, especialmente, *C. parapsilosis* ss (Castanheira et al., 2017).

A espécie *C. glabrata* ss tem reduzida sensibilidade ao fluconazol (FCZ) e outros azóis e algumas raras cepas podem apresentar resistência a equinocandinas (Katiyar et al., 2012). Possui duas espécies crípticas: *C. nivariensis* e *C. bracarensis* (Alcoba-florez et al., 2005; Correia et al., 2006), com prevalência desconhecida, possivelmente, abaixo de 1% (Lockhart et al., 2009).

Cendejas-Bueno et al. (2012) confirmaram o complexo *C. haemulonii* formado pelas espécies *C. haemulonii* ss (grupo I), *C. duobushaemulonii* (grupo II) e uma variação denominada *C. haemulonii var. vulnera*. Mais duas espécies menos descritas como parte do complexo podem ser agentes causadoras de candidemia, sendo elas: *C. vulturna* e *C. pseudohaemulonii* (Sugita et al., 2006; Sipizki e Tap et al., 2016). Apesar de alguns protocolos de Reação em cadeia da polimerase, *Polimerase chain reaction* - PCR serem propostos para a diferenciação de algumas espécies crípticas, as do complexo *C. haemulonii*, até o momento, só podem ser bem distinguidas por *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*-MALDI-TOF MS ou sequenciamento (Granfell et al., 2016). Essa condição

dificulta, ainda mais a sua identificação, pois são técnicas não acessíveis para a maioria dos laboratórios do Brasil. Além do que, as cepas desse complexo costumam exibir multirresistência a antifúngicos (anfotericina B e azóis) com grande variação nos perfis de sensibilidade entre as espécies (Ramos et al., 2018; Kim et al., 2009).

O complexo *C. guilliermondii*, ainda pouco estudado, é composto pelas espécies: *C. guilliermondii* ss (*Meyerozyma guilliermondii*), *C. carphophila* e *C. fermentati* (*Meyerozyma caribbica*) (Vaughan-Martini et al., 2005). Estas espécies são conhecidas pelo seu uso na área de biotecnologia, mas representam a 6ª espécie mais frequente em infecções invasivas e IRAS (De Marco et al., 2018; Taverna et al., 2019). Protocolos de identificação molecular estão publicados, sendo o teste padrão-ouro para sua identificação o sequenciamento, todavia MALDI-TOF MS é uma excelente ferramenta para identificação dessa espécie (Chao et al., 2014).

### 1.1.2 Epidemiologia

As espécies de *Candida* possuem distribuição mundial e o perfil epidemiológico destas sofre sutis mudanças. *C. albicans* s.s ainda permanece como espécie mais frequentemente isolada (correspondendo a 38-70% do número de casos nos estudos), mas com tendências de redução, abrindo espaço para o aumento no número de casos por espécies crípticas e raras (Guinea et al., 2014). *C. dubliniensis* e *C. africana* pertencentes ao complexo *C. albicans* são raras, sendo esta última ainda não descrita no Brasil. *C. dubliniensis* foi uma das espécies crípticas mais em evidência no Brasil e continua sendo isolada com uma taxa aproximadamente de 1%-2% no total do número de casos no país e sua identificação pode ser feita através de técnicas moleculares mais baratas como PCR, utilizando-se primers específicos (Cleveland et al., 2012; Turner e Butler, 2014; Moretti et al., 2013; Romeo e Criseo, 2011).

O complexo *C. glabrata* ocupa o segundo lugar em infecções invasivas nos Estados Unidos, todavia as espécies crípticas *C. nivariensis* e *C. bracarensis* são raras e seguem com prevalências abaixo de 1% (Bishop et al, 2008). *C. glabrata* ss é considerada uma espécie emergente na Europa, Ásia, América do Sul, bem como no Brasil onde sua prevalência é cerca de  $\geq 10\%$  em casos de candidemia (Moretti et al., 2013; Doi et al., 2016; Colombo et al., 2006; Nucci et al., 2013; Yang et al., 2017).

*C. parapsilosis* ss é uma das espécies mais comuns, juntamente *C. tropicalis*, em casos de candidemia e em infecções invasivas, incluindo neonatos, especialmente na América do Sul (Pfaller et al., 2019). *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* do complexo *C. parapsilosis* são as espécies crípticas mais isoladas somando juntas uma prevalência de até 10% (Bonfietti et al., 2012).

As limitações ao acesso às técnicas moleculares dificultam a estimativa das espécies crípticas de *Candida* refletindo principalmente em fungos que necessitam de métodos mais avançados de identificação, a exemplo do complexo *C. guilliermondii* que é significativo no Brasil, com taxas que variam entre 1-5%, porém suas espécies crípticas permanecem com prevalência não definida (Hinrichsen et al., 2008; Colombo et al., 2013; Doi et al., 2016).

*C. auris* é uma espécie multirresistente até o momento ainda não isolada no Brasil e a sua semelhança morfológica a faz ser frequentemente confundida com as espécies do complexo *C. haemulonii* que agora são muito mais frequentemente isoladas devido a emergência da *C. auris* (Kathuria et al., 2015).

## 1.2 Tratamento

Para o tratamento inicial dos casos de candidemias é recomendado o uso de antifúngicos da classe das equinocandinas; porém o alto custo de alguns desses fármacos, faz com que antifúngicos azólicos sejam opções

alternativas, principalmente, em locais com poucos recursos (Pappas et al., 2016).

Os azóis são classificados de acordo com o tipo de heteroátomo, sendo os triazóis os mais amplamente usados na clínica, devido à segurança, disponibilidade oral e intravenosa. O modo de ação dessa classe de fármacos é a inibição da 14- $\alpha$ -demetilase, uma enzima dependente do citocromo p450, necessária para a conversão do lanosterol em ergosterol, tipo de colesterol presente na membrana das células fúngicas. Os triazóis de primeira geração são FCZ e itraconazol (ITZ). O FCZ é o mais utilizado na maioria dos países, tanto como antifúngico de primeira escolha como em profilaxia. Já o ITZ não é indicado como terapia da candidemia. Em casos de resistência ao FCZ, como ocorre em *C. krusei* e *C. glabrata* ss, opta-se por um azol de segunda geração, o voriconazol (VCZ), que também possui boa biodisponibilidade e amplo espectro. (Maertens et al., 2004; Papas et al., 2016).

A anfotericina B (AmB) é o fármaco usado em casos graves de infecções fúngicas. AmB pertence à classe dos polienos, com diversas ligações duplas conjugadas de carbono. AmB anela-se ao ergosterol, criando poros na membrana plasmática que permitem a perda e entrada de íons, induzindo à morte celular. AmB possui formulações lipídica, lipossomal e a desoxicolato. Todas são potentes e com amplo espectro, todavia a forma sódica tem alta nefrotoxicidade, tornando seu uso restrito e em vias de desuso em países desenvolvidos (Baginski et al., 2009; Papas et al., 2016).

Equinocandinas formam a classe mais nova de antifúngicos, composta por: caspofungina (CAS), micafungina (MICA) e anidulafungina (ANF). Tem boa distribuição em tecidos e fluidos, com forte ação terapêutica. Equinocandinas agem na parede celular, interferindo na formação da 1,3 beta-glucana, importante para a estruturação da parede celular fúngica; são assim consideradas uma opção de tratamento primordial, especialmente em casos de resistência a outros antifúngicos (Cannon et al., 2009; Papas et al., 2016).

### 1.3 Resistência aos antifúngicos

A resistência fúngica é definida como a incapacidade de um fármaco em erradicar uma infecção. Pode ser dividida em resistência primária (intrínseca), quando ocorre naturalmente, e secundária (adquirida), que ocorre através da exposição prolongada a antifúngicos (Kanafani e Perfect, 2010).

Resistência em alguns membros do gênero *Candida*, aos fármacos antifúngicos, é descrita no mundo todo, tornando o seu tratamento um desafio aos profissionais de saúde (Cleveland et al., 2012). Cepas de *C. krusei* são, intrinsecamente, resistentes ao FCZ e cepas de *C. glabrata* ss desenvolvem resistência a esse fármaco muito rapidamente após exposição (Menezes, Mendes e Cunha, 2009; Silva et al., 2015).

Conhecer o perfil de sensibilidade antifúngica é primordial para orientação terapêutica, controle e elaboração de medidas profiláticas. Para isto são usados testes *in vitro* com fármacos, de modo a identificar cepas resistentes através da determinação da Concentração inibitória mínima, *minimum inhibitory concentration* (MIC). Atualmente, há métodos de referência para realização de tais provas como o desenvolvido pelo instituto norte americano *Clinical Laboratories Standards Institute* (CLSI) e o do comitê europeu *European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST), que teve como base o CLSI, normatizando técnicas laboratoriais e alguns *breakpoints* (pontos de corte) para separar cepas sensíveis das resistentes a determinados fármacos. Porém, alguns antifúngicos frente a algumas espécies ainda não possuem seus *breakpoints* definidos, dificultando a caracterização do perfil de sensibilidade antifúngica das cepas (Cuesta et al., 2010). Para as espécies onde não há *breakpoints* definidos pode-se recorrer aos Pontos de corte epidemiológicos, *Epidemiological Cutoff Values* - ECV que classificam as cepas em *wild type*, aquelas onde nenhum mecanismo de mutação foi encontrado e *non-wild type*, aquelas cujos mecanismos de mutação foram encontrados. Ainda assim, há limitações para os ECVs, pois não podem ser usados para correlação clínica. Além disto, há espécies como as do complexo *C. haemulonii* que não possuem nem *breakpoints* nem ECVs,

dificultando mais ainda sua classificação em sensível ou resistente (Lockhart, Ghannoum e Alexander, 2017).

A resistência aos azóis é mediada principalmente por quatro mecanismos, descritos em *Candida* spp, podendo em alguns casos serem encontrados mais de um mecanismo agindo juntos, sendo eles: a diminuição da concentração intracelular de antifúngicos por bombas de efluxo, codificadas principalmente pelos genes CDR e MDR. Esse mecanismo de resistência ocorre em *C. albicans* ss e é, também, um dos principais em cepas de *C. glabrata* ss. Outro mecanismo é a alteração da enzima-alvo dos fármacos azólicos, regulada por mutações no *erg11*, que ocorre em cepas de *C. krusei*. O aumento das enzimas alvo dos antifúngicos azólicos, também, é uma forma discreta de resistência a azóis. O desenvolvimento de mecanismos, regulados pelo *erg3*, que leva à substituição do ergosterol por outros componentes na membrana, fazem com que o antifúngico perca seu sítio de ligação natural e fique inativo (Berkow et al., 2015).

Cepas resistentes à AmB são raras, na maioria das espécies, com exceção de cepas de *C. lusitanae*, cepas do complexo *C. haemulonii* e cepas de *C. guilliermondii*, que podem apresentar altos valores de MIC. A resistência aos polienos tem relação com alterações na estrutura do ergosterol, a sua diminuição ou mascaramento na membrana das células (Shaughnessy, Lyman e Walsh, 2009)

Estudos têm relatado casos, ainda que raros, de resistência às equinocandinas, especialmente em cepas dos complexos *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Cleveland et al., 2012; Castanheira et al., 2017). Esses casos ainda estão sendo investigados e a resistência está relacionada ao gene *fks1* que codifica 1,3 beta-glucana da parede celular e *fks2* em *C. glabrata* (Katiyar et al., 2012).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar as espécies de *Candida* e determinar seu perfil de sensibilidade a antifúngicos de cepas provenientes de corrente sanguínea de pacientes internados em hospitais do estado de São Paulo.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar as espécies crípticas de 5 complexos de *Candida* em cepas sanguíneas mantidas em uma coleção de cultura, com utilização de ferramentas moleculares;
- Comparar a frequência de espécies crípticas e demais espécies de *Candida*, envolvidas em casos de candidemia durante o período;
- Avaliar a sensibilidade das cepas frente aos antifúngicos: fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina, anidulafungina e anfotericina B.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Origem das cepas

As cepas utilizadas no estudo são da coleção de culturas do Núcleo de Micologia do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, onde estavam armazenadas em leite desnatado sob temperatura de -20°C. Todas as cepas eram oriundas da rotina de hemoculturas para pacientes internados em hospitais do Estado de São Paulo. Cepas únicas de cada paciente foram selecionadas pelo período de entrada no Núcleo, compreendido entre janeiro de 2017 a dezembro de 2018.

#### 3.2 Confirmação dos fenótipos

Os isolados, antes de serem incorporadas à micoteca, foram identificados, em gênero e complexo de espécie, através de métodos fenotípicos clássicos (Walsh, Larone e Hayden, 2018). Foram então descongelados e recuperados em ágar para avaliação de cor, pureza e viabilidade das células. Para tanto, uma suspensão de cada cepa, com turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, foi semeada por técnica de esgotamento da alça, na superfície de meio cromogênico (CHROMAgar *Candida*®, BD, EUA) distribuído em placas de Petri. As placas inoculadas foram incubadas a 35 °C por 48 h a 96 h e, após incubação, observou-se a coloração adquirida pelas colônias. Confirmou-se que as colônias do complexo *C. albicans* adquiriram coloração esverdeada, as do complexo *C. glabrata* a cor rósea clara e brilhante, as dos fenótipos de *C. haemulonii* a coloração rósea e aspecto brilhante, as colônias do complexo *C. parapsilosis* a cor bege ou rósea, *C. tropicalis* a cor azul e *C. krusei* a cor rósea clara e aspecto seco. Para controle o desempenho do ágar cromogênico foi utilizado cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC), *C.*

*albicans* (ATCC 90028), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258).

Outras técnicas complementares foram utilizadas em todas as cepas de espécie não-*C. albicans*, como métodos auxanográficos e análise morfológica em ágar fubá.



**Figura 1.** Exemplo de colônias de espécies de *Candida* em CHROMAgar *Candida*® para identificação presuntiva de complexo de espécies e verificação de pureza

### 3.3 Identificação molecular das cepas de complexos de espécies

#### 3.3.1 Análise do DNA das cepas

Foram utilizados métodos moleculares dos mais simples aos complexos para a determinação das espécies crípticas. Para os complexos que possuíam protocolos de identificação bem estabelecidos para PCR, PCR-RFLP e PCR multiplex como os complexos *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* optou-se por estas técnicas, consecutivamente. Para os complexos *C. haemulonii* and *C. guilliermondii*, que exigem obrigatoriamente o uso de técnicas mais avançadas, optou-se pelo uso do MALDI-TOF MS.

Para PCR e PCR-RFLP as extrações de DNAs foram realizadas, manualmente, segundo Green e Sambrook (2012). Algumas colônias de leveduras de 24h a 48h, de crescimento em ágar Sabouraud, foram removidas

com alça descartável, para um microtubo tipo *Eppendorf* contendo 1 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 50 mM.

Os microtubos foram centrifugados em microcentrífuga a 10.000 rpm por 15'. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi adicionado 1 mL de EDTA 50 mM. Este processo de lavagem foi repetido até que o sobrenadante ficasse límpido. Na última lavagem foi deixado o sedimento que foi ressuspenso em 200 µL de EDTA 50 mM e adicionado de 40 µL da enzima de *Trichoderma harzianum* para a sensibilização da parede celular. A suspensão foi, então, incubada em banho maria a 37 °C por 2h à 3h.

Após incubação o microtubo foi centrifugado por 5' e, posteriormente, o sobrenadante foi desprezado. Ao produto obtido foi adicionado 300µL de tampão de lise. Após homogeneização utilizando *vortex*, o material foi incubado em banho maria a 50 °C por 2h, com agitação em *vortex* a cada 30'. O material foi, então, centrifugado por 5' e o sobrenadante foi retirado para outro microtubo. Ao sobrenadante foram adicionados 300 µL de clorofórmio (24:1 clorofórmio/ isopropanol) para promover a precipitação das proteínas. Após centrifugação por 15', houve a formação de três fases. A fase aquosa (parte superior) foi retirada para outro microtubo adicionando-se 300 µL de isopropanol para promover a precipitação do DNA. O material foi centrifugado por 10' a 10.000 rpm e o sobrenadante foi desprezado. Ao sedimento foram adicionados 300 µL de etanol a 70%. Após centrifugação por 10' a 10.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado. Após secagem do sedimento contendo DNA, o mesmo foi ressuspenso com 50 µL de H<sub>2</sub>O com RNase e mantido freezer a -20°C até sua utilização.

Para determinação da concentração e verificação da pureza do DNA foi utilizado equipamento *NanoDrop* 1000. Para verificar se houve extração, as amostras de DNA genômico foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (2%) e as bandas resultantes foram coradas com brometo de etídio.

Para a diferenciação do complexo *C. albicans* e as espécies crípticas: *C. dubliniensis* e *C. albicans* ss, foi realizada PCR utilizando par de *primer*: CR-f 5'- GCTACCACTTCAGAATCATCATC-3' e CR-r 5' GCACCTTCAGTCGTAGAGACG-3', nas seguintes condições de

amplificação: desnaturação inicial 95°C por 5' seguido de 30 ciclos: desnaturação 94 °C por 45", anelamento 58 °C por 40", extensão 72 °C por 55" e extensão final 72 °C por 10' (Romeo e Criseo, 2008). Cepas-padrão oriundas da coleção holandesa de referência *Centraalbureau voor Sshimmelcultures* (CBS), como *C. dubliniensis* (CBS 9768) e *C. albicans* (ATCC 90028) foram utilizadas como controle positivo. Para o controle negativo usou-se apenas mistura de água e *master mix*.

Para diferenciação entre *C. parapsilosis* ss, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* foi utilizada técnica de PCR-RFLP, segundo Tavanti et al. (2005). Para PCR-RFLP foi amplificado o fragmento *SADH*, utilizando-se par de *primer* S1F: 5' GTTGATGCTGTTGGATTGT-3' e S1R: 5'-CAATGCCAAATCTCCCAA-3', nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C por 2', 30 ciclos de 94 °C por 1'; 50 °C por 1'; 72 °C por 1' e extensão final de 10' a 72 °C. Os produtos do PCR foram digeridos com enzima de restrição *BanI*, em tampão específico da enzima por 90'. Após amplificação, os produtos do PCR-RFLP foram diluídos em tampão de amostra (30% glicerol; 0,25% xilenocianol; 0,25% azul de bromofenol) e aplicadas em gel (2%) de agarose em Tris/Borato/EDTA (TBE) contendo 0,5 mg/L de brometo de etídio. As amostras foram submetidas à eletroforese, em sistema horizontal contendo TBE, durante 50 minutos a 100 V e 400 A. Os géis foram observados em transiluminador sob a luz ultravioleta. Para o controle positivo: *C. parapsilosis* ss (ATCC 22019), *C. metapsilosis* ATCC 96144 e *C. orthopsilosis* ATCC 96141.

Para diferenciação de *C. glabrata* ss, *C. nivariensis* e *C. bracarensis*, primeiramente, foi realizada PCR com par de *primer* específico para *C. glabrata* CGL1: 5'-TTA TCA CAC GAC TCG ACA CT-3' e CGL2: 5'-CCC ACA TAC TGA TAT GGC CTA CAA-3', nas seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 94 °C por 5', 40 ciclos de 94 °C por 30"; 58 °C por 30"; 72 °C por 30" e extensão final de 10' a 72 °C (Luo e Mitchell, 2002). As cepas que não apresentaram bandas foram submetidas a PCR multiplex com os *primers* senso NIV-f (5'- AGGGAGGAGTTTGTATCTTTCAAC-3' e senso BRA-f 5'- GGGACGGTAAGTCTCCCG-3') e antissenso universal UNI- 5.8S

(5' -ACCAGAGGGCGCAATGTG- 3'), nas seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 94 °C por 5', 34 ciclos de 94 °C por 30"; 60 °C por 40"; 72 °C por 50" e extensão final de 10' a 72°C (Romeo et al., 2009).

### 3.3.2 Análise proteômica

As cepas do complexo *C. haemulonii* e *C. guilliermondii* foram analisadas através do MALDI-TOF MS, seguindo a metodologia Bruker. O procedimento de extração com etanol-ácido fórmico foi seguido de acordo com o protocolo do fabricante para identificação de isolados de leveduras. Os espectros foram analisados usando o software Flex Control 3.1 (Bruker Daltonics, Inc., Billerica, MA, EUA) e o MALDI Biotyper OC versão 3.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os valores dos escores foram analisados de acordo com as recomendações do fabricante: um escore  $\geq 2$  indicava confiança no nível da espécie, 1,7 a 1,99 indicava confiança no nível do gênero e  $< 1,7$  indicava nenhuma identificação (Kathuria et al., 2015).

### 3.4 Teste de sensibilidade a antifúngicos

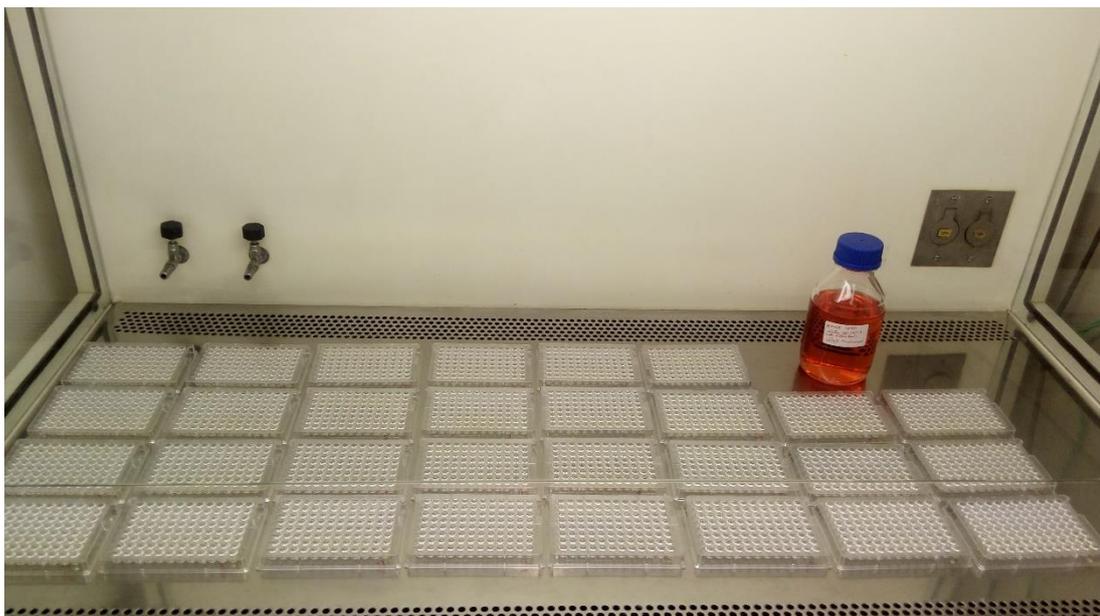
A sensibilidade das leveduras foi determinada *in vitro*, pelo método de microdiluição em caldo segundo método CLSI descrito nos documentos M27-Ed4 (CLSI, 2017). Os resultados dos testes foram expressos em MIC. O meio de cultura usado na prova foi o RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, EUA), sem bicarbonato de sódio e com L-glutamina. Utilizaram-se os antifúngicos: AmB (SIGMA, St. Louis, EUA), FCZ (*Pfizer Laboratories*), VCZ, MCF, ANF e CAS.

A solução-mãe de FCZ na concentração de 5120  $\mu\text{g/mL}$  foi preparada em água destilada e os demais antifúngicos na concentração de 1600  $\mu\text{g/mL}$  em DMSO (dimetilsulfóxido de sódio). As soluções de uso, para serem

colocadas nas placas de microtitulação foram preparadas de modo que as concentrações finais dos antifúngicos, após a adição do inóculo de levedura, foram de 64 µg/mL a 0,12 µg/mL para FCZ e de 8 µg/mL a 0,015 µg/mL para os demais. Cada antifúngico foi distribuído em alíquotas de 100 µL, em uma placa de microtitulação, desde a coluna 2 até a 11, correspondendo cada coluna a uma concentração. As placas foram congeladas à temperatura de -70 °C até o momento do uso, por período máximo de 6 meses.

Para os testes, um inóculo de cada cepa foi preparado como suspensão salina em concentração de 1 a 5 x 10<sup>6</sup> ufc/mL. Alíquotas de 100 µL de cada inóculo foram colocadas nos poços das placas contendo antifúngicos. Em cada placa foram colocados inóculos de 6 leveduras, sendo as 2 últimas fileiras destinadas às cepas-padrão, *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258), para controle interno de qualidade do teste. O controle de esterilidade do meio de cultura foi realizado na coluna 1, constituído apenas de meio RPMI, sem antifúngico e sem inóculo. O controle de crescimento, ou controle positivo, foi colocado na coluna 12, sendo preparado com 100 µL de RPMI e 100 µL de inóculo de cada cepa. As placas foram, então, tampadas e incubadas a 35°C, em estufa bacteriológica. A leitura de turbidez, resultante do crescimento das cepas, foi realizada em 24 h (Figura 2). O ponto de leitura que indica o MIC foi o que permitiu inibição de 50% ou mais (*inhibition concentration* ou IC50) do crescimento de cada cepa, em relação ao seu controle positivo. Para AmB o ponto de leitura foi o que inibiu 100% (IC100) do crescimento de cada cepa.

Os *breakpoints* usados foram os estabelecidos pelo CLSI no documento M60 (CSLI, 2017) os *cutoff* epidemiológicos adotados no estudo foram àqueles recomendados pelo CLSI no documento M59 (CSLI, 2017) e por Pfaller e Diekema, (2012).



**Figura 2.** Placas de microtitulação e meio RPMI-1640, dentro de cabine de segurança biológica, para testes de sensibilidade a fármacos antifúngicos de cepas de *Candida* isoladas de corrente sanguínea.

## 4.RESULTADOS

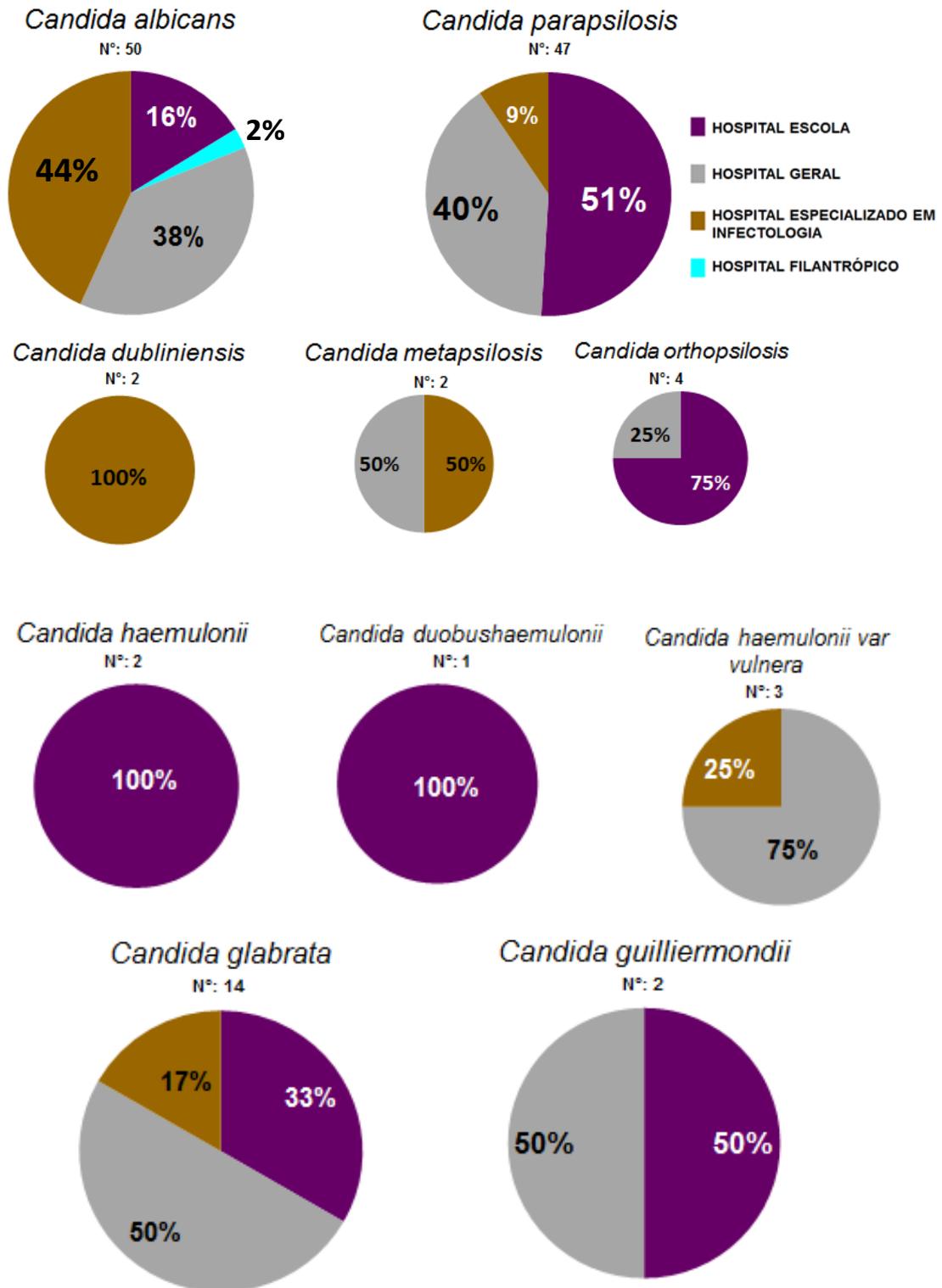
Foram incluídas nesse estudo 144 cepas provenientes de 22 hospitais, majoritariamente públicos (95,4%; 21/22), dentre eles: 11 (50%; 11/22) hospitais gerais, 9 (40,9%; 9/22) hospitais escola e 1 (4,5%; 1/22) hospital especializado em doenças infecciosas. Além disso, 1 (4,5%; 1/22) hospital era filantrópico de administração público-privada. As cepas originaram-se de 14 municípios localizados no Estado de São Paulo, distribuídos nas seguintes regiões: metropolitana (50%; 7/14), interior (35,8%; 5/14), litoral (7,1%; 1/14) e capital (7,1%; 1/14) (Figura 4).

As cepas de *C. albicans* ss foram encontradas em todos os hospitais classificados: hospital especializado (44%; 22/50), hospitais gerais (38%; 19/50), hospitais escola (8/50; 16%) e hospital filantrópico (2%; 1/50). As cepas de *C. dubliniensis* apenas foram encontradas apenas no hospital especializado.

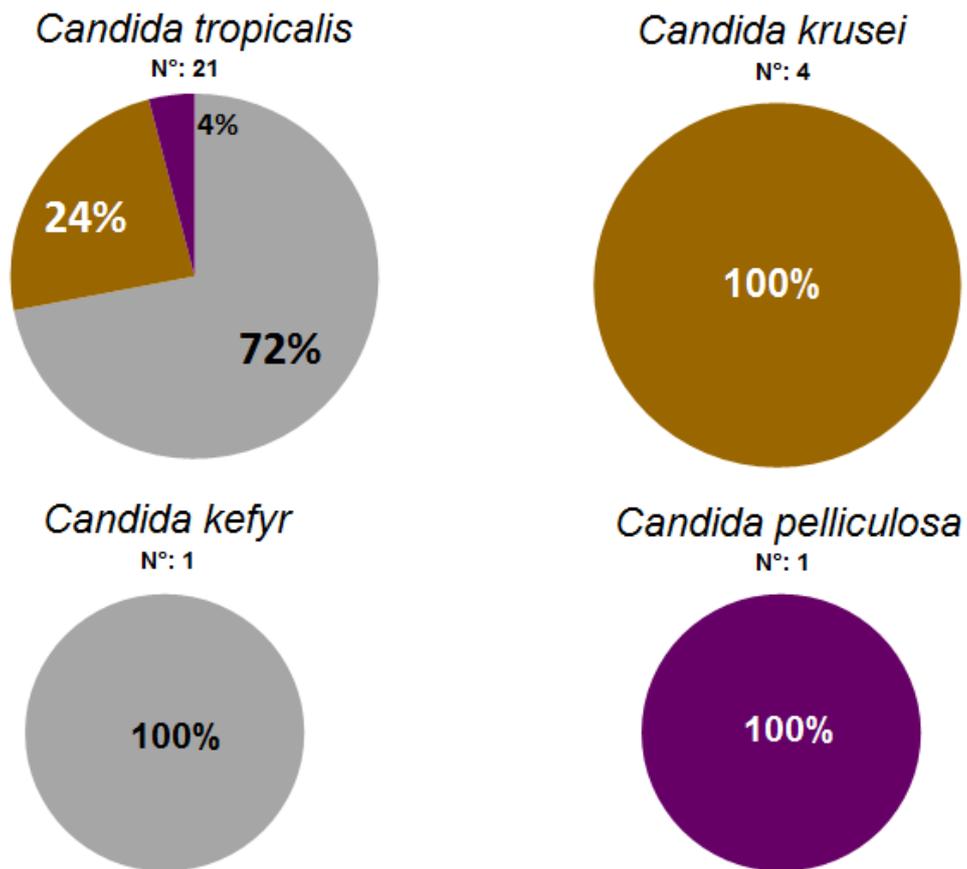
Já as cepas de *C. parapsilosis* ss foram oriundas de: hospitais escolas (51%; 24/47), hospitais gerais (40%; 19/47) e hospital especializado (9%; 4/47). As Cepas de *C. orthopsilosis* foram provenientes de: hospitais escolas (75%; 3/4) e hospital geral (25%; 1/4). Bem como amostras de *C. metapsilosis*: hospital escola (50%; 1/2) e hospital geral (50%; 1/2).

Cepas do *C. glabrata* ss foram encontradas em hospitais gerais (50%; 7/14), hospitais escola (33%; 5/14) e hospital especializado (17%; 2/14). As cepas de *C. haemulonii* ss e *C. duobushaemulonii* foram unicamente relacionadas a hospitais escolas. Já *C. haemulonii var vulnera* foi isolada de hospitais gerais (75%; 2/3) e hospital especializado (25%; 1/3).

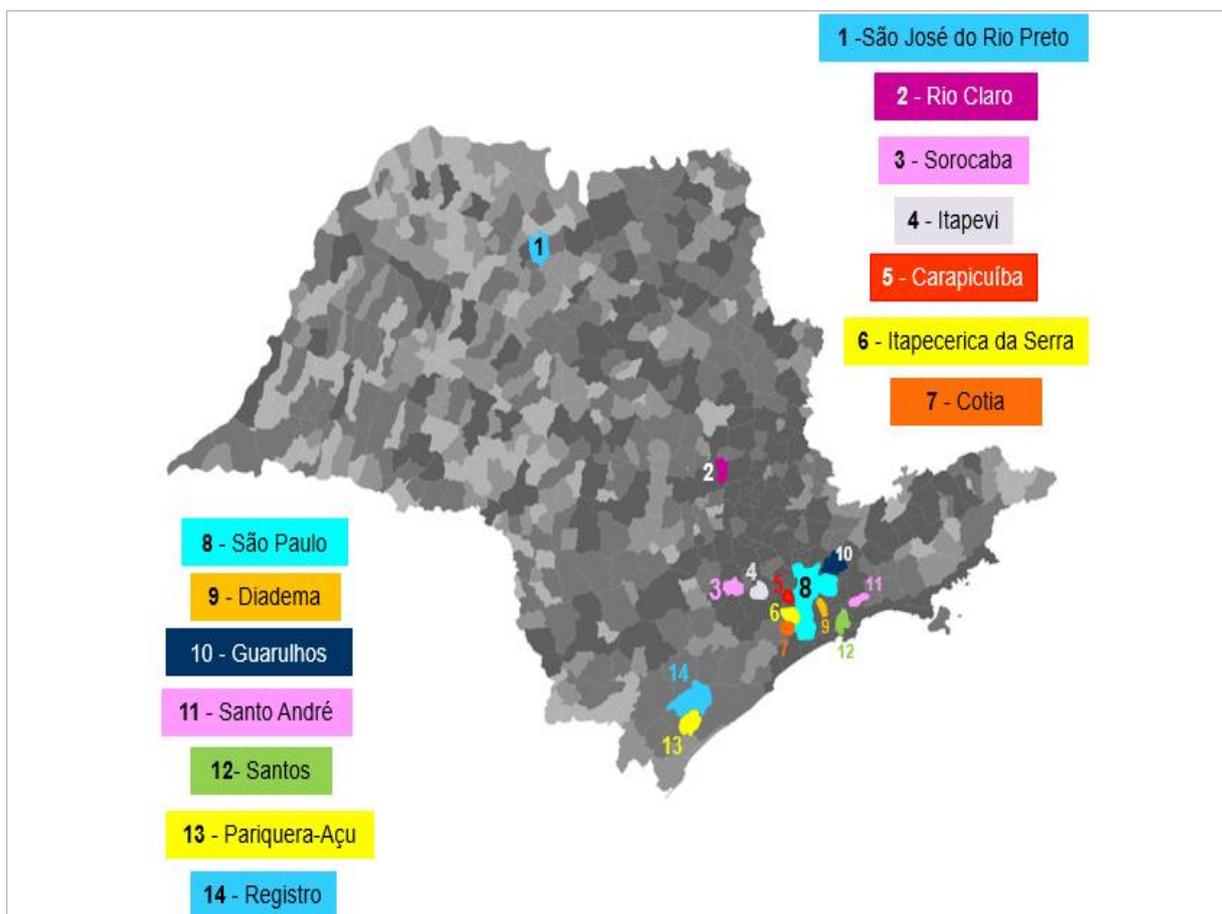
As duas cepas de *Candida guilliermondii* ss foram provenientes de um hospital escola (50%; 1/2) e um hospital geral (50%; 1/2). As cepas de *C. tropicalis* foram provenientes de hospitais gerais (72%; 15/21), especializado (24%; 5/21) e escola (4%; 1/21). Ademais, cepas de *C. krusei* foram unicamente advindas de hospital especializado, bem como as cepas únicas de *C. kefyr* e *C. pelliculosa* foram encontradas em hospital geral e hospital escola, respectivamente.



**Figura 3.** Distribuição de 144 cepas de *Candida*, por categoria de hospital de origem no Estado de São Paulo, entre os anos de 2017-2018



**Figura 3 cont.** Distribuição de 144 cepas de *Candida*, por categoria de hospital de origem no Estado de São Paulo, entre os anos de 2017-2018



**Figura 4.** Municípios dos hospitais de origem de 144 cepas de *Candida* em casos de candidemia, Estado de São Paulo (2017-2018)

\*As informações sobre a localização geográfica foram obtidas através do Instituto de Geografia e estatística (IBGE, 2019) e do Plano de Desenvolvimento Integrado (PDUI, 2019).

Dentre as 144 cepas de candidemia, 121 (84,02%) eram pertencentes a 5 complexos de espécies com predomínio do complexo *C. parapsilosis* (36,8%; 53/144), complexo *C. albicans* (29,1%; 42/144), complexo *C. glabrata* (9,7%; 14/144), seguido do complexo *C. haemulonii* (4,2%; 6/144) e complexo *C. guilliermondii* (1,4%; 2/144) (Tabela 1).

As demais espécies do gênero *Candida*, obtidas de hemoculturas no mesmo período, foram: *C. tropicalis* (14,6%; 21/144), *C. krusei* (2,8 %; 4/144), *C. kefyr* (0,7%; 1/144) e *C. pelliculosa* (0,7%; 1/144) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Distribuição de complexos e espécies de *Candida* de corrente sanguínea, segundo ano de isolamento em 22 hospitais no estado de São Paulo,

ESPÉCIES	2017	2018	TOTAL N (%)
Complexo <i>C. parapsilosis</i>	36	17	53 (36,8%)
Complexo <i>C. albicans</i>	27	15	42 (29,1%)
<i>C. tropicalis</i>	11	10	21 (14,6%)
Complexo <i>C. glabrata</i>	9	5	14 (9,7%)
Complexo <i>C. haemulonii</i>	3	3	6 (4,2%)
<i>C. krusei</i>	1	3	4 (2,8%)
Complexo <i>C. guilliermondii</i>	1	1	2 (1,4%)
<i>C. kefyr</i>	0	1	1 (0,7%)
<i>C. pelliculosa</i>	1	0	1 (0,7%)
<b>TOTAL</b>	<b>89</b>	<b>55</b>	<b>144 (100%)</b>

Dentre as 42 cepas (29,1%; 42/144) identificadas fenotipicamente como pertencentes ao complexo *C. albicans*, através da PCR, 40 (27,7%; 40/144) foram confirmadas como *C. albicans* ss e 2 (1,4%; 2/144) como *C. dubliniensis* (Tabela 2).

As análises de PCR-RFLP das 52 cepas (36,8%; 52/144) do complexo *C. parapsilosis* confirmaram 47 (32,6%; 47/144) como *C. parapsilosis* ss, 4 (2,7%; 4/144) cepas como *C. orthopsilosis* e 2 (1,4%; 2/144) cepas como *C. metapsilosis* (Tabela 2).

A espécie *C. glabrata* ss (9,7%; 14/144) foi a única espécie representante de seu complexo, de igual forma *C. guilliermondii* ss (1,4%; 2/144) (Tabela 2).

As 6 cepas (4,2%; 6/144) do complexo *C. haemulonii*, através do MALDI-TOF foram discriminadas e confirmadas como sendo 2 (1,4%; 2/144) *C. haemulonii* ss, 3 (2,1%; 3/144) *C. haemulonii* var. *vulnera* e 1 (0,7%; 1/144) como *C. duobushaemulonii* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distribuição de espécies de 144 cepas de corrente sanguínea, obtidas de 22 hospitais, estado de São Paulo, Brasil, 2017-2018.

ESPÉCIES	ANO DE ISOLAMENTO		TOTAL
	2017	2018	
<i>C. parapsilosis</i> ss	33	14	47 (32,6%)
<i>C. orthopsilosis</i>	2	2	4 (2,8%)
<i>C. metapsilosis</i>	1	1	2 (1,4%)
<i>C. albicans</i> ss	25	15	40 (27,7%)
<i>C. dubliniensis</i>	2	0	2 (1,4%)
<i>C. tropicalis</i>	11	10	21 (14,6%)
<i>C. glabrata</i> ss	9	5	14 (9,7%)
<i>C. haemulonii</i> ss	0	2	2 (1,4%)
<i>C. haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>	3	0	3 (2,1%)
<i>C. duobushaemulonii</i>	0	1	1 (0,7%)
<i>C. krusei</i>	1	3	4 (2,8%)
<i>C. guilliermondii</i> ss	1	1	2 (1,4%)
<i>Candida kefyr</i>	0	1	1 (0,7%)
<i>Candida pelliculosa</i>	1	0	1 (0,7%)
<b>TOTAL</b>	<b>89</b>	<b>55</b>	<b>144 (100%)</b>



**Figura 5.** Gel de agarose dos produtos de PCR amplificados, para diferenciação das espécies *C. albicans* (C.A) e *C. dubliniensis* (C.D). Cepas controle positivo (+) das duas espécies; controle negativo (C-) e peso molecular com 100 pares de bases (P.M)



**Figura 6.** Gel de agarose dos produtos de PCR-RFLP amplificados para diferenciação das espécies *C. parapsilosis* ss (C.P), *C. orthopsilosis* (C.O) e *C. metapsilosis* (C.M). Cepas controle positivo (+) das 3 espécies; controle negativo (C-) e peso molecular com 100 pares de bases (PM)

Os testes de sensibilidade antifúngica frente a 6 antifúngicos totalizaram 1.728 experimentos, além dos testes com cepas-padrão.

A distribuição dos MICs por espécie está apresentada na Tabela 3. A relação numérica e valores de MIC para cada cepa, individualmente, estão relatadas no Apêndice 1. Os valores de Média geométrica (MG), moda, MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> e intervalo das espécies estão contidos na Tabela 4. Os gráficos com a distribuição dos MICs de algumas espécies estão nos gráficos 1, 2, 3 e 4.

Segundo os *breakpoints* adotados, foram encontradas 3 cepas de *C. parapsilosis* resistentes ao FCZ. Os valores de MIC<sub>50</sub> e intervalos foram de 0,5 e 0,12- $\geq$ 64  $\mu$ g/mL, 0,03 e  $\leq$ 0,015-0,5  $\mu$ g/mL para o VCZ, 0,5 e  $\leq$ 0,015-2  $\mu$ g/mL para AmB, 0,12 e  $\leq$ 0,015-0,25  $\mu$ g/mL para CAS, 0,25 e  $\leq$ 0,015-2  $\mu$ g/mL para MICA, 0,5 e  $\leq$ 0,015-2  $\mu$ g/mL para ANF, respectivamente.

Para as espécies crípticas *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* o intervalo de MICs das duas espécies juntas foram de: 0,5-2  $\mu$ g/mL para FCZ,  $\leq$ 0,015-0,03  $\mu$ g/mL para VCZ, 0,06-1  $\mu$ g/mL para AmB,  $\leq$ 0,015-0,25  $\mu$ g/mL para CAS,  $\leq$ 0,015-0,5  $\mu$ g/mL para MICA, 0,015-0,25  $\mu$ g/mL para ANF.

Não foram encontradas cepas resistentes de *C. albicans* ss. Os valores de MIC<sub>50</sub> e intervalos foram respectivamente de 0,25 e 0,12-2  $\mu$ g/mL para FCZ,  $\leq$ 0,015 e  $\leq$ 0,015-0,12  $\mu$ g/mL para VCZ, 1 e 0,03-1  $\mu$ g/mL para AmB,

0,12 e  $\leq 0,015$ -0,12  $\mu\text{g/mL}$  para CAS,  $\leq 0,015$  e  $\leq 0,015$ -0,5  $\mu\text{g/mL}$  para MICA e  $\leq 0,015$  e  $\leq 0,015$ -0,03  $\mu\text{g/mL}$  para ANF.

Para *C. dubliniensis* os MICs situaram-se em intervalos de  $\leq 0,015$ -0,03  $\mu\text{g/mL}$  para FCZ, 0,5-1  $\mu\text{g/mL}$  para VCZ, 0,12-0,25  $\mu\text{g/mL}$  para CAS e valores de  $\leq 0,015$   $\mu\text{g/mL}$  para MICA e ANF, respectivamente.

Uma cepa de *C. tropicalis* apresentou resistência cruzada ao FCZ ( $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ ) e VCZ (8  $\mu\text{g/mL}$ ). Os valores de MIC<sub>50</sub> e intervalo foram respectivamente, 1 e 0,12- $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$  para FCZ, 0,06 e  $\leq 0,015$ -8  $\mu\text{g/mL}$  para VCZ, 1 e 0,25-1  $\mu\text{g/mL}$  para AmB, 0,12 e 0,03-0,25  $\mu\text{g/mL}$  para CAS, 0,03 e  $\leq 0,015$ -0,25  $\mu\text{g/mL}$  para MICA e  $\leq 0,015$   $\mu\text{g/mL}$  para ANF.

Três cepa de *C. glabrata* ss apresentou resistência cruzada aos fármacos FCZ e VCZ e 4 (28.57%) foram *non-wild type* ao VCZ (0,5-4  $\mu\text{g/mL}$ ). Para essa espécie o MIC<sub>50</sub> e os intervalos de MIC foram, respectivamente, de: 32 e 4- $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$  para FCZ, 0,06 e  $\leq 0,015$ -4  $\mu\text{g/mL}$  para VCZ, 1 e 0,25-1  $\mu\text{g/mL}$  para AmB, 0,12 e 0,12-0,25  $\mu\text{g/mL}$  para CAS, MICs de 0,015  $\mu\text{g/mL}$  para MICA e 0,015 e 0,015-0,06  $\mu\text{g/mL}$  para ANF.

Uma cepa de *C. krusei* foi resistente ao VCZ (8  $\mu\text{g/mL}$ ). Os valores da média geométrica (MG) e intervalo foram: 0,41 e  $\leq 0,015$ -8  $\mu\text{g/mL}$  para VCZ, 0,70 e 0,5-1  $\mu\text{g/mL}$  para AmB, 0,24 e 0,12-0,5  $\mu\text{g/mL}$  para CAS, 0,06 e 0,06  $\mu\text{g/mL}$  para MICA e 0,01 e  $\leq 0,015$ -0,03  $\mu\text{g/mL}$  para ANF.

Uma cepa da espécie *C. guilliermondii* ss foi *non-wild type* para ambos FCZ ( $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ ) e VCZ (4  $\mu\text{g/mL}$ ). Intervalos de 2-  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  para FCZ, 0,25-4  $\mu\text{g/mL}$  para VCZ, 0,03-0,25  $\mu\text{g/mL}$  para AmB, 0,12  $\mu\text{g/mL}$  para CAS, 0,06-0,5  $\mu\text{g/mL}$  para MICA e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  para ANF foram observados.

As 3 cepas (100%) da espécie *C. haemulonii* var. *vulnera* apresentaram altos MICs para FCZ, com média e intervalo de 21,33 e 16-32  $\mu\text{g/mL}$ , para os demais antifúngicos foram encontrados valores de 0,08 e 0,06-0,12  $\mu\text{g/mL}$  para VCZ, 0,5 e 0,25-1  $\mu\text{g/mL}$  para AmB, 0,16 e 0,06 –

0,12  $\mu\text{g/mL}$  para CAS, 0,1 e 0,06-0,12  $\mu\text{g/mL}$  para MICA, 0,02 e 0,015  $\mu\text{g/mL}$  para ANF. Para as cepas de *C. haemulonii* ss apresenta-se intervalos de 0,5-4  $\mu\text{g/mL}$  para FCZ, 0,015  $\mu\text{g/mL}$  para VCZ, 0,25-1  $\mu\text{g/mL}$

para AmB, 0,12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para CAS, 0,015-0,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para MICA e 0,015  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para ANF.

A cepa de *C. duobushaemulonii*, única da sua espécie, apresentou altos MICs para FCZ ( $\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e AmB (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Uma cepa de *C. dubliniensis* (50%) foi *non-wild type* para CAS (0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a única cepa de *C. kefyr* foi *non-wild type* para ambos VCZ (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e CAS (0,12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**Tabela 3.** Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 6 fármacos antifúngicos frente a 142 cepas sanguíneas de *Candida*, segundo espécie ou complexo, estado de São Paulo, 2017-2018

Espécie	Antifúngico	Nº de cepas com MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )												
		$\leq 0,015$	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	$\geq 64$
<i>C. parapsilosis</i> (n=47)	Fluconazol	-	-	-	1	7	17	11	7	1		1	1	1
	Voriconazol	26	6	4	4	6	1					-	-	-
	Anfotericina B (*)	2	2	2	5	6	12	17	1			-	-	-
	Caspofungina	2		1	12	11	19	2				-	-	-
	Micafungina	6		3	6	11	14	6	1			-	-	-
	Anidulafungina	3	4	1	6	2	15	11	5			-	-	-
<i>C. albicans</i> (n=40)	Fluconazol	-	-	-	11	18	7	2	2					
	Voriconazol	21	7	5	7							-	-	-
	Anfotericina B (*)		1	3	2	11	10	13				-	-	-
	Caspofungina	4	2	6	27	1						-	-	-
	Micafungina	40										-	-	-
	Anidulafungina	38	2									-	-	-
<i>C. tropicalis</i> (n= 21)	Fluconazol	-	-	-	3	3	4	7	3					1
	Voriconazol	3	3	5	7	2					1	-	-	-
	Anfotericina B (*)					1	6	14				-	-	-
	Caspofungina		2	7	11	1						-	-	-
	Micafungina	6	12	1	1	1						-	-	-
	Anidulafungina	21										-	-	-
<i>C. glabrata</i> (n= 14)	Fluconazol	-	-	-						1	1	3	6	3
	Voriconazol (*)	5	1	1	1	2	1	1	1	1		-	-	-
	Anfotericina B (*)					1	3	10				-	-	-
	Caspofungina				11	3						-	-	-
	Micafungina	14										-	-	-
	Anidulafungina	11	2	1								-	-	-

Tabela 3. Cont.

Espécie	Antifúngico	Nº de cepas com MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )												
		$\leq 0,015$	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	$\geq 64$
<i>C. krusei</i> (n= 4)	Fluconazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Voriconazol	1				1		1			1			
	Anfotericina B (*)						2	2						
	Caspofungina				2	1	1							
	Micafungina			4										
	Anidulafungina	3	1											
<i>C. orthopsilosis</i> (n= 4)	Fluconazol (**)	-	-	-			3	1						
	Voriconazol (**)	3	1											
	Anfotericina B (*)			1				3						
	Caspofungina (**)	1			2	1								
	Micafungina (**)	1			2		1							
	Anidulafungina (**)	1				3								
<i>C. haemulonii</i> <i>var. vulnera</i> (n=3)	Fluconazol	-	-	-								2	1	
	Voriconazol			2	1									
	Anfotericina B					1		2						
	Caspofungina				2	1								
	Micafungina			1	2									
	Anidulafungina	2	1											
<i>C. haemulonii</i> SC (n=2)	Fluconazol	-	-	-			1		1					
	Voriconazol	2												
	Anfotericina B					1		1						
	Caspofungina				2									
	Micafungina	1		1										
	Anidulafungina	2												
<i>C. guilliermondii</i> SC (n= 2)	Fluconazol (*)	-	-	-					1					1
	Voriconazol (**)					1				1				
	Anfotericina B (**)		1			1								
	Caspofungina				2									
	Micafungina			1			1							
	Anidulafungina						2							

Tabela 3. Cont.

Espécie	Antifúngico	Nº de cepas com MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )												
		$\leq 0,015$	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	$\geq 64$
<i>C. metapsilosis</i> (n= 2)	Fluconazol	-	-	-			1	1						
	Voriconazol		1	1								-	-	-
	Anfotericina B (*)					1	1					-	-	-
	Caspofungina	1				1						-	-	-
	Micafungina	1			1							-	-	-
	Anidulafungina				1	1						-	-	-
<i>C. dubliniensis</i> (n= 2)	Fluconazol (*)	-	-	-	1	1								
	Voriconazol (**)	1	1									-	-	-
	Anfotericina B (*)						1	1				-	-	-
	Caspofungina (**)				1	1						-	-	-
	Micafungina (*)	2										-	-	-
	Anidulafungina(*)	2										-	-	-
<i>C. kefyr</i> (n= 1)	Fluconazol (**)	-	-	-			1							
	Voriconazol (**)						1					-	-	-
	Anfotericina B							1				-	-	-
	Caspofungina (**)				1							-	-	-
	Micafungina (**)			1								-	-	-
	Anidulafungina(**)		1									-	-	-
<i>C. pelliculosa</i> (n= 1)	Fluconazol (**)	-	-	-				1						
	Voriconazol (*)				1							-	-	-
	Anfotericina B						1					-	-	-
	Caspofungina (*)				1							-	-	-
	Micafungina	1										-	-	-
	Anidulafungina	1										-	-	-
<i>C. duobushaemulonii</i> (n=1)	Fluconazol	-	-	-										1
	Voriconazol		1									-	-	-
	Anfotericina B										1	-	-	-
	Caspofungina				1							-	-	-
	Micafungina		1									-	-	-
	Anidulafungina			1								-	-	-

Números em vermelhos ressaltam cepas com altos MICs

\* áreas acinzentadas indicam valores acima de ECVs estabelecidos pelo CLSI documento M59 (CLSI, 2016).

\*\* áreas acinzentadas indicam valores para cepas *non-wild type* (Pfaller e Diekema, 2012). - Não testado

**Tabela 4.** Síntese da sensibilidade de 144 cepas de *Candida*, isoladas de corrente sanguínea, provenientes de 18 hospitais, 2017-2018, São Paulo, Brasil

Espécie	Antifúngico	MIC (ug/mL)				
		MG	Moda	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Intervalo
<b><i>C. parapsilosis</i> SC (n=47)</b>	Fluconazol	1,03	0,5	0,5	2	0,12 - ≥64
	Voriconazol	0,03	0,015	0,03	0,25	≤0,015 - 0,5
	Anfotericina B	0,36	1	0,5	1	≤0,015 - 2
	Caspofungina	0,25	0,5	0,25	0,5	≤0,015 - 1
	Micafungina	0,22	0,5	0,25	1	≤0,015 - 2
	Anidulafungina	0,33	0,5	0,5	1	≤0,015 - 2
<b><i>C. albicans</i> SC (n=40)</b>	Fluconazol	0,27	0,25	0,25	0,5	0,12 - 2
	Voriconazol	0,02	0,015	≤0,015	0,12	≤0,015 - 0,12
	Anfotericina B	0,38	1	0,25	1	0,03 - 1
	Caspofungina	0,08	0,12	0,12	0,12	≤0,015 - 0,25
	Micafungina	0,015	0,015	≤0,015	≤0,015	≤0,015 - 0,5
	Anidulafungina	0,01	0,015	≤0,015	≤0,015	≤0,015 - 0,03
<b><i>C. tropicalis</i> (n= 21)</b>	Fluconazol	0,71	1	1	0,5	0,12 - ≥64
	Voriconazol	0,08	0,12	0,06	0,06	≤0,015 - 8
	Anfotericina B	0,76	1	1	1	0,25 - 1
	Caspofungina	0,08	0,12	0,12	0,12	0,03 - 0,25
	Micafungina	0,03	0,03	0,03	0,03	≤0,015 - 0,25
	Anidulafungina	0,015	0,015	0,015	≤0,015	≤0,015
<b><i>C. glabrata</i> SC (n= 14)</b>	Fluconazol	24,98	32	32	≥64	4 - ≥64
	Voriconazol	0,11	0,015	0,06	2	≤0,015-4
	Anfotericina B	0,9	1	1	1	0,25-1
	Caspofungina	0,14	0,12	0,12	0,25	0,12-0,25
	Micafungina	0,015	0,015	≤0,015	≤0,015	≤0,015
	Anidulafungina	0,01	0,015	≤0,015	0,03	≤0,015-0,06
<b><i>C. krusei</i> (n= 4)</b>	Fluconazol	-	-	-	-	-
	Voriconazol	0,41	*	*	*	≤0,015 - 8
	Anfotericina B	0,70	*	*	*	0,5 - 1
	Caspofungina	0,24	0,12	*	*	0,12 - 0,5
	Micafungina	0,06	0,06	*	*	0,06
	Anidulafungina	0,01	0,015	*	*	≤0,015 - 0,03

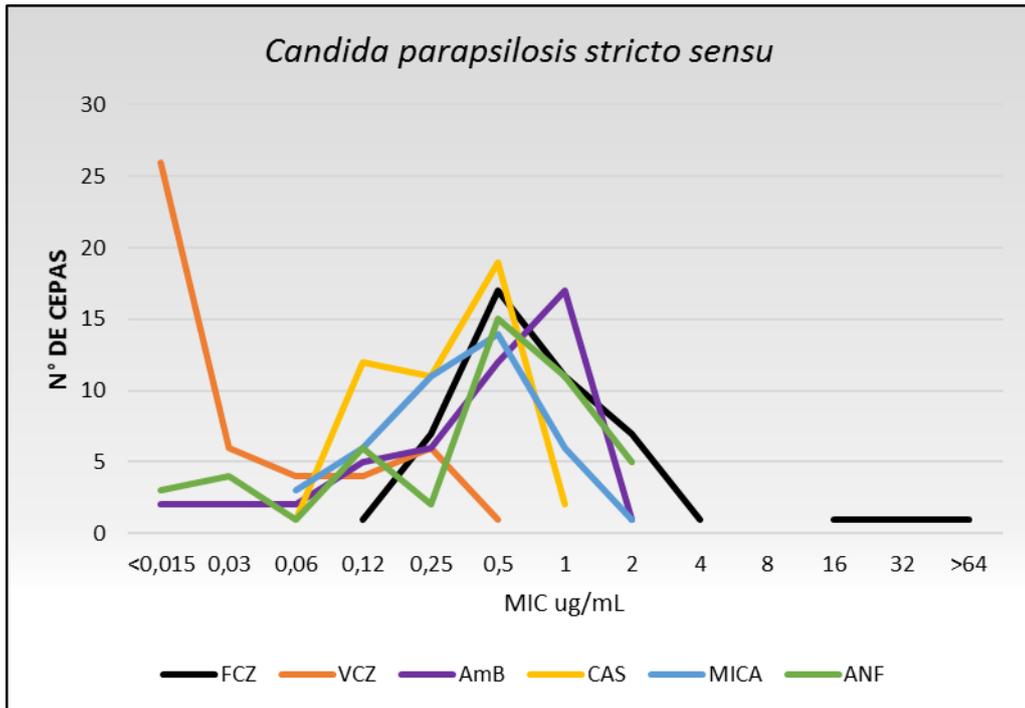
Tabela 4. Cont.

Espécie	Antifúngico	MIC (ug/mL)				
		MG	Moda	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Intervalo
<b><i>C. orthopsilosis</i></b> (n= 4)	<b>Fluconazol</b>	0,62	1	*	*	0,5 - 1
	<b>Voriconazol</b>	0,01	0,15	*	*	≤0,015 - 0,03
	<b>Anfotericina B</b>	0,76	1	*	*	0,06 - 1
	<b>Caspofungina</b>	0,12	0,12	*	*	≤0,015 - 0,25
	<b>Micafungina</b>	0,18	0,12	*	*	≤0,015 - 0,5
	<b>Anidulafungina</b>	0,19	0,25	*	*	≤0,015 - 0,25
<b><i>C. haemulonii var. vulnera</i></b> (n=3)	<b>Fluconazol</b>	21,33	16	*	*	16 - 32
	<b>Voriconazol</b>	0,08	0,06	*	*	0,06 - 0,12
	<b>Anfotericina B</b>	0,5	1	*	*	0,25 - 1
	<b>Caspofungina</b>	0,16	0,12	*	*	0,06 - 0,12
	<b>Micafungina</b>	0,1	0,12	*	*	0,06 - 0,12
	<b>Anidulafungina</b>	0,02	0,015	*	*	0,015
<b><i>C. haemulonii SC</i></b> (n=2)	<b>Fluconazol</b>	*	*	*	*	0,5 - 4
	<b>Voriconazol</b>	*	*	*	*	0,015
	<b>Anfotericina B</b>	*	*	*	*	0,25 - 1
	<b>Caspofungina</b>	*	*	*	*	0,12
	<b>Micafungina</b>	*	*	*	*	0,015 - 0,06
	<b>Anidulafungina</b>	*	*	*	*	0,015
<b><i>C. guilliermondii SC</i></b> (n= 2)	<b>Fluconazol</b>	*	*	*	*	2 - ≥64
	<b>Voriconazol</b>	*	*	*	*	0,25 - 4
	<b>Anfotericina B</b>	*	*	*	*	0,03 - 0,25
	<b>Caspofungina</b>	*	*	*	*	0,12
	<b>Micafungina</b>	*	*	*	*	0,06 - 0,5
	<b>Anidulafungina</b>	*	*	*	*	0,5
<b><i>C. metapsilosis</i></b> (n= 2)	<b>Fluconazol</b>	*	*	*	*	0,5 - 2
	<b>Voriconazol</b>	*	*	*	*	0,03 - 0,06
	<b>Anfotericina B</b>	*	*	*	*	0,25 - 1
	<b>Caspofungina</b>	*	*	*	*	≤0,015 - 0,25
	<b>Micafungina</b>	*	*	*	*	≤0,015 - 0,12
	<b>Anidulafungina</b>	*	*	*	*	0,12 - 0,25

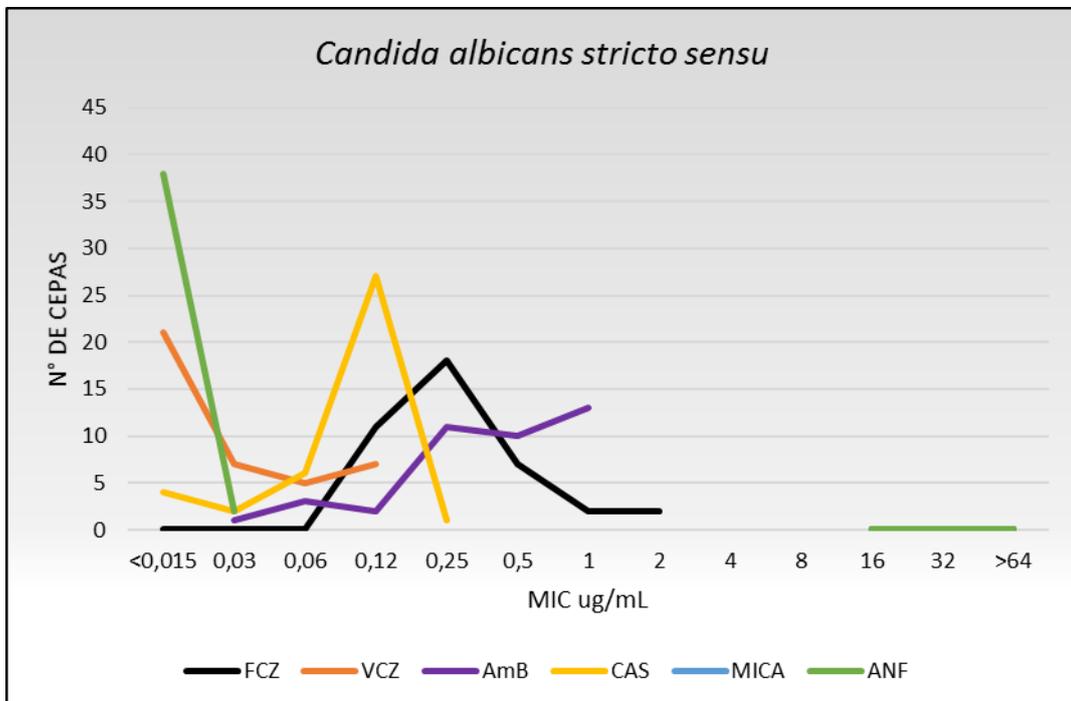
Tabela 4. Cont.

Espécie	Antifúngico	MIC (ug/mL)				
		MG	Moda	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Intervalo
<i>C. dubliniensis</i> (n= 2)	Fluconazol	*	*	*	*	0,12-0,25
	Voriconazol	*	*	*	*	≤0,015-0,03
	Anfotericina B	*	*	*	*	0,5-1
	Caspofungina	*	*	*	*	0,12-0,25
	Micafungina	*	*	*	*	≤0,015
	Anidulafungina	*	*	*	*	≤0,015
<i>C. kefyi</i> (n= 1)	Fluconazol	*	*	*	*	0,5
	Voriconazol	*	*	*	*	0,5
	Anfotericina B	*	*	*	*	1
	Caspofungina	*	*	*	*	0,12
	Micafungina	*	*	*	*	0,06
	Anidulafungina	*	*	*	*	0,03
<i>C. pelliculosa</i> (n= 1)	Fluconazol	*	*	*	*	1
	Voriconazol	*	*	*	*	0,12
	Anfotericina B	*	*	*	*	0,5
	Caspofungina	*	*	*	*	0,12
	Micafungina	*	*	*	*	≤0,015
	Anidulafungina	*	*	*	*	≤0,015
<i>C. duobushaemulonii</i> (n=1)	Fluconazol	*	*	*	*	≥64
	Voriconazol	*	*	*	*	0,03
	Anfotericina B	*	*	*	*	8
	Caspofungina	*	*	*	*	0,12
	Micafungina	*	*	*	*	0,03
	Anidulafungina	*	*	*	*	0,06

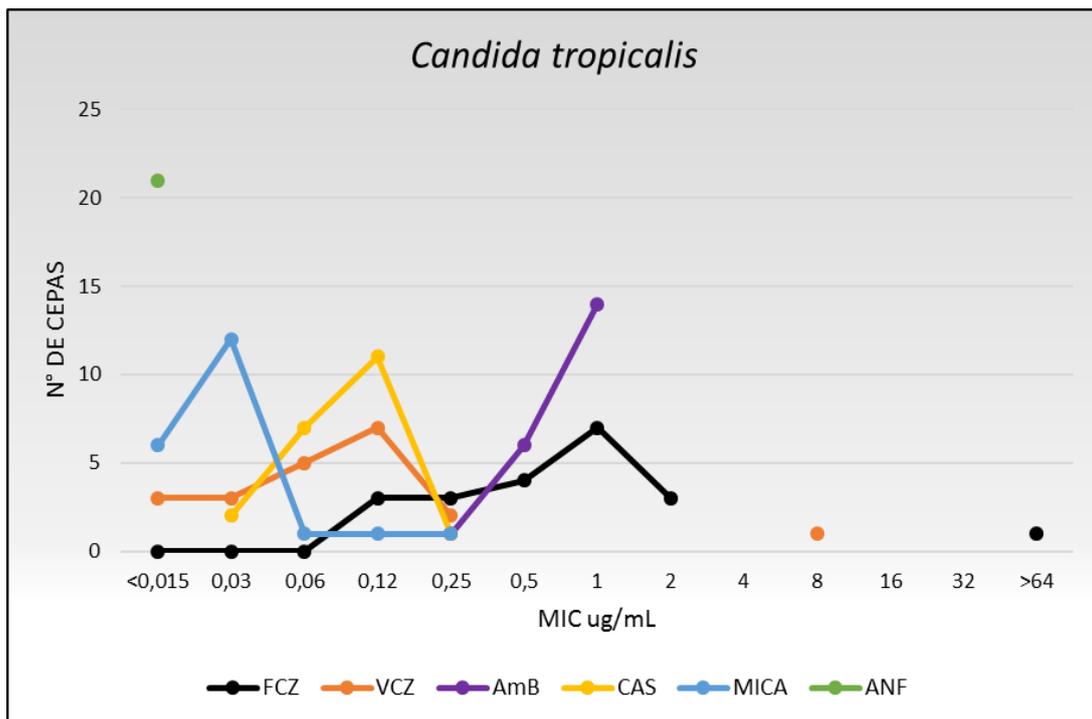
\* Não determinado, pelo baixo número de cepas no grupo.



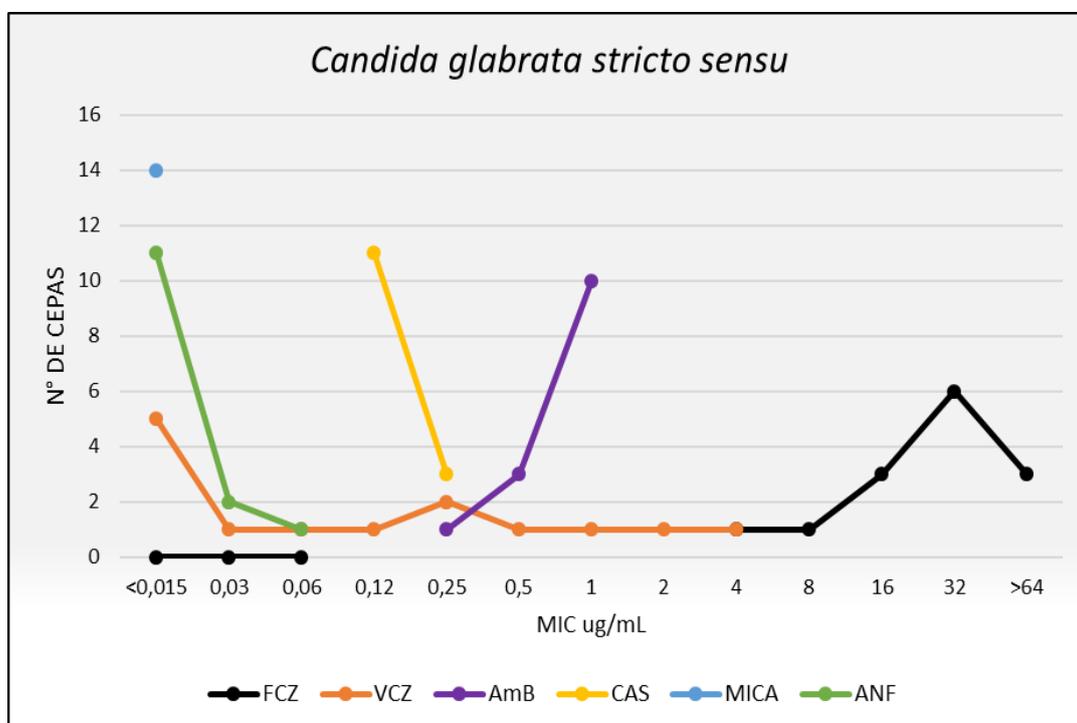
**Gráfico 1.** Concentração inibitória mínima (MIC em ug/mL) de 6 antifúngicos frente a 47 cepas de corrente sanguínea de *C. parapsilosis* ss. FCZ, fluconazol; VCZ, voriconazol; AmB, anfotericina B; CAS, caspofungina; MICA, micafungina; ANF, anidulafungina



**Gráfico 2.** Concentração inibitória mínima (MIC, em ug/mL) de 6 antifúngicos frente a 40 cepas de corrente sanguínea de *C. albicans* ss. FCZ, fluconazol; VCZ, voriconazol; AmB, anfotericina B; CAS, caspofungina; MICA, micafungina; ANF, anidulafungina



**Gráfico 3.** Concentração inibitória mínima (MIC em ug/mL) de 6 antifúngicos frente a 21 cepas de corrente sanguínea de *Candida tropicalis*. FCZ, fluconazol; VCZ, voriconazol; AmB, anfotericina B; CAS, caspofungina; MICA, micafungina; ANF, anidulafungina



**Gráfico 4.** Concentração inibitória mínima (MIC em ug/mL) de 6 antifúngicos frente a 14 cepas de corrente sanguínea de *C. glabrata* ss. FCZ, fluconazol; VCZ, voriconazol; AmB, anfotericina B; CAS, caspofungina; MICA, micafungina; ANF, anidulafungina

## 5. DISCUSSÃO

O número de infecções invasivas causadas por *Candida* que incluem a candidemia aumentam bem como os relatos de cepas resistentes a azóis. Apesar destas infecções estarem intimamente ligadas aos cuidados de saúde e condições higiênicas sanitárias dos hospitais a candidemia é um desafio à saúde pública ao redor do mundo e em países economicamente distintos devido as reduzidas opções terapêuticas, a baixa sensibilidade das hemoculturas, a demora no diagnóstico e ao acometimento de pacientes nos extremos da idade (neonatos e idosos) (Kaur e Chakrabarti, 2019).

O conhecimento epidemiológico é importante para a formação de estratégias das equipes hospitalares como também para a compreensão da distribuição geográfica das espécies. Sabe-se que existem diferenças na frequência das espécies de acordo com a categoria do hospital (Colombo *et al.*, 2013). Neste estudo a maior parte das cepas foi proveniente de hospitais gerais públicos e, em hospitais escola onde se encontra atendimentos especializados e provavelmente, dados mais bem trabalhados. Nada obstante relatou-se que a implantação de programas de vigilância em infecções de corrente sanguínea, nos centros de saúde, diminui os gastos financeiros bem com impacta na sobrevivência do paciente (Pfaller e Castanheira, 2016; Bassetti *et al.*, 2013).

Foram selecionadas cepas de 22 hospitais, a maioria deles localizada na região metropolitana de São Paulo que possui hospitais de referência nacional. Apesar da quantidade de instituições aqui descrita, só no estado de São Paulo existem ao todo 881 hospitais gerais e especializados (Bittar, Mendes e Magalhães, 2011). Os maiores estudos do Brasil abarcam, respectivamente, 11 e 16 centros médicos no Brasil (Colombo *et al.*, 2006; Doi *et al.*, 2016), contribuindo de forma significativa para a compreensão da candidemia no Brasil, porém diante a extensão geográfica do país, é difícil estipular a real prevalência das espécies envolvidas na infecção. Outros fatores também obstruem estes dados, como o atraso no diagnóstico, a subnotificação e a baixa sensibilidade da hemocultura, que induzem a uma

parcela da população infectada sequer ter acesso ao diagnóstico de fungemia (Clancy e Nguyen, 2013).

*C. parapsilosis* ss foi à espécie mais frequente (31,9%), ao contrário da *C. albicans* ss (27,8%). Esta inversão de valores já foi descrita em outros estudos no país (Santos et al., 2014; Hinrichsen et al., 2008) e pode estar associada ao fato de que a maioria das cepas é proveniente de hospitais públicos onde esta espécie é encontrada com frequência (Colombo et al., 2013). O Brasil e a própria América Latina são descritos como regiões com altas frequências de *C. parapsilosis* ss (Pfaller et al., 2019; Nucci et al., 2013).

Encontrou-se frequência de 2,8% para *C. orthopsilosis* e 1,4% para *C. metapsilosis*, somando 4,2%, taxa semelhante à encontrada por outros autores no Brasil e Portugal (Thomaz et al., 2018; Faria-Ramos et al., 2014). As outras espécies crípticas do complexo *C. parapsilosis* são, de fato, dentre as espécies raras, as que têm mais relatos na literatura e juntas apresentam prevalência  $\leq 10\%$ , dentro do complexo (Bonfietti et al., 2012). Em estudos sobre patogenicidade, *C. metapsilosis* é descrita como a espécie menos virulenta e *C. parapsilosis* ss a espécie mais importante clinicamente, dentro do complexo (Bertini et al., 2013; Ruiz, 2013; Orsi, Colombari e Blasi, 2010).

*C. albicans* ss, como demonstrado neste estudo (27,7%) foi à segunda espécie mais, frequentemente, encontrada em infecções invasivas. Uma grande limitação de estudos no Brasil é a ausência de técnicas moleculares nas metodologias empregadas para identificar as espécies crípticas em infecções invasivas por *Candida*, de modo a dificultar comparação de resultados entre os distintos estudos. Apesar de vários estudos evidenciarem tendência ao crescimento de casos devido a espécies não-*C. albicans* (Oliveira et al., 2014; Camargo et al., 2010; Santos et al., 2014), dificilmente, alguma outra espécie, isoladamente, supera a frequência de *C. albicans* ss. Todavia, um discreto aumento de cepas de outras espécies emergentes podem indicar mudanças na epidemiologia, em distintas regiões do planeta (Lovero et al., 2016; Ko et al., 2018; Colombo et al., 2013).

Raros estudos no Brasil apontam a prevalência de *C. dubliniensis*, espécie críptica do complexo *C. albicans*, em isolados sanguíneos. Neste

estudo a frequência dessa espécie (1,4%) é semelhante àquela observada em Portugal (1,3%) (Faria-Ramos et al., 2014) e Chile de 1,46% (Ministério de la Salud, 2017). No Brasil, o estudo de Moretti et al. (2013) apontou frequência menor (0,3%) da mesma. Todos os resultados indicam pouca ocorrência de *C. dubliniensis* como agente de candidemia. A espécie é, comumente, descrita em infecções de orofaringe e tem importância como agente resistente ao FCZ em casos tratados com o fármaco (Diekema et al., 2009 e Butler, 2014).

A frequência de 9,7% para *C. glabrata* ss se assemelha àquela citada em outros estudos no país (Doi et al., 2016; Colombo et al., 2013; Mattos et al., 2017; Marra et al., 2011). Um estudo recente de Canela et al. (2018) mostrou altíssima e incomum prevalência (19%) de *C. glabrata* ss em um hospital universitário do estado de São Paulo. Em um hospital público universitário de Campinas (SP), Moretti et al. (2013), além de encontrarem alta frequência (11,2%), observaram tendência no aumento dessa espécie ao longo dos anos. Colombo et al. (2013) cita esta espécie como emergente no país, especialmente, em hospitais privados, fato importante, pois *C. glabrata* ss pode apresentar resistência e alta mortalidade em pacientes críticos. Com altas prevalências no EUA, *C. glabrata* ss também tem aumentado em número de casos na Europa e Ásia (Kakeya et al., 2018; Guinea et al., 2014). Relatos da emergência dessa espécie ocorreram, nos últimos anos, na Ásia, especialmente, Korea e Japão (Ko et al., 2018; Kakeya et al., 2018). Estudo de Lindberg et al. (2019), na Suécia, *C. glabrata* ss apresentou frequência de 15% e foi a 2º espécie mais frequente em candidemia. Estes autores citam que as novas ferramentas moleculares possam representar uma das causas da diminuição da *C. albicans* ss e aumento de outras espécies, como a *C. glabrata* ss, pois possuem alto poder discriminatório, antes não obtido com métodos fenotípicos.

As espécies do complexo *C. haemulonii* não são, em regra, discriminadas nos estudos de pacientes com candidíase. Parte disto está relacionada à necessidade de métodos moleculares, como sequenciamento de regiões D1/D2, *internal transcribed spacer* (ITS) e MALDI-TOF MS, para

identificação precisa de seus membros (Grenfell et al., 2016). Constatou-se frequência (4,2%) muito superior à verificada (0,3%) no estudo brasileiro de De Almeida Jr. et al. (2016), que analisaram cepas provenientes de vários sítios de infecção, além do sanguíneo. Tan et al. (2015), na Ásia, apresentaram resultados de frequência de 0,4% para *C. haemulonii* ss. O programa internacional de monitoramento de antifúngicos *Antifungal Surveillance Program* (SENTRY) concluiu, recentemente, prevalência global baixíssima de 0,04% (Pfaller et al., 2019).

Tentando explicar a grande diferença numérica de frequência verificada nas poucas publicações e a obtida neste estudo, há que se ressaltar que, o Instituto Adolfo Lutz é o laboratório central de referência (LACEN) em diagnóstico laboratorial, para todo o estado de São Paulo, contudo o envio de cepas não é compulsório. Sendo assim, as cepas do complexo *C. haemulonii* podem ter sido enviadas com maior assiduidade em relação às outras espécies, justamente, por dificuldades na sua identificação. Além disso, há grande preocupação envolvendo este complexo, pois tem potencial para multirresistência a antifúngicos e, portanto, as cepas devem ser muito bem identificadas. Soma-se a todos esses aspectos, o fato de *C. auris*, espécie de grande interesse hospitalar pela resistência a fármacos, capacidade de ocasionar surtos e alta contaminação ambiental, poder facilmente ser confundida com as espécies do complexo *C. haemulonii* (Ramos et al., 2015). Todos esses fatos induzem à maior motivação para envio de cepas ao LACEN. Não obstante, a ocorrência do complexo *C. haemulonii* como causador de infecções de corrente sanguínea no estado de São Paulo.

Infecções causadas pelo complexo *C. haemulonii* na América do Sul são mais frequentemente encontradas em casos de candidemia diferentemente de estudos na Ásia e Estados Unidos onde está associada a casos de infecções de pele e infecções não invasivas (Frías-De-León, 2019; Gade et al., 2020). Isto pode estar associado às condições hospitalares diferentes nos hospitais na América do Sul ou casos de infecções fúngicas não invasivas serem subnotificadas (Gade et al., 2020).

Para o complexo *C. guilliermondii*, foi encontrada frequência (2%) similar às observadas em estudos brasileiros, como 1,5% (Braga et al., 2018) e 2% (Colombo et al., 2013), 1,3% (Moretti et al., 2013). Entre as mais altas frequências no país está a de Oliveira et al., (2014) em 4,8%, que avaliaram pacientes pediátricos e a de Hinrichsen et al., (2008) em 5%, porém, este com um número reduzido de cepas (n=21). O maior estudo da América Latina revelou prevalência de 6,5% de *C. guilliermondii* ss no continente, onde Honduras teve os mais altos e surpreendentes índices (20,7%). Neste mesmo estudo os autores apontam a prevalência de 1,6% no Brasil, segundo Nucci et al., 2013. A prevalência do complexo *C. guilliermondii* em outras regiões pode ser avaliada em alguns estudos, como: 5% na Itália (Lovero et al., 2016), 1,7% na Espanha (Guinea, et al., 2014), cerca de 1% nos EUA (Zhang et al., 2019; Diekema et al., 2009), 2,2% em um estudo que abrange toda a Ásia (Tan et al., 2015). Estes últimos estudos, apresentam números semelhantes ao verificado neste estudo. *C. guilliermondii* ss possui mortalidade e virulência menores e comparadas às observadas em infecções por *C. albicans* ss; porém, diferente desta espécie *C. guilliermondii* ss pode exibir resistência a azóis e à AmB (Marcos-Zambrano et al., 2017).

A prevalência da *C. tropicalis* varia entre menor de 10% (Kakeya et al., 2018; Faria-Ramos et al., 2014) até maior de 20% (Yang et al., 2017; Tan et al., 2015). Logo, a frequência encontrada nesse estudo (14,6%) está dentro da normalidade, onde na América do Sul é descrita como 3º espécie mais encontrada em casos de candidemia (Nucci et al., 2013). Todavia, na Ásia *C. tropicalis* dispara como importante agente de infecções, podendo ocupar a posição de 1 lugar causando infecções em pacientes com diversas características e não apenas em pacientes não neutropênicos ou com doenças subjacentes como é comumente associada em outros países (Kaur e Chakrabarti, 2019; Oberoi et al., 2012).

A distribuição de *C. krusei* (2,8%) é semelhante a outros estudos bem como *C. pelliculosa* (0,7%) e *C. kefyr* (0,7%) usualmente abaixo de 1% (Lindberg et al., 2019; Xiao et al., 2020; Siri et al., 2017; Ko et al., 2019).

Testes de sensibilidade foram realizados com 6 fármacos de uso clínico, que demonstraram, em geral, boa atividade antifúngica frente ao conjunto de 144 cepas. Nenhuma cepa resistente à AmB ou às equinocandinas foi encontrada, com exceção de uma cepa *C. dubliniensis* resistente à caspofungina. A resistência à caspofungina é rara e os dados deste estudo corroboram com dados de estudos realizados nos Estados Unidos da América (EUA) (Cleveland et al., 2012), Espanha (Guinea et al., 2014), Ásia (Tsai et al., 2018) e os de um estudo mundial (Castanheira et al., 2017).

Raras cepas resistentes, *non-wild type* ou com altos MICs ao FCZ foi encontrada, sendo que destas, 3 foram *C. parapsilosis* (MIC<sub>90</sub> de 0,25  $\mu$ g/mL, intervalo de 0,12- $\geq$ 64  $\mu$ g/mL) com 2,1% de resistência ao FCZ. A taxa de resistência ao FCZ em *C. parapsilosis* ss, se comparada aos poucos estudos anteriores realizados no Brasil, é semelhante a 2,5% descrita por Wille et al., (2013) ou superior a 0,6% observada por Colombo et al., (2006). Taxas de resistência ao FCZ parecem ser baixas no Chile (<1%) (Ministerio de la Salud, 2017). As taxas de resistência no Brasil são inferiores às observadas na Turquia (9,4%) (Hilmioğlu-Polat et al., 2018), Espanha (5%) (Puig-Asensio et al., 2014) e Portugal (4%) (Faria-Ramos et al., 2014).

As demais espécies crípticas do complexo, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, foram sensíveis ao FCZ e demais antifúngicos, e esse perfil corrobora achados de outros autores (Yang et al., 2017; Guinea et al., 2014).

Como previsto, nenhuma cepa de *C. albicans* ss foi resistente ao FCZ, bem como aos outros antifúngicos avaliados. Como já citado na literatura, a taxa geral de resistência desta espécie, incluindo ao FCZ, é muito baixa, especialmente no Brasil (Da Matta et al., 2007; Nucci et al., 2013). Cepas de *C. dubliniensis* também foram sensíveis ao FCZ, apesar de relatos na literatura, que descrevem altos MICs para esta espécie, muitos estão relacionados à candidíase orofaríngea e ao uso de FCZ via oral e pacientes HIV positivos (Aslani et al., 2018)

Para a maioria dos isolados do complexo *C. haemulonii* (4/6; 66,6%) foram encontrados altos valores de MICs ( $\geq$ 64  $\mu$ g/mL) de FCZ, em

conformidade a outros estudos (De Almeida Jr. et al., 2016; Hou et al., 2016). Frente a AmB as cepas foram mais sensíveis comparadas às da pesquisa realizada no Brasil por De Almeida Jr et al., (2016), com intervalo de (0,25-8  $\mu\text{g/mL}$ ), onde apenas uma cepa apresentou alto MIC para AmB de 8  $\mu\text{g/mL}$ . Esse mesmo estudo e outro de Hou e colaboradores (2016) menciona *C. duobushaemulonii* como a espécie do complexo menos sensível a AmB. Esse dado corrobora com o presente estudo onde os maiores MICs para AmB (8  $\mu\text{g/mL}$ ) e FCZ ( $\geq 64\mu\text{g/mL}$ ) foram encontrados na espécie *C. duobushaemulonii*, todavia o baixo número de cepas não permite conclusões. *C. haemulonii var vulnera* teve maiores MICs para FCZ comparado a *C. haemulonii* ss. A classificação taxonômica do complexo *C. haemulonii* ainda é discutida. Gade et al., (2020) não encontraram variações genéticas significativas que justifiquem a separação da *C. haemulonii* e *C. haemulonii var vulnera* em espécies distintas. Há divergências entre micologistas sobre a importância dos estudos das espécies crípticas (Wickles e Wiederhold, 2018). Sendo assim, é necessário avaliar cada complexo individualmente, analisando a virulência e o comportamento frente aos antifúngicos para determinar quais espécies crípticas, se diferenciadas, impactam no manejo e rotina clínica. Indiscutivelmente, o complexo *C. haemulonii* exige a identificação a nível molecular devido à diversidade na sensibilidade antifúngica e semelhança com *C. auris*, espécie multirresistente e emergente (Kathuria et al., 2015).

A espécie *C. guilliermondii* ss é reconhecida por sua multirresistência e de fato, altos MICs para FCZ (2– $\geq 6\mu\text{g/mL}$ ) foram evidenciados, de forma semelhante ao já relatado previamente (Pfaller et al., 2019). Além disso, MICs acima dos *cutoff* epidemiológicos, tanto para FCZ quanto para VCZ, foram observados frente uma (1/3; 33,3%) cepa, classificando-a como *non-wild type* para ambos os triazóis. O estudo de Marco Zambrano et al., (2017) descreveu menor taxa (10%) de cepas *non wild-type* no complexo. Interessante que a maioria das cepas deste estudo foi sensível ao FCZ, desafiando o conceito de que esta espécie é refratária pela facilidade de adquirir resistência após exposição ao fármaco.

Reforçando esses dados encontram-se outros na literatura sobre baixos índices de resistência ao FCZ em *C. glabrata* ss, no Brasil e América Latina (Da Matta et al., 2007; Colombo et al., 2013). Altos MICs de FCZ estão relacionados à superexpressão de bombas de e-fluxo, muito observada em cepas de *C. glabrata* ss e/ou à ocorrência de mutações no gene *erg11*, fenômeno também presente em *C. albicans* ss. Estes dois mecanismos são descritos também em *C. parapsilosis* ss, assim como, mutações no *erg6* (Whaley et al., 2017).

Alta taxa de *non-wild type* ao VCZ (4/14; 28,57%) foram encontrados entre as espécies de *C. glabrata* ss. Valores diversos de tal ocorrência são encontradas em estudos no Brasil, como 25% (Motta et al., 2010), 4,5% (Da Matta et al., 2007) e 0% (Colombo et al., 2006). Estudo mais recente na Austrália encontrou taxa de 9,8% de *non-wild type* (Chapman et al., 2017) e 0% no Chile (Santolaya et al., 2019). Estes são dados são relevantes, pois o VRC é um dos antifúngicos cogitados para o tratamento de infecções de *C. glabrata* ss, tendo em vista que esta espécie já é considerada resistente ao FCZ. Ainda assim, a ausência de *breakpoints* impossibilita a associação dos valores de MIC e o sucesso terapêutico. Os ECVs indicam cepas que desenvolveram mecanismos de resistência, ainda sim, nem toda resistência é expressa *in vivo* e impacta no curso clínico. Logo, a identificação de ECVs tem como função alertar a comunidade médica de cepas possivelmente refratárias ao tratamento, para que, se possível e necessário, seja feita a escolha de um fármaco diferente para o tratamento (Lockhart, Ghannoum e Alexander, 2017)

Notável foi o encontro de 3 (3/14; 21,4%) cepas de *C. glabrata* ss que manifestara altos MICs para FCZ e VCZ, reforçando a relevância da identificação correta dessa espécie para tratamento empírico com triazóis.

Resistência cruzada entre FCZ e VCZ também foi observada para uma (1/21; 4,8%) cepa de *C. tropicalis*. Esta espécie configura uma das 3 espécies emergentes em resistência a azóis, juntamente a *C. parapsilosis* ss e *C. glabrata* ss (Pfaller et al., 2016). Os achados de *C. tropicalis* resistente

ao FCZ são cada vez menos raros (Xiao et al., 2020; Cuenca-Estrella et al., 2011; Bassett et al., 2013i).

Fato interessante o achado de uma (1/4; 25%) cepa de *C. krusei* com resistência ao VCZ, sugerindo menor opção terapêutica para infecção por essa cepa.

*C. kefyr* é um raro agente causador de candidemia (>1%) e o isolado em nosso estudo era *non-wild type* para VCZ e CAS. Outros estudos não apenas evidenciou um ligeiro crescimento, como também um rápido aumento de MICs para equinocandinas, especialmente caspofungina, sugerindo o monitoramento dessa espécie (Fekkar et al., 2013; Dufresne et al., 2014).

O Centers for Disease Control and Prevention - CDC enquadrou as espécies resistentes de *Candida* na lista de “*Serious Threats*”, com mais de 30.000 casos de resistência ao FCZ e 1.700 mortes nos Estados Unidos em 2019. *C. auris* foi o primeiro fungo a entrar na lista de fungos urgentes do CDC sendo um dos 5 microrganismos nesta lista (CDC, 2019). O monitoramento de casos provocados por *C. auris* também influenciou o aumento do registro de casos do complexo *C. haemulonii*.

Uma discussão divide micologistas, infectologistas e profissionais de saúde em dois grupos: aqueles que apoiam o diagnóstico das espécies crípticas e aqueles que apoiam que estas espécies devam ser diagnósticas apenas a nível de complexo dentro da rotina clínica (Wickes e Wiederhold, 2018). Este estudo demonstrou que as espécies crípticas ainda são minoria diante ao número total de casos e a discriminação destas deve levar em conta a virulência, epidemiologia e sensibilidade antifúngica dos complexos, especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil onde apenas ~20% dos centros de saúde tem acesso ao diagnóstico molecular (Falci, Pasqualotto, 2019). As espécies do complexo *C. haemulonii* por apresentarem uma distinta variedade no perfil de sensibilidade antifúngica, potencial de multirresistência e proximidade com *C. auris* necessitam, sem dúvidas, ser distinguidas a nível molecular na rotina clínica. Espécies crípticas de *C. guilliermondii* e *C. glabrata* são raramente descritas (>1%) e as de *C. parapsilosis* possuem menor virulência *in vitro*, logo o diagnóstico liberado

como “complexo *C. parapsilosis*” junto a um teste de sensibilidade antifúngica possa ser suficiente para nortear a terapia com antifúngicos. Evidente que estas decisões são tomadas de acordo com a realidade de cada região, acesso a ferramentas moleculares e sustentadas por estudos que descrevam a distribuição das espécies.

## **6. COSIDERAÇÕES FINAIS**

Diante do exposto, o estudo mostrou a distribuição de espécies crípticas, isoladas de corrente sanguínea de casos atendidos em hospitais do estado de São Paulo no período de 24 meses, entre 2017 e 2018.

Os resultados enfatizam a variedade de agentes e a relevância de espécies não-*C. albicans* em candidemia, com destaque para algumas espécies emergentes. Importante ressaltar que os distintos agentes de candidemia apresentam variados perfis de sensibilidade aos fármacos usados na prática clínica e consideráveis números de cepas mostram-se resistentes a um ou mais fármacos. Os dados valorizam a necessidade de identificação molecular das cepas de importância clínica na rotina laboratorial, bem como, a determinação do seu espectro de resistência, não apenas como subsídio de orientação terapêutica, mas também como ferramenta de monitoramento da tendência na resistência antifúngica ao longo do tempo em determinada região, como ação de vigilância epidemiológica.

## 7. CONCLUSÕES

- A maioria das cepas de candidemia, em hospitais do estado de São Paulo durante período de 2 anos (2017-2018), pertence a um dos 5 principais complexos de espécies, com predomínio do complexo *C. parapsilosis*, seguido de complexo *C. albicans* e, em menor frequência, espécies dos complexos *C. glabrata*, *C. haemulonii* e *C. guilliermondii*.
- Cepas predominantes de *C. albicans* ss e raras de *C. dubliniensis* foram encontradas no respectivo complexo e, no seu complexo, *C. parapsilosis* ss superou *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, como esperado e condizente com dados de literatura mundial. Somente *C. glabrata* ss foi verificada dentro do complexo, assim como, *C. guilliermondii* ss reiterando a raridade da existência, em cepas sanguíneas, de outras espécies crípticas relacionadas. A frequência de cepas do complexo *C. haemulonii* foi alta e surpreendente, com representantes de 3 das 4 espécies descritas: *C. haemulonii* ss, *C. haemulonii* var. *vulnera* e *C. duobushaemulonii*. Outras espécies, não agrupadas em complexos dentro do gênero *Candida*, foram também verificadas, sendo a maior parte de *C. tropicalis* e com menor frequência, *C. krusei*, *C. kefyr* e *C. pelliculosa*, em consonância com relatos da literatura.
- Como previsto, não foram verificadas cepas resistentes à AmB ou às equinocandinas, com exceção de uma cepa de *C. dubliniensis* resistente à caspofungina. Para FCZ poucas cepas foram resistentes ou *non-wild type* e encontradas em *C. parapsilosis* ss. *C. albicans* ss, ainda que prevalente foi sensível ao FCZ, bem como aos outros antifúngicos avaliados, permitindo concluir pela indicação de tratamento empírico em infecções por esta espécie. As poucas cepas de *C. dubliniensis*, também foram sensíveis ao

- FCZ. De outro modo, para a maioria das cepas do complexo *C. haemulonii* foram encontrados altos valores de MIC de FCZ. Um alerta deve ser dado para infecções por *C. duobushaemulonii* que apresentou menor sensibilidade a duas classes de fármacos: polieno (Amb) e azólico (FCZ), merecendo mais estudos com cepas dessa espécie emergente. Ainda frente ao FCZ, *C. haemulonii var vulnera* foi mais resistente do que *C. haemulonii ss*, ressaltando também a importância de futuros estudos com maior número de cepas para confirmar a relevância clínica de tais achados. Para *C. guilliermondii ss*, confirmou-se a existência de cepas brasileiras multirresistentes e pouco sensíveis a vários fármacos azólicos. Cepas de *C. glabrata ss* mostraram-se pouco sensíveis a VRC, dado que pode ter impacto na terapêutica, desde que esse fármaco é indicado para tratamento de infecções de *C. glabrata ss*, tendo em vista que esta espécie já é considerada resistente ao FCZ.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcoba-florez J, Arevalo MP, Gonzales-Paredes FJ, Cano J, Guarro J, Perez-Roth E, et al. Phenotypic and Molecular Characterization of *Candida nivariensis* sp . nov ., a Possible New Opportunistic Fungus. J Clin Microbiol. 2005;43(8):4107–4111. <https://10.1128/JCM.43.8.4107-4111.2005>.

Aslani N, Janbabaie G, Abastabar M, Meis JF, Babaeian M, Khodavaisy S, et al. Identification of uncommon oral yeasts from cancer patients by MALDI-TOF mass spectrometry. Infectious Diseases. 2018;18(1):24. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2916-5>.

Baginski M, Czub J. Amphotericin B and Its New Derivatives – Mode of Action. Curr Drug Metab. 2009;10(5):459–469. <https://doi.org/10.2174/138920009788898019>.

Bassetti M, Merelli M, Righi E, Diaz-Martin A, Rosello EM Luzzati R, et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of Candidemia across five sites in Italy and Spain. J Clin Microbiol. 2013;51(12):4167–72. <https://10.1128/JCM.01998-13>.

Berkow EL, Manigaba K, Parker JE, Barker KS, Kelly SL, Rogers PD. Multidrug transporters and alterations in sterol biosynthesis contribute to azole antifungal resistance in *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(10):5942-5950. <https://10.1128/AAC.01358-15>.

Bertini A, De Bernardis F, Hensgens LAM, Sandini S, Senesi S, Tavanti A. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. Int J Med Microbiol. 2013;303(2):98–103. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.12.006>.

Bishop JA, Chase N, Magill SS, Kurtzman CP, Fiandaca MJ, Merz WG. *Candida bracarensis* detected among isolates of *Candida glabrata* by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization: susceptibility data and documentation of presumed infection. Journal of clinical microbiology. 2008; 46(2):443-446. <https://10.1128/JCM.01986-07>.

Bittar OJNV, Mendes JDV, Magalhães A. Rede hospitalar no Estado de São Paulo: mapear para regular. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de

São Paulo, 2011. Disponível em: <  
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1075534>>.

Bonfietti LX, Martins MA, Szeszs MW, Pukiskas SBS, Purisso SU, Pimentel FC, et al. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. *J Med Microbiol.* 2012;61(PART7):1003–1008. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.037812-0>.

Braga PR, Cruz IL, Ortiz I, Barreiros G, Nouér SA, Nucci M. Secular trends of candidemia at a Brazilian tertiary care teaching hospital. *Brazilian J Infect Dis.* 2018;22(4):273–277. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.07.008>.

Camargo STZ, Marra AR, Silva CV, Cardoso MFS, Martino MDV, Camargo LFA, et al. Secular trends of candidemia in a tertiary care hospital. *Am J Infect Control.* 2010;38(7):546–551. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2009.12.012>.

Canela HMS, Cardoso B, Vitali LH, Coelho HC, Martinez R, Ferreira MES. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses.* 2018;61(1):11–21. <https://doi.org/10.1111/myc.12695>.

Castanheira M, Deshpande LM, Davis AP, Rhomberg PR, Pfaller MA. Monitoring antifungal resistance in a global collection of invasive yeasts and molds: Application of CLSI epidemiological cutoff values and whole-genome sequencing analysis for detection of azole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(10):1–20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00906-17>.

Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret P V., Keniya M V., et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):291–321. <https://doi.org/10.1128/CMR.00051-08>.

Cendejas-Bueno E, Kolecka A, Alastruey-Izquierdo A, Theelen B, Groenewald M, Kostrzewa M, et al. Reclassification of the *Candida haemulonii* complex as *Candida haemulonii* (C. haemulonii group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (C. haemulonii group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: Three multiresistant human pathogenic yeasts. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3641–3651. <https://doi.org/10.1128/JCM.02248-12>.

CDC, CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (US). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Centres for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services, 2019. Disponível em: <  
<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>>.

Chapman B, Slavin M, Marriott D, Halliday C, Kidd S, Arthur C, et al. Changing epidemiology of candidaemia in Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(4):1103-1108. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw422>.

Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the missing 50% of invasive candidiasis: How nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis*. 2013;56(9):1284–1292. <https://doi.org/10.1093/cid/cit006>.

Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Stein B, Hollick R, Lockhart SR, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: Results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clin Infect Dis*. 2012;55(10):1352–1361. <https://doi.org/10.1093/cid/cis697>.

Chao QT, Lee TF, Teng SH, Peng LY, Chen PH, Teng LJ, et al. Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts. *PLoS One*. 2014;9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109376>.

CLSI, M27-Ed4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017.

CLSI, M59. Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susseptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016(1).

CLSI, M60. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, Da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: A nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2816–2823. <https://doi.org/10.1128/JCM.00773-06>.

Colombo AL, Garnica M, Aranha Camargo LF, Da Cunha CA, Bandeira AC, Borghi D, et al. *Candida glabrata*: An emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol*. 2013;51(1):38–44. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.698024>.

Cuesta I, Bielza C, Cuenca-Estrella M, Larrañaga P, Rodríguez-Tudela JL. Evaluation by data mining techniques of fluconazole breakpoints established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and comparison with those of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(4):1541–1546. [https://10.1128/AAC.01688-09](https://doi.org/10.1128/AAC.01688-09).

Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, Gomez-Lopez A, Mellado E, Zaragoza O, Cuesta I. Frequency of Voriconazole Resistance In Vitro among Spanish Clinical Isolates of *Candida spp.* According to Breakpoints Established by the Antifungal Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(4):1794–1799. [https://10.1128/AAC.01757-10](https://doi.org/10.1128/AAC.01757-10).

Correia A, Sampaio P, James S, Pais C. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(1):313–317. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64076-0>.

Da Matta DA, de Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJU, Travassos NF, et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57(4):399–404. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.10.011>.

De Almeida Jr JN, Assy JGP, Levin AS, Del Negro GMB, Giudice MC, Tringoni MP, et al. *Candida haemulonii* Complex Species, Brazil, January 2010–March 2015. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(3). [https://10.3201/eid2203.151610](https://doi.org/10.3201/eid2203.151610).

De Marco L, Epis S, Capone A, Martin E, Bozic J, Crotti E, et al. The Genomes of Four *Meyerozyma caribbica* Isolates and Novel Insights into the *Meyerozyma guilliermondii* Species Complex. *Genome report.* 2018;8(3):755–759. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300316>.

Diekema DJ, S. A. Messer A, Brueggemann SL, Coffman GV, Doern LA, Herwaldt M, et al. In Vitro Activity of Seven Systemically Active Antifungal Agents against a Large Global Collection of Rare *Candida* Species as Determined by CLSI Broth Microdilution Methods. *J Clin Microbiol.* 2009;40(4):1298–1300. [https://10.1128/JCM.00942-09](https://doi.org/10.1128/JCM.00942-09).

Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *Plos One*. 2016;11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>.

Dufresne SF, Marr KA, Sydnor E, Staab JF, Karp JE, Lu K, et al. Epidemiology of *Candida kefyr* in patients with hematologic malignancies. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(6):1830-1837. <https://doi.org/10.1128/JCM.00131-14>.

Falci, dr.; Pasqualotto, AC. Clinical mycology in Latin America and the Caribbean: A snapshot of diagnostic and therapeutic capabilities. *Mycoses*. 2019;62(4): 268-373. <https://doi.org/10.1111/myc.12890>.

Faria-Ramos I, Neves-Maia J, Ricardo E, Santos-Antunes J, Silva AT, Costa-de-Oliveira S, et al. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility profiles of yeast isolates from invasive infections during a Portuguese multicenter survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(12):2241–2247. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-015-2471-1>.

Fekkar A, Meyer I, Brossas JY, Dannaoui E, Palous M, Uzunov M, et al. Rapid emergence of echinocandin resistance during *Candida kefyr* fungemia treatment with caspofungin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(5):2380-2382. <http://doi.org/10.1128/AAC.02037-12>.

Fu J, Ding Y, Wei B, Wang L, Xu S, Qin P, et al. Epidemiology of *Candida albicans* and *non-C.albicans* of neonatal candidemia at a tertiary care hospital in western China. *BMC Infect Dis*. 2017; 17: 1-6. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2423-8>.

Frías-De-León MG, Martínez-Herrera E, Acosta-Altamirano G, Arenas R, Rodríguez-Cerdeira C. Superficial candidosis by *Candida duobushaemulonii*: An emerging microorganism. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019;75. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103960>.

Gade L, Muñoz JF, Sheth M, Wagner D, Berkow EL, Forsberg K, Ben-Ami, R. Understanding the Emergence of Multidrug-Resistant *Candida*: Using Whole-Genome Sequencing to Describe the Population Structure of *Candida haemulonii* Species Complex. *Frontiers in Genetics*. 2020;11: 554. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00554>.

Grenfell RC, Da Silva Junior AR, Del Negro GMB, Munhoz RB, Gimenes VMF, Assis DM, et al. Identification of *Candida haemulonii* complex species: Use of ClinProTools™ to Overcome Limitations of the Bruker Biotyper™, VITEK MSTM IVD, and VITEK MSTM RUO databases. *Front Microbiol.* 2016; 7:1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00940>.

Green MR, Sambrook, HC. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY. 2012: 362-365.

Guinea J, Zaragoza Ó, Essribano P, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Sánchez-Reus F, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1529–1537. <https://doi.org/10.1128/AAC.02155-13>.

Hilmioğlu-Polat S, Sharifynia S, Öz Y, Aslan M, Gündoğdu N, Serin A, et al. Genetic Diversity and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis Sensu Stricto* Isolated from Bloodstream Infections in Turkish Patients. *Mycopathologia.* 2018;183(4):701–708. <https://doi.org/10.1007/s11046-018-0261-x>.

Hinrichsen SL, Falcão É, Aguiar T, Vilella S, Colombo AL, Nucci M, et al. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(4):394–398.

Hou X, Xiao M, Chen ssA, Wang H, Cheng JW, et al. Identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida haemulonii* species complex clinical isolates from a multicenter study in China. *Journal of Clinical Microbiology.* 2016;54(11):2676-2680. <https://doi.org/10.1128/JCM.01492-16>.

IBGE, Instituto de Geografia e estatística. 2019. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/>.

Takeya H, Yamada K, Kaneko Y, Yanagihara K, Tateda K, Maesaki S, et al. National Trends in the Distribution of *Candida* Species Causing Candidemia in Japan from 2003 to 2014. *Med Mycol J.* 2018;59(1):E19–22. <https://doi.org/10.3314/mmj.17-00014>.

Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. *Chinese J Infect Chemother.* 2010;10(4):320-330. <https://doi.org/10.1086/524071>.

Kathuria S, Singh PK, Sharma C Prakash A, Masih A, Kumar A, et al. Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(6):1823-1830. <https://doi.org/10.1128/JCM.00367-15>.

Katiyar SK, Alastruey-Izquierdo A, Healey KR, Johnson ME, Perlin DS, Edlind TD. Fks1 and Fks2 Are Functionally Redundant but Differentially Regulated in *Candida glabrata*: Implications for Echinocandin Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56: 6304-6309. <https://doi.org/10.1128/AAC.00813-12>.

Kaur H, Chakrabarti A. Strategies to reduce mortality in adult and neonatal candidemia in developing countries. *Journal of Fungi*. 2019;3(3):41. <https://doi.org/10.3390/jof3030041>.

Kim M, Shin JH, Sung H, Lee K, Kim E, Ryoo N, et al. *Candida haemulonii* and Closely Related Species at 5 University Hospitals in Korea: Identification, Antifungal Susceptibility, and Clinical Features. *Clin Infect Dis*. 2009;48(6):57–61. <https://doi.org/10.1086/597108>.

Kreussh A, Karstaedt AS. Candidemia among adults in Soweto, South Africa, 1990-2007. *Int J Infect Dis*. 2013;17(8):621–630. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.02.010>.

Ko JH, Jung DS, Lee JY, Kim HA, Ryu SY, Jung SI, et al. Changing epidemiology of non-albicans candidemia in Korea. *J Infect Chemother*. 2019;25(5):388–391. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.09.016>.

Lindberg E, Hammarström H, Ataollahy N, Kondori N. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. *Ssi Rep*. 2019;9(1):12–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40280-8>.

Lockhart SR, Messer SA, Gherna M, Bishop JA, Merz WG, Pfaller MA, et al. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a large global collection of *Candida glabrata* isolates: Comparison to the literature. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):1216–1227. <https://doi.org/10.1128/JCM.02315-08>.

Lockhart SR, Ghannoum MA, Alexander BD. Establishment and use of epidemiological cutoff values for molds and yeasts by use of the clinical and laboratory standards institute M57 standard. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55:1262-1268. <https://doi.org/10.1128/JCM.02416-16>.

Lovero G, De Giglio O, Montagna O, Diella G, Divenuto F, Lopuzzo M, et al. Epidemiology of candidemia in neonatal intensive care units: a persistent public health problem. *Ann Ig*. 2016;28(4):282–287. <https://doi.org/10.7416/ai.2016.2107>.

Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(8):2860-2865.

Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(1):1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1470-9465.2004.00841.x>.

Marcos-Zambrano LJ, Puig-Asensio M, Pérez-García F, Essribano P, Sánchez-Carrillo, C., Zaragoza, O, et al. Characterized by High Antifungal Resistance but Low Mortality in 22 Cases of Candidemia. 2017;61(7):1–10. <https://doi.org/10.1128/AAC.00099-17>.

Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: Analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1866–1871. <http://doi.org/10.1128/JCM.00376-11>.

Mattos K, Rodrigues LC, De Oliveira KMP, Diniz PF, Marques LI, Araujo AA, et al. Variability in the clinical distributions of *Candida* species and the emergence of azole-resistant Non-*Candida albicans* species in public hospitals in the midwest region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(6):843–847. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0163-2017>.

Menezes EA, Mendes LG, Cunha FA. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009;42(3):354–358. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000300024>.

Ministério de la Salud. Resultados de Vigilancia de Laboratorio Candidemia 2015-2016. *Boletín*. 2017; 7(1):1-20.

Moretti ML, Trabasso P, Lyra L, Fagnani R, Resende MR, Gustavo L, et al. 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. *Med Mycol.* 2013;225–230. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.708107>.

Motta AL, Almeida GMD de, Almeida Júnior JN de, Burattini MN, Rossi F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Brazilian J Infect Dis.* 2010;14(5):441–448. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702010000500004>.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases.* 2010;51: 561-570.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *Plos One.* 2013;8(3): 583-598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059373>.

Oberoi JK, Wattal C, Goel N, Raveendran R, Datta S, Prasad K. Non-albicans *Candida* species in blood stream infections in a tertiary care hospital at New Delhi, India. *The Indian journal of medical research.* 2012; 136(6):997.

Oliveira VKP, Ruiz L da S, Oliveira NAJ, Moreira D, Hahn RC, Melo AS de A, et al. Fungemia caused by *Candida* species in a children's public hospital in the city of São Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014;56(4):301–315. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652014000400006>.

Orsi CF, Colombari B, Blasi E. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the “*C. parapsilosis*” complex. *Med Mycol.* 2010;48(8):1024–1033. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.489233>.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62(4):1–50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>.

Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive Candidiasis. *Nat Rev.* 2018; 4:103–24.

Pasqualotto AC, Zimmerman RA, Alves SH, Aquino VR, Branco D, Wiltgen D, et al. Take Control Over Your Fluconazole Prescriptions: The Growing Importance of *Candida glabrata* as an Agent of Candidemia in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(9):898–900. <https://doi.org/10.1086/590191>.

PDUI. Plano de Desenvolvimento Urbano Integrado. 2019. Disponível em: <[https://www.pdui.sp.gov.br/rmsp/?page\\_id=56](https://www.pdui.sp.gov.br/rmsp/?page_id=56)>.

Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):2846–2856. <https://10.1128/JCM.00937-12>

Pfaller MA, Castanheira M. Nosocomial candidiasis: Antifungal stewardship and the importance of rapid diagnosis. *Med Mycol.* 2016;54(1):1–22.

Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* species from 1997-2016. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6: 79–94.

Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, et al. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: A population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(4):245-259. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12380>.

Ramos LS, Figueiredo-Carvalho MHG, Barbedo LS, Ziccardi M, Chaves ALS, Zancopé-Oliveira RM, et al. *Candida haemulonii* complex: Species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(1):111–115. <https://doi.org/10.1093/jac/dku321>.

Ramos R, Caceres DH, Perez M, Garcia N, Castillo W, Santiago E, et al. Emerging multidrug-resistant *Candida duobushaemulonii* infections in Panama hospitals: Importance of laboratory surveillance and accurate identification. *J Clin Microbiol.* 2018;56(7):371-380. <https://10.1128/JCM.00371-18>.

Romeo O, Criseo G. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using hwp1

gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;62(2):230–3. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.014>.

Romeo O, Ssordino F, Pernice I, Lo Passo C, Criseo G. A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. *J Microbiol Methods.* 2009;79(1):117–219. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.07.016>.

Romeo O, Criseo G. *Candida africana* and its closest relatives. *Mycoses.* 2011;54(6):475–486. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01939.x>.

Ruiz LS, Khouri S, Hahn RC, da Silva EG, de Oliveira VKP, Gandra RF, et al. Candidemia by Species of the *Candida parapsilosis* Complex in Children's Hospital: Prevalence, Biofilm Production and Antifungal Susseptibility. *Mycopathologia.* 2013;175(3–4):231–239. <https://10.1007/s11046-013-9616-5>.

Santolaya ME, Thompson L, Benadof D, Tapia C, Legarraga P, Cortés C. A prospective, multi-center study of *Candida* bloodstream infections in Chile. *PLoS One.* 2019;14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212924>.

Santos ER, Forno CFD, Hernandez MG, Kubiça TF, Venturini TP, Chassot F, et al. Susseptibility of *Candida* spp. Isolated from blood cultures as evaluated using the m27-a3 and new m27-s4 approved breakpoints. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014;56(6):477–482. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652014000600004>.

Silva MGC, Rodrigues GS, Gonçalves IL, Grazziotin NA. *Candida* species distribution and fluconazole susseptibility of blood isolates at a regional hospital in Passo Fundo, RS, Brazil. *J Bras Patol e Med Lab.* 2015;51(3):158–161. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20150027>.

Sipiczki M, Tap RM. *Candida vulturna* pro tempore sp. nov., a dimorphic yeast species related to the *Candida haemulonis* species complex isolated from flowers and clinical sample. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 2016;66: 4009-4015. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001302>.

Siri L, Legarraga P, García P, González T, Rabagliati R. Cambios clínicos y epidemiológicos de candidemias en pacientes adultos desde 2000 a 2013. *Revista chilena de infectologia.* 2017;34(1):19-26. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000100003>.

Sugita T, Takashima M, Poonwan N, Mekha N. (2006). *Candida pseudohaemulonii* sp. nov., an amphotericin B-and azole-resistant yeast species, isolated from the blood of a patient from Thailand. *Microbiology and immunology*. 2006; 50:469-473. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03816.x>.

O'Shaughnessy EM, Lyman CA, Walsh TJ. Amphotericin B: polyene resistance mechanisms. In *Antimicrobial drug resistance*. Humana Press. 2009: 295-305.

Sullivan DJ, We J, Bennettn DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*. 1995:1507–1521. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-7-1507>.

Tan BH, Chakrabarti A, Li RY, Patel AK, Watcharananan SP, Liu Z, et al. Incidence and species distribution of candidaemia in Asia: A laboratory-based surveillance study. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(10):946–953. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.010>.

Tavanti A, Davidson AD, Gow N a R, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida parapsilosis* Groups II and III. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):284–292. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005>.

Tavanti A, Hensgens LAM, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1455–1462. <https://doi.org/10.1128/JCM.00243-07>.

Taverna CG, Córdoba S, Vivot M, Szusz W, Vivot W, Bosso-Borgeat ME, et al. Reidentification and antifungal susceptibility profile of *Candida guilliermondii* and *Candida famata* clinical isolates from a culture collection in Argentina. *Med Mycol*. 2019;57(3):314–323. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy038>.

Thomaz DY, De Almeida JN, Lima GME, Nunes OM, Camargo CH, De Carvalho Grenfell R, et al. An azole-resistant *Candida parapsilosis* outbreak: Clonal persistence in the intensive care unit of a Brazilian teaching hospital. *Front Microbiol*. 2018;9-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02997>.

Tsai MH, Hsu JF, Yang LY, Pan Y Bin, Lai MY, Chu SM, et al. Candidemia due to uncommon *Candida* species in children: new threat and impacts on outcomes. *Nat Ssi Reports*.2018;8(1):1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33662-x>.

Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(9):1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019778>.

Vaughan-Martini A, Kurtzman CP, Meyer SA, O'Neill EB. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the asexual state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. *FEMS yeast research*. 2005;5: 463-469. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.10.008>.

Walsh TJ, Hayden T; Larone DH. *Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. John Wiley & Sons, 2018.

Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans Candida* Species. *Front Microbiol*. 2017;7(JAN):1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>.

Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat Commun*. 2018; 9: 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07556-5>.

Wille MP, Guimarães T, Campos Furtado GH, Colombo AL. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: Analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(3):288–292.

Xavier PCN, Chang MR, Paula CR, Matsumoto FE, Asensi MD, Matos M de FC, et al. Molecular characterization of *Candida* spp. isolates from patients with bloodstream infections. *Rev da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013; 46:786–792. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-1718-2013>.

Xiao M, Chen ss, Kong F, Xu XL, Yan L, Kong HS et al. Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Species Causing Candidemia in China: An Update From the CHIF-NET Study. *The Journal of Infectious Diseases*. 2020;221:139-147.

Yang YL, Chu WL, Lin CC, Zhou ZL, Chen PN, Lo H. Mixed yeast infections in Taiwan. *Medical mycology*. 2017;56(6): 770-773. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx094>.

Zhang H, Niu Y, Tan J, Liu W, Sun MA, Yang E, Liu W. Global Screening of Genomic and Transcriptomic Factors Associated with Phenotype Differences between Multidrug-Resistant and-Susceptible *Candida haemulonii* Strains. *Msystems*. 2019;4(6). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00459-19>.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE 1

### RESULTADOS DE TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA PARA CEPAS DE *CANDIDA* ISOLADAS DA CORRENTE SANGUÍNEA, PROVENIENTES DE 22 HOSPITAIS DE SÃO PAULO EM 2018

ESPÉCIE	N°	FCZ	VCZ	AmB	CAS	MICA	ANF
C.P	01	0,5	0,015	1	0,015	0,5	0,5
C.O	02	0,5	0,03	1	0,015	0,5	0,25
C.A	03	0,25	0,03	1	0,03	0,015	0,015
C.A	04	0,25	0,015	1	0,015	0,015	0,015
C.A	05	0,5	0,06	1	0,015	0,015	0,015
C.M	06	2	0,06	1	0,015	0,015	0,12
C.A	07	0,25	0,015	0,5	0,12	0,015	0,015
C.G	08	32	0,015	1	0,12	0,015	0,015
C.A	09	0,12	0,015	1	0,12	0,015	0,03
C.G	10	4	0,03	1	0,12	0,015	0,015
C.A	11	0,12	0,06	0,25	0,12	0,015	0,015
C.A	12	0,5	0,015	1	0,12	0,015	0,015
C.G	13	16	0,015	1	0,12	0,015	0,015
C.A	14	0,12	0,015	1	0,12	0,015	0,015
C.A	15	0,5	0,015	1	0,12	0,015	0,015
C.P	16	0,12	0,015	1	0,5	0,5	0,25
C.A	17	0,25	0,015	0,25	0,12	0,015	0,015
C.P	18	1	0,015	0,03	0,012	0,12	0,012
C.O	19	1	0,015	0,06	0,25	0,015	0,015
C.P	20	2	0,015	0,015	0,12	0,015	0,03
C.A	21	0,25	0,015	0,03	0,12	0,015	0,015
C.P	22	2	0,06	0,25	0,5	0,015	0,06
C.P	23	0,25	0,015	1	0,12	0,015	0,5
C.P	24	1	0,03	1	1	0,5	1
C.P	25	0,5	0,015	2	0,5	1	1
C.P	26	0,25	0,06	1	0,5	1	0,5
C.G	27	≥64	0,015	1	0,12	0,015	0,015
C.A	28	0,25	0,03	1	0,12	0,015	0,015
C.P	29	0,25	0,015	0,5	0,25	0,12	0,12
C.P	30	2	0,015	0,5	0,25	0,5	0,03
C.P	31	2	0,03	0,5	0,12	0,06	0,12
C.P	32	0,5	0,015	0,5	0,25	0,5	0,015
C.GUI	33	≥64	4	0,03	0,12	0,5	0,5
C.P	34	1	0,015	0,03	0,5	0,5	1
C.G	35	≥64	0,015	1	0,12	0,015	0,03
C.A	36	0,5	0,12	0,25	0,12	0,015	0,015
C.DU	37	≥64	0,03	8	0,12	0,03	0,06
C.H	38	4	0,015	0,25	0,12	0,015	0,015
C.H	39	0,5	0,015	1	0,12	0,06	0,015
C.T	40	0,12	0,015	0,5	0,12	0,03	0,015
C.T	41	2	0,12	1	0,12	0,015	0,015
C.T	42	0,12	0,015	1	0,03	0,03	0,015
C.T	43	2	0,25	1	0,12	0,03	0,015

C.T	44	1	0,012	1	0,12	0,12	0,015
C.T	45	0,25	0,06	1	0,12	0,03	0,015
C.T	46	1	0,06	1	0,06	0,03	0,015
C.T	47	0,12	0,015	0,25	0,03	0,015	0,015
C.T	48	2	0,25	1	0,25	0,25	0,015
C.T	49	0,25	0,03	0,5	0,12	0,015	0,015
C.K	50	-	0,25	1	0,12	0,06	0,015
C.K	51	-	1	0,5	0,12	0,06	0,015
C.K	52	-	0,015	0,5	0,25	0,06	0,015
C.KE	53	0,5	0,03	1	0,12	0,06	0,03

### CONT. APÊNDICE 1

#### RESULTADOS DE TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA PARA CEPAS DE *CANDIDA* ISOLADAS DA CORRENTE SANGUÍNEA, PROVENIENTES DE 22 HOSPITAIS DE SÃO PAULO EM 2017

ESPÉCIE	Nº	FCZ	VCZ	AmB	CAS	MICA	ANF
C.D	01	0,25	0,03	0,5	0,25	0,015	0,015
C.P	02	1	0,015	0,12	0,25	0,25	0,5
C.M	03	0,5	0,03	0,25	0,25	0,12	0,25
C.A	04	0,12	0,03	0,25	0,12	0,015	0,015
C.A	05	0,25	0,12	0,5	0,06	0,015	0,015
C.A	06	0,12	0,03	0,25	0,12	0,015	0,015
C.P	07	≥64	0,12	0,25	0,5	0,25	0,5
C.P	08	4	0,03	0,25	2	0,25	1
C.P	09	1	0,015	0,12	0,5	0,25	0,015
C.A	10	0,12	0,015	0,12	0,12	0,015	0,12
C.P	11	0,5	0,06	1	0,015	0,5	0,015
C.H.V	12	16	0,12	1	0,12	0,06	0,015
C.A	13	0,25	0,015	0,25	0,12	0,015	0,015
C.P	14	1	0,015	0,25	0,06	0,12	0,12
C.A	15	0,25	0,015	0,12	0,12	0,015	0,015
C.A	16	0,25	0,015	0,06	0,12	0,015	0,015
C.A	17	2	0,06	0,25	0,12	0,015	0,015
C.P	18	0,5	0,015	0,25	1	0,5	0,12
C.A	19	0,12	0,015	0,25	0,03	0,015	0,015
C.H.V	20	32	0,06	0,25	0,06	0,06	0,03
C.P	21	0,5	0,015	0,25	0,25	0,25	0,03
C.A	22	0,12	0,015	0,25	0,12	0,015	0,015
C.P	23	0,5	0,015	0,03	0,5	0,25	0,5
C.P	24	0,25	0,015	0,06	1	0,25	1
C.G	25	32	0,5	0,25	0,12	0,015	0,03
C.P	26	0,5	0,03	0,12	1	1	2
C.P	27	0,5	0,015	0,06	0,5	0,015	0,015
C.A	28	0,12	0,015	0,06	0,12	0,015	0,015
C.P	29	32	0,5	0,25	0,12	0,06	0,015

C.P	30	0,5	0,25	0,5	0,12	0,5	1
C.A	31	0,25	0,03	0,5	0,12	0,015	0,015
C.P	32	0,5	0,03	0,5	0,5	0,25	1
C.H.V	33	16	0,06	1	0,12	0,12	0,015
C.P	34	16	0,5	0,5	0,25	0,25	0,03
C.A	35	0,25	0,015	0,5	0,12	0,015	0,015
C.P	36	2	0,015	0,5	0,12	0,015	0,5
C.A	37	0,12	0,12	0,5	0,06	0,015	0,015
C.GUI	38	2	0,25	0,25	0,12	0,06	0,5
C.P	39	0,5	0,015	1	0,5	0,06	1
C.D	40	0,12	0,015	0,06	0,12	0,015	0,015
C.P	41	0,25	0,015	1	0,5	0,015	0,015
C.A	42	0,5	0,015	0,5	0,12	0,015	0,015
C.A	43	0,25	0,015	0,5	0,06	0,015	0,015
C.A	44	0,25	0,015	0,25	0,06	0,015	0,015
C.P	45	0,5	0,015	0,5	0,25	1	2
C.G	46	>64	0,25	0,5	0,12	0,015	0,015
C.G	47	16	0,25	0,5	0,25	0,015	0,015
C.G	48	32	2	0,5	0,12	0,015	0,015
C.G	49	32	0,25	1	0,25	0,015	0,06
C.G	50	32	0,12	1	0,12	0,015	0,015
C.G	51	32	4	1	0,12	0,015	0,015
C.A	52	2	0,06	1	0,12	0,015	0,015
C.O	53	0,5	0,015	1	0,12	0,12	0,25
C.A	54	0,25	0,03	1	0,06	0,015	0,015
C.O	55	0,5	0,015	1	0,12	0,12	0,25
C.A	56	0,5	0,12	1	0,06	0,015	0,015
C.P	57	0,25	0,015	1	0,5	0,5	0,5
C.A	58	1	0,12	1	0,015	0,015	0,015
C.A	59	0,25	0,015	0,5	0,12	0,015	0,015
C.P	60	0,5	0,015	0,5	0,5	0,5	0,5
C.A	61	0,25	0,015	0,5	0,12	0,015	0,015
C.P	62	1	0,015	1	0,25	0,25	0,5
C.P	63	2	0,25	1	0,5	1	1
C.P	64	1	0,25	1	0,25	2	2
C.P	65	0,5	0,015	1	0,25	0,5	1
C.A	66	0,5	0,015	0,25	0,12	0,015	0,015
C.P	67	1	0,015	1	0,5	0,5	0,5
C.G	68	16	2	1	0,12	0,015	0,015
C.P	69	2	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
C.P	70	4	0,25	1	0,5	0,5	2
C.G	71	8	1	1	0,25	0,015	0,015
C.P	72	1	0,12	1	0,12	0,5	0,5
C.P	73	0,5	0,06	1	0,25	0,5	2
C.P	74	0,5	0,015	1	0,25	0,5	1
C.T	75	1	0,12	1	0,06	0,03	0,015
C.T	76	0,5	0,06	0,5	0,12	0,015	0,015
C.T	77	1	0,12	0,5	0,06	0,03	0,015
C.T	78	1	0,12	1	0,06	0,03	0,015
C.T	79	0,25	0,03	1	0,06	0,03	0,015
C.T	80	1	0,12	1	0,06	0,03	0,015

C.T	81	0,5	0,03	1	0,12	0,015	0,015
C.T	82	1	0,12	1	0,06	0,03	0,015
C.T	83	0,5	0,06	0,5	0,12	0,06	0,015
C.T	84	≥64	8	1	0,06	0,03	0,015
C.T	85	0,5	0,3	1	0,12	0,015	0,015
C.K	86	-	8	1	0,5	0,06	0,015
C.K	89	-	0,25	1	0,12	0,06	0,015
C.K	88	-	1	0,5	0,12	0,06	0,015
C.K	89	-	0,015	0,5	0,25	0,06	0,015
C.KE	90	0,5	0,03	1	0,12	0,06	0,03
C.PE	91	1	0,12	0,5	0,12	0,015	0,015

\* C.A: *C. albicans* ss; C.D: *C. dubliniensis*; C.DU: *C. duobushaemulonii*; C.G: *C. glabrata* ss; C.GUI: *C. guilliermondii* ss; C.H: *C. haemulonii* ss; C.H.V: *C. haemulonii* var *vulnera*; C.K: *C. krusei*; C.KE: *C. kefyr*; C.P: *C. parapsilosis* ss; C.M: *C. metapsilosis*; C.O: *C. orthopsilosis*; C.PE: *C. pelliculosa*; C.T: *C. tropicalis*.

## APÊNDICE 2

### EPIDEMIOLOGICAL CUTOFF VALUES – ECVs, ADOTADOS NESSE ESTUDO PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *CANDIDA*

Espécies de <i>Candida</i>	Antifúngico	ECV (µg/mL)
<i>C. albicans stricto sensu</i> <i>C. parapsilosis stricto sensu</i> <i>C. glabrata stricto sensu</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. krusei</i> <i>C. metapsilosis</i>	Anfotericina B *	2
<i>C. orthopsilosis</i>	Fluconazol ** Voriconazol ** Anfotericina B * Caspofungina ** Micafungina ** Anidulafungina **	2 0.06 2 0.5 1 2
<i>C. guilliermondii stricto sensu</i>	Fluconazol * Voriconazol ** Anfotericina B **	8 0.25 2
<i>C. dubliniensis</i>	Fluconazol * Voriconazol ** Anfotericina B * Caspofungina ** Micafungina * Anidulafungina *	0.5 0.03 2 0.12 0.12 0.12
<i>C. kefyr</i>	Fluconazol ** Voriconazol ** Caspofungina ** Micafungina ** Anidulafungina **	1 0.015 0.03 0.12 0.25
<i>C. pelliculosa</i>	Fluconazol ** Voriconazol * Caspofungina *	4 0.25 0.06
<i>C. glabrata</i>	Voriconazol	0.25

\* M59 (17)

\*\* Pfaller e Diekema, 2012 (18)

