

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA
EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA
EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MARIA HELENA GALDINO FIGUEIREDO DE CARVALHO

**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS ASSOCIADAS À
VIRULÊNCIA E AO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE
AOS ANTIFÚNGICOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DO
COMPLEXO *Candida glabrata***

Rio de Janeiro

2017

MARIA HELENA GALDINO FIGUEIREDO DE CARVALHO

**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS ASSOCIADAS À
VIRULÊNCIA E AO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE
AOS ANTIFÚNGICOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DO
COMPLEXO *Candida glabrata***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores:
Prof^a. Dr^a. Rosely Maria Zancopé Oliveira
Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes

Rio de Janeiro

2017

Carvalho, Maria Helena Galdino Figueiredo de .

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS ASSOCIADAS À VIRULÊNCIA E AO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DO COMPLEXO *Candida glabrata* / Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho. - Rio de Janeiro, 2017.

166 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2017.

Orientadora: Rosely Maria Zancopé Oliveira.

Co-orientador: Rodrigo de Almeida Paes.

Bibliografia: f. 100-140

1. *Candida glabrata*. 2. *Candida nivariensis*. 3. Antifúngicos. 4. Biofilme. 5. Enzimas Hidrolíticas. I. Título.

MARIA HELENA GALDINO FIGUEIREDO DE CARVALHO

**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS ASSOCIADAS À VIRULÊNCIA E AO PERFIL
DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DO
COMPLEXO *Candida glabrata***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosely Maria Zancopé Oliveira.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Estevão Portela Nunes (Presidente)

Dr.^a Célia Maria de Almeida Soares

Dr.^a Andréa Regina de Souza Baptista

Dr. André Luís Souza dos Santos

Dr. Marcel Menezes Lyra da Cunha

Dr. Leonardo Silva Barbedo (Revisor/ Suplente)

Aos meus queridos pais
José de Figueiredo (*in memoriam*) e Francisca Galdino,
meus primeiros mestres,
que me orientaram e me incentivaram
a me tornar uma pessoa cada vez melhor.
Ao meu amado esposo Eduardo Rampasso de Carvalho,
pelo amor, paciência, compreensão, companheirismo e bom humor.
Às minhas lindas filhas Juliana e Luiza,
pelos sorrisos constantes que iluminam a minha vida
e me fazem crer que tudo vale a pena quando se tem amor.

“Um dia de cada vez,
que é pra não perder
as boas surpresas da vida!”

Clarice Lispector

(1920-1977)

AGRADECIMENTOS

À minha admirada orientadora Prof^a. Dr^a. Rosely Maria Zancopé que está sempre de portas abertas para mim. Muito obrigada pela oportunidade, confiança e acima de tudo pelo carinho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes com quem tenho a oportunidade de conviver diariamente e dividir não só o trabalho, mas também alegrias, conquistas, perdas e novos desafios. Obrigada pela amizade, carinho, compreensão e constante apoio.

Ao Prof. Dr. André Luís Souza dos Santos que acompanhou a evolução deste trabalho durante esses quatro anos de doutorado. Obrigada pelo carinho, pela atenção, pelas sugestões e por abrir as portas do seu laboratório para mim.

À Prof^a. Dr^a. Valdiléa Veloso dos Santos que participou da minha banca de qualificação de doutorado. Obrigada pela atenção e sugestões.

À Prof^a. Dr^a. Livia Souza Ramos que participou ativamente deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, pelo seu comprometimento com meu trabalho e por sempre me receber com um sorriso no rosto.

Ao meu revisor e suplente Prof. Dr. Leonardo Silva Barbedo que participou e contribuiu muito para a realização deste trabalho. Obrigada pela sua disponibilidade, dedicação, dicas e correções.

Aos professores Dr. Estevão Portela Nunes, Dr^a. Célia Maria de Almeida Soares, Dr. Marcel Menezes Lyra da Cunha, Dr^a. Andréa Regina de Souza Baptista e Dr. André Luis Souza dos Santos por aceitarem participar da minha banca examinadora de doutorado. Obrigada pela troca de conhecimentos, sugestões e críticas na finalização desse trabalho.

À plataforma de sequenciamento gênomico de DNA PDTIS/ Fiocruz pela execução do sequenciamento das amostras envolvidas neste estudo.

Ao meu amigo Fábio Brito dos Santos pela amizade e carinho que vão além do convívio diário no laboratório. Obrigada imensamente pelo constante apoio, pelo belo trabalho em equipe e pelo incentivo a buscar sempre novos desafios.

À minha amiga Rowena Alves Coelho com quem também tenho o prazer de conviver diariamente compartilhando não só o trabalho, mas também nossas emoções. Obrigada pelo carinho e por ser essa pessoa sempre prestativa e comprometida com tudo que você faz.

À minha amiga Monica dos Santos Elias pelas suas gargalhadas e pelo seu bom humor a qualquer hora. Obrigada pelo carinho e pelas boas risadas.

Aos meus amigos Jonas Pereira Campos, Iara Bastos, Juliana Vitória e Marcelle pela dedicação de vocês ao laboratório e pelo excelente trabalho em equipe.

Ao pessoal do laboratório de imunodiagnóstico Mauro Muniz, Cláudia Vera Pizzini, Manoel Marques Evangelista de Oliveira, Marcos de Abreu Almeida, Fernando Almeida da Silva, Luã Cardoso e Vanessa Brito de Souza Rabello sempre atenciosos e prestativos.

Ao pessoal do laboratório de Micologia Ambiental Luciana Trilles, Rosani Santos Reis e Isabel Cristina Bonna. Obrigada pela atenção e ajuda sempre que possível.

Aos meus amigos Gilberto Reis e Mônica Martins Bastos por todo carinho, simpatia e cuidado no preparo de muitos e muitos meios de cultura. Muito obrigada por tudo.

À querida Carla Pena por sua agilidade, disponibilidade e atenção.

À minha amiga Priscila Sá sempre disposta a ajudar. Muito obrigada pelo carinho e atenção durante essa minha jornada acadêmica.

Aos meus colegas da turma de Doutorado e a todos os professores do curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, pelos momentos alegres compartilhados.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Figueiredo-Carvalho, M H G. **Características fenotípicas associadas à virulência e ao perfil de suscetibilidade aos antifúngicos em isolados clínicos do complexo *Candida glabrata***. Rio de Janeiro, 2017. 166 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

Candida glabrata é um patógeno emergente nos hospitais públicos e privados brasileiros. Baseado em análises moleculares, *Candida nivariensis* e *Candida bracarensis* foram descritas como duas novas espécies filogeneticamente relacionadas à *C. glabrata*, formando o complexo *C. glabrata*. O objetivo deste trabalho foi estudar as características fenotípicas associadas à virulência e ao perfil de suscetibilidade aos antifúngicos em isolados clínicos previamente identificados como *C. glabrata* oriundos de pacientes com quadro de candidíase entre 1998 e 2015 em dois hospitais públicos no município do Rio de Janeiro. Um total de 92 isolados clínicos foi submetido à análise molecular com base na amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal. A produção de enzimas hidrolíticas foi avaliada em placas ou tubos contendo meios ou reagentes específicos e a formação de biofilme foi determinada pelo método do cristal violeta e pelo ensaio de redução do XTT. O perfil de suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* foi determinado pelo método da microdiluição em caldo (CLSI, M27-A3). *Candida glabrata stricto sensu* foi a espécie predominante (n=91), seguida por *C. nivariensis* (n=1) a qual foi pela primeira vez descrita no Brasil. *C. bracarensis* não foi encontrada neste estudo. Em geral, os isolados de *C. glabrata stricto sensu* foram bons produtores de catalase, aspártico protease, esterase, fitase e hemolisina. Entretanto, não foram detectadas atividades *in vitro* de caseinase e fosfolipase. Além disso, esses isolados foram capazes de formar biofilme. Todos os isolados de *C. glabrata stricto sensu* foram suscetíveis à 5-fluorocitosina. Entretanto, esses isolados apresentaram resistência à anfotericina B (9,9%), fluconazol (15,4%), itraconazol (5,5%), caspofungina (8,8%) ou micafungina (15,4%). Alguns isolados foram classificados como tipo não-selvagem para o voriconazol (33,0%) e para o posaconazol (4,4%). Anfotericina B e micafungina foram mais eficazes do que o itraconazol e a fluorocitosina frente aos isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* na presença do biofilme. Relações estatisticamente significativas foram encontradas (i) entre o perfil de suscetibilidade da micafungina e a produção de esterase, bem como entre o perfil de suscetibilidade do fluconazol, itraconazol, micafungina e a atividade hemolítica; e (ii) entre a produção de diferentes enzimas hidrolíticas, esterase e hemolisina, e a formação de biofilme ($p < 0,05$). O isolado de *C. nivariensis* foi excelente produtor de aspártico protease e catalase, e um bom produtor de fitase, porém, nenhuma atividade *in vitro* foi detectada para as demais enzimas testadas. Este isolado também foi capaz de formar biofilme. O isolado de *C. nivariensis* foi suscetível à anfotericina B, caspofungina e 5-fluorocitosina, porém suscetível dose-dependente ao itraconazol e resistente ao fluconazol e à micafungina. Para voriconazol e posaconazol, este isolado foi classificado como tipo selvagem e tipo não-selvagem, respectivamente. Este estudo reforça o potencial de virulência dessas espécies e destaca o perfil de resistência de alguns isolados aos principais fármacos geralmente usados no tratamento da candidíase.

Palavras chaves: Antifúngicos; *Candida glabrata*; *Candida nivariensis*; Virulência

Figueiredo-Carvalho, M H G. **Phenotypic characteristics associated with virulence and antifungal susceptibility profile in clinical isolates of *Candida glabrata* complex**. Rio de Janeiro, 2017. 166 s. Thesis [PhD in Clinic Research in Infectious Diseases] – Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases.

ABSTRACT

Candida glabrata is an emerging pathogen in public and private Brazilian hospitals. Based on molecular analysis, two new species phenotypically closely related to resemble *C. glabrata* have been described: *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. This study evaluated the phenotypic characteristics associated with virulence and the antifungal susceptibility profile in clinical isolates previously identified as *C. glabrata* from patients with candidiasis between 1998 and 2015 in two public hospitals in the city of Rio de Janeiro. A total of 92 clinical isolates were submitted to molecular analysis based on the amplification and sequencing of the ribosomal DNA ITS1-5.8S-ITS2 region. The production of hydrolytic enzymes was evaluated in plates or tubes containing specific media or reagents and biofilm formation was evaluated by the crystal violet method and the XTT reduction assay. The *in vitro* antifungal susceptibility profile was determined by the broth microdilution method (CLSI, M2-A3). *Candida glabrata stricto sensu* was the predominant species (n = 91), followed by *C. nivariensis* (n = 1), which was for the first time described in Brazil. *Candida bracarensis* was not found in this study. Overall, *C. glabrata stricto sensu* isolates were good producers of catalase, aspartic protease, esterase, phytase, and hemolysin. No *in vitro* activities were detected for caseinase and phospholipase. Moreover, these isolates were able to produce biofilm. All isolates of *C. glabrata stricto sensu* were susceptible to flucytosine. However, these isolates showed resistance to amphotericin B (9.9%), fluconazole (15.4%), itraconazole (5.5%), caspofungin (8.8%), or micafungin (15.4%). Some isolates were classified as non-wild-type for voriconazole (33.0%) and posaconazole (4.4%). Amphotericin B and micafungin were more effective than itraconazole and fluorocytosine against to clinical isolates of *C. glabrata stricto sensu* forming biofilms. Statistically significant correlations were identified between (i) micafungin minimum inhibitory concentration (MIC) and esterase production, as well as between fluconazole and micafungin MIC and hemolytic activity, and between amphotericin B MIC and phytase production, and between (ii) the production of different hydrolytic enzymes, esterase and hemolysin, and biofilm formation ($p < 0.05$). The *C. nivariensis* isolate was an excellent producer of aspartic protease and catalase, and a good phytase producer. No *in vitro* activity was detected for the other enzymes tested. This isolate was also able to form biofilm, susceptible to amphotericin B, caspofungin and flucytosine, but susceptible dose-dependent to itraconazole, and resistant to fluconazole and micafungin. For voriconazole and posaconazole, this isolate was classified as wild type and non-wild type, respectively. This study reinforces the virulence potential of these species and highlights the resistance profile of some isolates to the main drugs commonly used for candidiasis management.

Keywords: Antifungals; *Candida glabrata*; *Candida nivariensis*; Virulence

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Fotos ilustrativas da microscopia óptica (aumento de 400x) do Complexo *Candida glabrata*, a partir do microcultivo em ágar Corn Meal-Tween 80 após 48 horas a 30°C. **(a)** *C. glabrata* ATCC 2001; **(b)** *C. nivariensis* WM 09.150 e **(c)** *C. bracarensis* WM 14.01. 25
- Figura 2 -** Esquema representativo da formação de biofilme fúngico. **(1)** adesão das células à superfície biótica ou abiótica; **(2)** divisão celular e proliferação; **(3)** secreção de substância polimérica extracelular que aprisiona as células e facilita a adesão célula-célula e célula-superfície, tendo como consequência a formação de microcolônias; **(4)** maturação da estrutura tridimensional, provendo um suporte estrutural para a arquitetura do biofilme e **(5)** dispersão das células em torno do substrato (setas amarelas). Nesta etapa, as células podem se separar da estrutura do biofilme e retornar para a fase planctônica de crescimento, permitindo a colonização de novas superfícies em outros locais, completando assim o ciclo de vida do biofilme. 29
- Figura 3 -** Esquema representativo do mecanismo de ação dos antifúngicos poliênicos, azólicos, equinocandinas e do análogo da pirimidina (5-fluorocitosina). 38
- Figura 4 -** Esquema de diluição dos fármacos antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (Protocolo M27-A3). 55
- Figura 5 -** Esquema de diluição dos fármacos antifúngicos fluconazol e 5-fluorocitosina pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (Protocolo M27-A3). 56
- Figura 6 -** Macromorfologia de *Candida* em meio ágar Sabouraud dextrose. **(a)** *C. glabrata* ATCC 2001 e **(b)** um isolado do sítio respiratório (DM 28). 60
- Figura 7 -** Macromorfologia de espécies de *Candida* no meio cromogênico CHROMagar *Candida*. **(a)** no sentido horário a partir de 12 61

horas: *C. albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 2001; **(b)** no sentido horário a partir de 12 horas: *C. glabrata* ATCC 2001, *C. nivariensis* WM 09.150 e *C. bracarensis* WM 14.01; **(c)** isolado clínico do sítio circulatório (DM 45) e **(d)** isolado clínico do sítio respiratório (DM 28). Posteriormente, os isolados DM 45 e DM 28 foram identificados molecularmente como *C. glabrata* e *C. nivariensis*, respectivamente.

- Figura 8 -** Dendrograma baseado na análise dos perfis bioquímicos obtidos pelo Vitek[®] 2 de 92 isolados clínicos previamente identificados como *C. glabrata* e da cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001. *Candida albicans* ATCC 18804 foi utilizada como grupo externo. A similaridade entre os perfis bioquímicos foi analisada pelo programa DendroUPGMA sendo utilizados o coeficiente de Jaccard e 100 réplicas de *bootstrap* na construção do dendrograma. 63
- Figura 9 -** Dendrograma baseado na análise da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA das sequências de 99 táxons, sendo 92 isolados, três cepas de referência (*C. glabrata* ATCC 2001, *C. bracarensis* WM 14.01 e *C. nivariensis* WM 09.150) e quatro sequências oriundas do GenBank (AY939793, GU199440, NR_077073, HQ876043). A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Join (NJ). A distância evolutiva foi computada utilizando o método *Maximum Composite Likelihood*. Um total de 484 bases foi observado no conjunto final (Programa MEGA 6.0). 67
- Figura 10 -** Fotos ilustrativas de isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* produtores de enzimas hidrolíticas. **(a)** Aspártico protease (ágar YCB/ BSA); **(b)** Esterase, (ágar Tween); **(c)** Fitase (ágar fitato de cálcio) e **(d)** Atividade hemolítica (ágar sangue de carneiro). As atividades enzimáticas foram expressas como valor de *Pz* ($Pz=a/b$) sendo **(a)** o diâmetro da colônia e **(b)** o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação [vide **(b)**]. **(e)** Teste da 71

catalase onde a coluna de bolhas indica a hidrólise do peróxido de hidrogênio.

- Figura 11** - Percentual de isolados do complexo *C. glabrata* separados por sítio de isolamento em relação **(a)** à produção de biomassa e **(b)** atividade metabólica. 75
- Figura 12** - Variação da concentração inibitória mínima (CIM) em isolados clínicos do complexo *C. glabrata*. **(a)** Anfotericina B; **(b)** Itraconazol; **(c)** Micafungina; **(d)** 5-fluorocitosina, nas células em suspensão e no biofilme. Os isolados foram classificados como suscetível (S), intermediário (I) ou resistente (R). 81
- Figura 13** - Expressão diferencial de enzimas hidrolíticas em 91 isolados de *C. glabrata stricto sensu* com diferentes perfis de suscetibilidade aos antifúngicos. **(a)** Atividade hemolítica em relação a suscetibilidade ao fluconazol; **(b)** Atividade hemolítica em relação a suscetibilidade ao itraconazol; **(c)** Atividade hemolítica em relação a suscetibilidade à micafungina; **(d)** Produção de esterase em relação a suscetibilidade a micafungina. As linhas representam as medianas de cada grupo. Em todos os casos, diferenças entre as medianas dos grupos com diferentes perfis de suscetibilidade foram estatisticamente significativos (p -valor $\leq 0,05$). 83

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Noventa e dois isolados clínicos previamente identificados como <i>C. glabrata</i> , separados por diferentes sítios de isolamento, provenientes de pacientes imunocomprometidos com quadro de candidíase oriundos de dois hospitais públicos do município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2015.	45
Quadro 2 -	Critérios para avaliação da produção de enzimas hidrolíticas de acordo com o valor de Pz ($Pz = a/b$) sendo (a) o diâmetro da colônia e (b) o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação.	49
Quadro 3 -	Critérios para avaliação da produção de biomassa pelo método de coloração do Cristal Violeta e da viabilidade celular pelo ensaio de redução do XTT utilizando o meio RPMI 1640 para a produção de biofilme.	52
Tabela 1 -	Caracterização bioquímica de 92 isolados oriundos de diferentes espécimes clínicos provenientes de pacientes imunocomprometidos com quadro de candidíase em dois hospitais públicos no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2015.	62
Tabela 2 -	Isolados clínicos do complexo de espécies <i>C. glabrata</i> de acordo com o perfil bioquímico obtido pelo Vitek® 2 e o sítio de isolamento das amostras.	64
Tabela 3 -	Perfil bioquímico de 92 isolados clínicos identificados pelo Vitek® 2 como <i>C. glabrata</i> .	65
Tabela 4 -	Distribuição de haplótipos após o alinhamento de 91 sequências de nucleotídeos de isolados clínicos de <i>C. glabrata stricto sensu</i> oriundas do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2.	68
Tabela 5 -	Isolados clínicos de <i>C. glabrata stricto sensu</i> de acordo com o perfil genotípico (haplótipo) obtido após sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 e o sítio de isolamento das amostras.	69
Tabela 6 -	Número de isolados clínicos de <i>C. glabrata stricto sensu</i> em comum após análise do resultado do perfil bioquímico e dos haplótipos.	70

Tabela 7 -	Produção de biomassa e viabilidade celular em meio RPMI1640 e YNB suplementado com glicose por isolados clínicos de <i>C. glabrata stricto sensu</i> e <i>C. nivariensis</i> .	73
Tabela 8 -	Perfil de suscetibilidade aos antifúngicos <i>in vitro</i> de isolados clínicos do complexo de espécies de <i>C. glabrata</i> oriundos de pacientes imunocomprometidos com quadro de candidíase em dois hospitais públicos no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2015 pelo método da microdiluição em caldo (Protocolo M27-A3, CLSI).	77
Tabela 9 -	Resistência a dois ou mais fármacos antifúngicos em isolados clínicos de <i>C. glabrata stricto sensu</i> e <i>C. nivariensis</i> .	80
Tabela 10 -	Relação entre o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos e a produção de diferentes enzimas hidrolíticas em isolados clínicos de <i>C. glabrata stricto sensu</i> .	82
Tabela 11 -	Correlação entre a produção de enzimas hidrolíticas relacionadas à virulência e as concentrações inibitórias mínimas de fármacos antifúngicos em 91 isolados clínicos de <i>C. glabrata stricto sensu</i> .	84
Tabela 12 -	Relação entre a produção de diferentes enzimas hidrolíticas e a formação de biofilme em isolados clínicos de <i>C. glabrata stricto sensu</i> .	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC	- 5-fluorocitosina
ABC	- <i>ATP Binding Cassete</i> (Cassete vinculado ao ATP)
ANF B	- Anfotericina B
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de microrganismos Norte Americana)
ATP	- Adenosina Trifosfato
BSA	- <i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CAS	- Caspofungina
CDR	- <i>Candida Drug Resistance</i> (Gene de resistência à droga em <i>Candida</i> spp.)
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CIMB	- Concentração Inibitória Mínima no Biofilme
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de padronização clínica e laboratorial)
CV	- Cristal Violeta
dATP	- Deoxi-Adenosina Trifosfato
dCTP	- Deoxi-Citosina Trifosfato
dGTP	- Deoxi-Guanidina Trifosfato
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido Desoxiribonucléico
dNTP	- Deoxi-Nucleotídeo Trifosfato
dTTP	- Deoxi-Timidina Trifosfato
ECV	- <i>Epidemiology Cutoff Value</i> (Pontos de corte epidemiológicos)
EDTA	- <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> (Ácido tetracético etilenodiamino)
Elisa	- <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
ERG	- <i>Ergosterol Biosynthetic Enzymes</i> (Enzimas biossintéticas do ergosterol)
Fiocruz	- Fundação Oswaldo Cruz
FKS	- <i>Glucan synthase genes</i> (Genes da sintase glucano)
FLZ	- Fluconazol
INCA	- Instituto Nacional de Câncer

INI	- Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
ITC	- Itraconazol
ITS	- <i>Internal Transcribed Spacer</i> (Região de transcrição interna)
MCF	- Micafungina
MDR	- <i>Multidrug Resistance</i> (Gene de resistência à multidrogas)
MFS	- <i>Major Facilitators Superfamily</i> (Superfamília de transportadores facilitadores principais)
MG	- Média Geométrica
MLST	- <i>Multilocus Sequence Typing</i> (Tipagem por sequências multilocus)
Non-WT	- non-Wild Type (Tipo não-selvagem)
PBS	- <i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Salina Tamponada com fosfato)
PCR	- <i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PDTIS	- Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
POS	- Posaconazol
R	- Resistente
RNA	- Ácido Ribonucléico
RPMI	- <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Instituto Memorial <i>Rosweell Park</i>)
S	- Suscetível
SDD	- Suscetível dose-dependente
TBE	- Tris borato-EDTA
Tris	- Tris (Hidroximetil) Aminometano
UV	- Ultravioleta
VRC	- Voriconazol
WT	- Wild Type (Tipo selvagem)
XTT	- 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5[(fenil-amino) carbonil]-2H-tetrazólio hidróxido)
YCB	- <i>Yeast Carbon Base</i> (Meio base de carbono para leveduras)
YNB	- <i>Yeast Nitrogen Base</i> (Meio base de nitrogênio para leveduras)
YP	- <i>Yeast extract Peptone</i> (Meio extrato de levedura e peptona)
YPD	- <i>Yeast extract Peptona Dextrose</i> (Meio extrato de levedura, peptona e dextrose)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Candidíase ou Candidose	19
1.2 Manifestações Clínicas	19
1.3 Epidemiologia das Infecções Fúngicas Invasivas por <i>Candida</i> spp	21
1.4 <i>Candida glabrata</i>	24
1.5 O Complexo <i>Candida glabrata</i>	25
1.6 Fatores de Virulência de <i>Candida</i> spp	27
1.7 Diagnóstico Laboratorial	34
1.8 Tratamento	36
1.9 Fármacos Antifúngicos	37
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivos Específicos	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Cepas de Referência	44
4.2 Isolados Clínicos	44
4.3 Confirmação Fenotípica	46
4.3.1 <u>Reisolamento e avaliação quanto à viabilidade e pureza</u>	46
4.3.2 <u>Identificação bioquímica pelo Vitek® 2</u>	46
4.4 Preservação dos Isolados Clínicos	47
4.5 Identificação Molecular	47
4.5.1 <u>Extração do DNA genômico</u>	47
4.5.2 <u>Amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal</u>	48
4.6 Produção de Enzimas Hidrolíticas	48
4.6.1 <u>Atividade da aspártico protease</u>	49
4.6.2 <u>Atividade da caseinase</u>	50
4.6.3 <u>Atividade das enzimas lipolíticas</u>	50

4.6.4 <u>Atividade da fitase</u>	50
4.6.5 <u>Atividade hemolítica</u>	51
4.6.6 <u>Atividade da catalase</u>	51
4.7 Formação de Biofilme	51
4.7.1 <u>Produção de biomassa</u>	51
4.7.2 <u>Viabilidade celular</u>	53
4.8 Teste de Suscetibilidade aos Antifúngicos (Células em Suspensão)	53
4.9 Teste de Suscetibilidade aos Antifúngicos (Células no Biofilme)	58
4.10 Análise de Resultados	58
5 RESULTADOS	60
5.1 Confirmação Fenotípica	60
5.1.1 <u>Características macromorfológicas das leveduras</u>	60
5.1.2 <u>Identificação bioquímica pelo Vitek® 2</u>	62
5.2 Identificação Molecular	66
5.3 Produção de Enzimas Hidrolíticas	70
5.4 Formação de Biofilme	73
5.5 Perfil de Suscetibilidade aos Antifúngicos (Células em Suspensão)	76
5.6 Perfil de Suscetibilidade aos Antifúngicos (Células no Biofilme)	80
5.7 Relação entre o Perfil de Suscetibilidade aos Antifúngicos (Células em Suspensão) e a Produção de Enzimas Hidrolíticas	82
5.8 Relação entre a Produção de Enzimas Hidrolíticas e a Formação de Biofilme em Isolados Clínicos de <i>C. glabrata</i>	84
5.9 Outras Correlações	85
6 DISCUSSÃO	86
7 CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS	100
APÊNDICES	141

APÊNDICE A – Artigo científico publicado. First description of <i>Candida nivariensis</i> in Brazil: Antifungal Susceptibility Profile and Potential Virulence Attributes.....	142
APÊNDICE B – Artigo científico publicado. Relationship between the Antifungal Susceptibility Profile and the Production of Virulence-Related Hydrolytic Enzymes in Brazilian Clinical Strains of <i>Candida glabrata</i>	151
ANEXOS	162
ANEXO A – Intervalo da concentração inibitória mínima para os diferentes fármacos frente às cepas de referência de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 e <i>C. krusei</i> ATCC 6258.....	163
ANEXO B – Critérios de interpretação para testes de suscetibilidade antifúngica de <i>Candida</i> spp. para 5-fluorocitosina e itraconazol (Protocolo M27-S3, CLSI 2008).....	164
ANEXO C – Critérios de interpretação para testes de suscetibilidade antifúngica de <i>Candida</i> spp. para o fluconazol (Protocolo M27-S4, CLSI 2012).....	165
ANEXO D – Critérios de interpretação para testes de suscetibilidade antifúngica de <i>Candida</i> spp. para as equinocandinas (Protocolo M27-S4, CLSI 2012).....	166

1 INTRODUÇÃO

1.1 Candidíase ou Candidose

A candidíase ou candidose é uma micose causada por leveduras do gênero *Candida*, as quais são ubíquas no meio ambiente, podendo ser encontradas no solo, ambientes marinhos, objetos inanimados, plantas e animais (LACAZ et al., 2002). As espécies mais comumente isoladas são *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* (LEROY et al., 2009; PFALLER et al., 2012c; BASSETTI et al., 2015). Entretanto, outras espécies emergentes têm sido descritas como agentes etiológicos de candidíases como *Candida viswanathii*, *Candida inconspicua*, *Candida fermentati*, *Candida famata*, *Candida haemulonii*, *Candida ciferrii*, *Candida lipolytica*, *Candida auris*, entre outras (CÓRDOBA et al., 2011; EMARA et al., 2015; RAMOS; BRANQUINHA; SANTOS, 2017).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. São microrganismos comensais que habitam o trato gastrointestinal, fazendo parte também da microbiota oral, urogenital e da pele (DIGNANI; SOLOMKIM; ANAISSE, 2003).

Esses microrganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimaduras, inserção de cateteres ou procedimentos médicos invasivos. Alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade) ou envelhecimento, ou mais frequentemente associadas a doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunossupressão induzida por atos médicos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; NUCCI et al., 2010; SILVA et al., 2012).

1.2 Manifestações Clínicas

Micoses causadas por *Candida* spp. apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas tais como formas superficiais, com acometimento cutâneo e mucocutâneo, ou formas sistêmicas graves podendo envolver múltiplos órgãos, após

disseminação hematogênica do agente (RÜPING; VEHRESCHILD; CORNELLY, 2008; SILVA et al., 2012).

A candidíase cutânea pode se apresentar de diferentes formas: (i) intertrigo, localizada nas áreas de dobras da pele como axila, virilhas, sulco interglúteo, prega submamária e em pessoas obesas na prega suprapúbica produzindo intenso eritema, edema, exsudado purulento e pústulas; (ii) lesões interdigitais palmares e plantares que se caracterizam pela presença de fissura central, circundada pela pele macerada despregada e branca; (iii) foliculite pruriginosa com invasão dos pelos e abscessos ao redor do folículo piloso e (iv) onicomicose com acometimento da unha (oníquia) e borda da unha (paroníquia). *Diabetes mellitus* e a síndrome da imunodeficiência adquirida [*Acquired immunodeficiency syndrome – aids*] também estão associados à candidíase cutânea (LACAZ et al., 2002).

Na candidíase mucocutânea, os tecidos da mucosa oral e vaginal são os mais atingidos. A candidíase oral se manifesta através de lesões na boca, língua, palato, faringe e esôfago. Essa manifestação de candidíase é caracterizada pelo aparecimento de pequenas pápulas brancas, muito aderentes formando uma camada cremosa que pode cobrir a língua, o palato e a faringe. É muito comum em crianças, pacientes com câncer e em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LACAZ et al., 2002). A candidíase vaginal (ou vulvovaginal) manifesta-se pelo aparecimento de placas membranosas brancas e/ ou um corrimento esbranquiçado de aspecto leitoso, originando prurido intenso. A candidíase vulvovaginal pode se tornar recorrente (com episódios agudos a cada três meses aproximadamente) sem motivo aparente ou em consequência de uma antibioticoterapia utilizada muitas vezes, ou durante a gestação, diabetes, terapia hormonal, terapia imunossupressora e excepcionalmente em casos de aids (FIDEL; SOBEL, 1996; LACAZ et al., 2002).

Dentre as formas sistêmicas, as infecções de corrente sanguínea (também conhecidas como candidemia) são as manifestações mais comuns de candidíase invasiva em ambientes hospitalares (PFALLER; DIEKEMA, 2007; PFALLER et al., 2014). A apresentação clínica da candidemia é frequentemente associada com sinais e sintomas da síndrome séptica (febre, hipotensão, leucocitose), sem comprometimento de órgãos internos. No entanto, pode ocorrer disseminação a múltiplos órgãos resultando na formação de abscessos renais e hepato-esplênicos, endocardite, meningite, entre outras complicações (ANTINORI et al., 2016). A

infecção disseminada pode ocorrer devido à presença de cateter venoso central, nutrição parenteral, ao uso de antibióticos de largo espectro, corticosteróides, agentes quimioterápicos, câncer em estágio avançado, doenças hematológicas malignas, transplante de medula óssea ou órgãos sólidos, neutropenia, cirurgia abdominal, queimaduras extensas, hemodiálise, ventilação mecânica, permanência em unidades de terapias intensivas e colonização prévia por *Candida* spp. (ARENDRUP, 2013). As infecções fúngicas invasivas por *Candida* spp. são graves e acarretam no aumento do tempo de internação hospitalar e conseqüentemente elevam os custos de hospitalização, além de estarem associadas às elevadas taxas de morbidade e mortalidade encontradas nos pacientes acometidos (STROLLO et al., 2017).

1.3 Epidemiologia das Infecções Fúngicas Invasivas por *Candida* spp.

Candidemia é um problema crescente nos hospitais de todo o mundo. A incidência das infecções fúngicas invasivas causadas por *Candida* spp. em pacientes adultos e pediátricos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, principalmente devido à crescente complexidade dos pacientes que, em geral, são imunocomprometidos e/ou estão hospitalizados por períodos prolongados em unidades de terapia intensiva (PFALLER et al., 2012; SARDI et al., 2013; STROLLO et al., 2017). Embora *C. albicans* seja a espécie mais comumente isolada, outras espécies de *Candida* não-*albicans* estão sendo identificadas como agentes etiológicos dessas infecções (PFALLER et al., 2010; CÓRDOBA et al., 2011; DIEKEMA et al., 2012; COLOMBO et al., 2013; MORETTI et al., 2013; PFALLER et al., 2014; TAN et al., 2015; DOI et al., 2016), ocorrendo uma variação na frequência de isolamento de *Candida* spp. dependendo da população envolvida, da região geográfica, da exposição prévia a antifúngicos e da idade do paciente (PFALLER et al., 2011; LOCKHART et al., 2012; COLOMBO et al., 2013; NUCCI et al., 2013; MONTAGNA et al., 2014).

Na América do Norte e Europa, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* constituem as espécies de *Candida* não-*albicans* mais comumente isoladas. A emergência de *C. glabrata* na América do Norte tem sido muito bem documentada e entre as espécies de *Candida* não-*albicans* ocupa o primeiro lugar, com frequência de isolamento de 46,4% dos casos de candidíase invasiva (PFALLER et al., 2014). No continente

Europeu, há diferenças na epidemiologia da candidemia por espécies de *Candida* não-*albicans*, com prevalência de *C. glabrata* nos países do norte (BASSETTI et al., 2017) e *C. parapsilosis* nos países do sul da Europa (MONTAGNA et al., 2014).

No México, um estudo realizado em 14 centros médicos em 10 estados mexicanos, *C. albicans* e as espécies do complexo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis Stricto Sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) foram as espécies mais comumente isoladas de infecções hematogênicas de pacientes pediátricos, seguida de *C. tropicalis*. A maioria dos isolados foi suscetível aos antifúngicos testados, porém isolados de *C. glabrata* apresentaram resistência à anfotericina B, fluconazol e itraconazol (GONZÁLEZ et al., 2013).

Em Soweto na África do Sul, um estudo retrospectivo sobre candidemia em adultos foi realizado entre 1999 e 2007, sendo *C. albicans* a espécie mais isolada, seguida de *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. As principais condições de predisposição foram cirurgia abdominal (43%), infecção por HIV (19%), trauma (16%), *diabetes mellitus* (12%) e câncer (8%). A taxa de mortalidade foi de 60% (KREUSCH; KARSTAEDT, 2013).

Em relação à Ásia e ao Pacífico, *C. albicans* foi a espécie predominante causando candidemia ou candidíase invasiva na Austrália, Japão, Korea, Hong Kong, Malásia, Singapura e Tailândia, enquanto que *C. tropicalis* foi a espécie mais predominante entre as *Candida* spp. no Paquistão e na Índia (WANG; XU; HSUEH, 2016). Na China, *C. albicans* foi a espécie mais comumente isolada de pacientes com câncer e candidemia, seguida de espécies do complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, espécies do complexo *C. glabrata* (*C. glabrata*, *C. nivariensis* e *C. bracarensis*), *C. lusitaniae* e *C. famata* (LI et al., 2017).

Na América do Sul, o padrão de distribuição de *Candida* spp. se diferencia dos citados em alguns países da América do Norte e Europa, embora poucos estudos prospectivos tenham sido desenvolvidos nessa região. Na Argentina, em um estudo nacional tendo como foco a identificação de leveduras isoladas de pacientes com fungemia também revelou o mesmo padrão de distribuição de *Candida* spp. Entretanto, outras espécies foram identificadas como *C. viswanathii*, *C. haemulonii*, *C. inconspicua* e *C. fermentati*. A presença de espécies incomuns reforça a necessidade de realização de uma vigilância contínua, a fim de monitorar possíveis mudanças, não apenas na distribuição epidemiológica das espécies, mas também em relação à resistência aos fármacos antifúngicos (CÓRDOBA et al., 2011). Em um outro estudo

retrospectivo realizado entre 2010 e 2012 em cinco hospitais públicos na cidade de Córdoba, *C. albicans* foi a espécie mais predominante, seguida de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (RIERA et al., 2014).

No Chile, a prevalência é de *C. albicans*, mas um aumento progressivo de infecções por *Candida* não-*albicans* foi observado no período de 2000 a 2013, sendo *C. glabrata* a espécie mais frequente, seguida de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (SIRI et al., 2017).

Muito pouco se conhece sobre a epidemiologia da candidemia no Peru. Entretanto, em um estudo prospectivo foi realizado no período de 2013 a 2015 em três hospitais de Lima, *C. albicans* se destacou como a espécie predominante, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Todos os isolados foram suscetíveis a anfotericina B e a anidulafungina, porém houve resistência ao fluconazol em alguns isolados (RODRIGUEZ et al., 2017).

Em um estudo retrospectivo realizado em um hospital público brasileiro localizado na região sudeste entre 1994 e 2004, *C. albicans* foi a espécie mais isolada de infecções de corrente sanguínea em pacientes idosos e com comorbidades, seguida de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. A taxa de mortalidade foi de 55,4% (WILLE et al., 2013). Vale ressaltar que em um hospital universitário de referência também localizado na região sudeste do Brasil, a incidência de *C. glabrata* aumentou significativamente entre 2006 e 2010, variando de 4,8 a 23,5% (MORETTI et al., 2013). Por outro lado, em um estudo multicentrico envolvendo 16 hospitais distribuídos nas cinco regiões do Brasil entre 2007 e 2010, *C. albicans* foi a espécie mais isolada de infecções sanguíneas nosocomiais, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* e as malignidades foram a condição subjacente mais comum (32%), sendo a taxa de mortalidade bruta durante a admissão hospitalar de 72,2% (DOI et al., 2016).

Em relação à América Latina, o Brasil apresentou a maior proporção de episódios associados à candidemia por *C. glabrata* (10%), sendo mais frequente em pacientes idosos (NUCCI et al., 2013).

1.4 *Candida glabrata*

Historicamente, *C. glabrata* foi inicialmente classificada no gênero *Torulopsis*. Este gênero foi descrito em 1894, enquanto que o gênero *Candida* foi nomeado em 1913. *Candida glabrata* foi originalmente colocada no gênero *Torulopsis* devido à falta de produção de pseudohifa. Entretanto, em 1978 foi estabelecido que a capacidade de produzir pseudohifa não fosse um fator relevante na distinção dos membros do gênero *Candida* (YARROW; MEYER, 1978). Contrariamente, em 1984, foi feito um trabalho mostrando que o gênero *Candida* era taxonomicamente diferente de *Torulopsis* (MCGINNIS et al., 1984). Somente em 1997, constatou-se que algumas espécies de *Torulopsis* formavam hifas verdadeiras e pseudohifas, concluindo que *Torulopsis* spp. deveriam ser aceitas como pertencentes ao gênero *Candida* (ODDS et al., 1997).

Candida glabrata caracteriza-se morfológicamente por células leveduriformes consideravelmente pequenas (medindo de 1 a 4 µm, em relação a *C. albicans* cujas leveduras medem de 4 a 6 µm), ovais ou com gemulação terminal única. Não há formação de pseudohifa ou tubo germinativo a 37°C. Em ágar Sabouraud dextrose, *C. glabrata* apresenta colônias de cor branca a creme, de textura cremosa, brilhante e lisa (LARONE, 2002). Outra característica marcante dessa espécie é que ela sempre fermenta e assimila glicose e trealose em contraste com *C. albicans* que fermenta e/ou assimila um número maior de açúcares, com exceção da sucralose. Cabe ainda ressaltar que *C. glabrata* apresenta uma característica genética peculiar, um genoma haplóide, diferente do genoma diplóide de *C. albicans* e de outras espécies de *Candida* não-*albicans* (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999).

Por muitos anos, *C. glabrata* foi considerada uma espécie saprófita relativamente não patogênica presente na flora normal de indivíduos saudáveis, raramente causando infecções em humanos (HALEY, 1961; FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999). Entretanto, em consequência do uso de fármacos imunossupressores e do advento da aids, a frequência de infecções em seres humanos por *C. glabrata* vem aumentando significativamente nos últimos anos em vários países, sendo considerada um patógeno oportunista emergente, sobretudo em ambientes hospitalares (HAJJEH et al., 2004; LI; REDDING; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2007; PFALLER et al., 2011; DIEKEMA et al., 2012; COLOMBO et al., 2013).

Candida glabrata tem sido responsável tanto por infecções superficiais quanto por infecções invasivas graves e candidemia em pacientes hospitalizados. As principais condições e os fatores de risco associados às infecções invasivas por esta espécie foram, principalmente, pacientes idosos internados em unidades de terapia intensiva, imunossuprimidos, portadores de cateter venoso central, pacientes infectados pelo HIV, diabéticos, pacientes com câncer e que fizeram uso profilático de fluconazol (MALANI et al., 2011; LOCKHART et al., 2012; GEORGIADOU et al., 2013; KREUSCH; KARSTAEDT, 2013).

1.5 O Complexo *Candida glabrata*

Duas novas espécies filogeneticamente relacionadas a *C. glabrata* têm sido descritas na literatura como patógenos emergentes. Essas espécies foram identificadas molecularmente e nomeadas como *Candida nivariensis* e *Candida bracarensis*, sendo fenotipicamente indistinguíveis de *C. glabrata* (ALCOBA-FLOREZ et al., 2005b; CORREIA et al., 2006) (**Figura 1**).

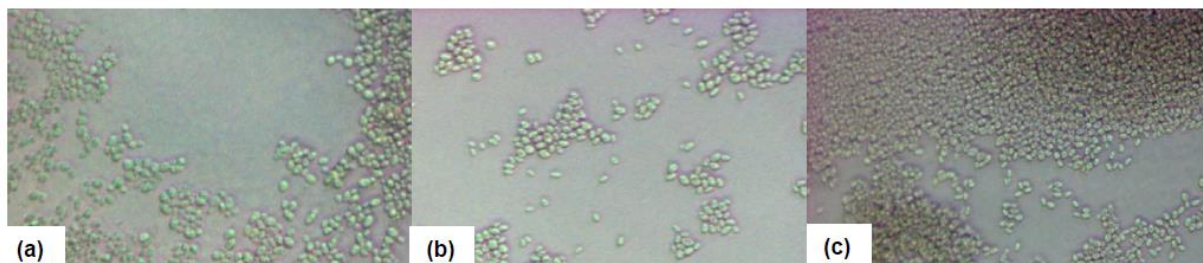


Figura 1. Fotos ilustrativas da microscopia óptica (aumento de 400x, Microscópio e software Zeiss) do Complexo *Candida glabrata*, a partir do microcultivo em ágar Corn Meal-Tween 80 após 48 horas a 30°C. **(a)** *Candida glabrata* ATCC 2001; **(b)** *C. nivariensis* WM 09.150 e **(c)** *C. bracarensis* WM 14.01. Fonte: Maria Helena G. Figueiredo-Carvalho/ Leonardo Silva Barbedo (INI/ Fiocruz, 2014).

Candida nivariensis foi descrita pela primeira vez em 2005 quando foi realizado um estudo envolvendo diferentes amostras clínicas (lavado broncoalveolar, hemocultura e urina) coletadas de três pacientes em um hospital da Espanha (ALCOBA-FLOREZ et al., 2005a). Desde então, outros casos foram relatados na Europa (BORMAN et al., 2008; GORTON et al., 2013; LÓPEZ-SORIA et al., 2013; PARMELAND et al., 2013; SWOBODA-KOPEĆ et al., 2014; AZNAR-MARIN et al.,

2016), Ásia (FUJITA et al., 2007; WAHYUNINGSIH et al., 2008; CHOWDHARY et al., 2010; SHARMA et al., 2013; LI et al., 2014; TAY et al., 2014; FENG et al., 2015; HOU et al., 2017b), Austrália (LOCKHART et al., 2009), no Brasil (presente estudo – **APÊNDICE A**) (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2016) e Argentina (MORALES-LÓPEZ et al., 2016).

Candida bracarensis foi caracterizada como uma nova espécie em 2006, depois de um estudo realizado com amostras de exsudato vaginal oriundas de pacientes portuguesas e hemoculturas coletadas de pacientes hospitalizados no Reino Unido (CORREIA et al., 2006). Em um hospital dos Estados Unidos da América, Bishop e colaboradores (2008) identificaram três cepas de *C. bracarensis* em uma coleção de 137 isolados de *C. glabrata*. Uma delas foi recuperada de um abscesso pélvico e as outras duas foram encontradas colonizando dois pacientes oncológicos adultos (BISHOP et al., 2008). Em outro trabalho realizado numa coleção de 840 isolados de *C. glabrata* oriundos da América do Norte, apenas dois isolados foram identificados como *C. bracarensis*, um de escarro e o outro de hemocultura (LOCKHART et al., 2009). Um estudo realizado na Espanha envolvendo 143 isolados de *C. glabrata* oriundos de diferentes espécimes clínicos revelou três cepas de *C. bracarensis*, uma de cateter, uma de líquido pleural e outra de sangue de um paciente com doença hematológica (CUENCA-ESTRELLA et al., 2011). Na China, trezentos e um isolados de *C. glabrata* foram analisados, e apenas um isolado foi identificado molecularmente como *C. bracarensis* (LI et al., 2014). Em Portugal, um isolado oriundo de *swab* vaginal foi identificado molecularmente como *C. bracarensis* (MOREIRA et al., 2015). Em outro estudo realizado na China, treze isolados foram identificados molecularmente e por espectrofotometria de massa por desorção/ionização de laser em matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation – Time Of Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF), sendo um isolado identificado como *C. bracarensis* (HOU et al., 2017b).

A frequência de *C. nivariensis* e *C. bracarensis* tem sido baixa entre os isolados clínicos. Porém, é necessário monitorar periodicamente essas espécies para determinar a frequência com que elas aparecem, sua distribuição geográfica e seu perfil de suscetibilidade aos antifúngicos (CUENCA-ESTRELLA et al., 2011).

Conforme descrito na literatura especializada, alguns isolados clínicos de *C. glabrata* apresentam baixa suscetibilidade aos azólicos (AMIRRAJAB et al., 2016; CASTANHEIRA et al., 2016; HOU et al., 2017a). Consequentemente, um aumento

nos índices de colonização e infecção por *C. glabrata* tem sido observado em diferentes grupos de pacientes, principalmente entre aqueles com exposição prolongada ao fluconazol (PFALLER et al., 2011). O perfil de suscetibilidade de *C. nivariensis* e *C. bracarensis* é semelhante ao de *C. glabrata*. Embora se tenha um número limitado desses isolados para tal comparação, há dados na literatura que indicam que isolados de *C. nivariensis* são suscetíveis dose-dependente ou resistentes aos azólicos (fluconazol e/ ou itraconazol) que são antifúngicos comumente usados no tratamento da candidíase (FUJITA et al., 2007; BORMAN et al., 2008; GORTON et al., 2013; LÓPEZ-SORIA et al., 2013; SHARMA et al., 2013; LI et al., 2014; FENG et al., 2015; HOU et al., 2017b). Por outro lado, *C. bracarensis* tem se mostrado suscetível ou suscetível dose-dependente a esses azólicos (FUJITA et al., 2007; BORMAN et al., 2008; LI et al., 2014; HOU et al., 2017b). Assim, um monitoramento periódico do perfil de suscetibilidade aos antifúngicos das espécies do complexo *C. glabrata* é importante para auxiliar na conduta clínica.

1.6 Fatores de Virulência de *Candida* spp.

A patogenicidade de espécies do gênero *Candida* é facilitada pela expressão de vários fatores de virulência que tem um papel crucial na colonização, adesão, invasão, disseminação e evasão do fungo dos mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro (SARDI et al., 2013). Dentre esses fatores de virulência destacam-se a capacidade de aderência às células do hospedeiro e/ ou aos dispositivos médicos, formação de biofilme e produção de exoenzimas hidrolíticas (TUMBARELLO et al., 2007; PAKSHIR et al., 2013; SARDI et al., 2013; SILVA; NERY; DIAS, 2014).

A capacidade de aderir firmemente em superfícies bióticas (células e matriz extracelular do hospedeiro) e abióticas (dispositivos médicos) é uma importante característica de *Candida* spp., sendo a adesão uma etapa crucial para o início e o estabelecimento de um processo infeccioso (CANNON; CHAFFIN, 1999).

A aderência permanente entre o patógeno e o tecido do hospedeiro requer o estabelecimento de ligações específicas entre macromoléculas denominadas adesinas (estrutura da superfície do microrganismo) e receptores específicos nas

células eucarióticas (laminina, fibronectina e fibrina) (VERSTREPEN; KLIS, 2006; SILVA-DIAS et al., 2015).

A maioria das adesinas fúngicas conhecidas são proteínas de paredes celulares ligadas ao β -1-6-glucano por remanescentes de glicosilfosfatidilinositol (GPI). A ação dessas proteínas em *C. albicans* é controlada, principalmente, pela família de genes *ALS* [*Agglutinin-like sequence (ALS)* – Sequência ligada a aglutinina] que codificam oito proteínas adesinas (ALS1-7 e ALS9), sendo a ALS3 a proteína que mais se destaca por estar associada à fase filamentosa da levedura, e também por participar do mecanismo de endocitose e de aquisição de ferro extracelular pela levedura (LIU; FILLER, 2011). Em *C. glabrata*, o principal grupo de adesinas é codificado pela família de genes *EPA* [*Epithelial adhesin (EPA)* - Adesina epitelial] (DE GROOT et al., 2008). Essas proteínas estão ausentes em *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo que *C. glabrata* desenvolveu um mecanismo de adesão único para a interação com as células hospedeiras (DESAI; MAVRIANOS; CHAUHAN, 2011). A deleção do gene *EPA1* reduz a adesão às células epiteliais, evidenciando o seu papel na aderência a substratos bióticos (CORMACK; GHORI; FALKOW, 1999; HALLIWELL et al., 2012). Enquanto o gene *EPA6* está relacionado a uma forte interação hidrofóbica com substratos abióticos, e é a principal adesina envolvida na formação de biofilme (EL-KIRAT-CHATEL et al., 2015).

Mecanismos não específicos, como a hidrofobicidade de superfície celular e as interações eletrostáticas, também influenciam nas interações de adesão do fungo a diferentes substratos (MENDES-GIANNINI et al., 2005). Um estudo sobre adesão, formação de biofilme e hidrofobicidade celular em *Candida* spp. constatou uma alta hidrofobicidade celular em *C. tropicalis*, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. albicans*, e que a hidrofobicidade celular foi um bom preditor para a formação de biofilme (SILVA-DIAS et al., 2015).

A formação de biofilme constitui um importante fator de virulência para algumas *Candida* spp., pois confere um aumento da resistência à terapia antifúngica por limitar a penetração dos agentes antifúngicos através da matriz extracelular, além de uma proteção às células fúngicas da resposta imune do hospedeiro e do estresse ambiental (SANTOS et al., 2015; DE MELLO et al., 2017).

O biofilme é definido como uma comunidade microbiana organizada envolta em uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas que as próprias células produzem composta basicamente de mono e polissacarídios, (glico) proteínas, (glico)

lipídios, minerais e DNA extracelular, podendo estar aderido tanto à superfície biótica (tecidos e células hospedeiras) quanto à superfície abiótica (dispositivos médicos) (FANNING; MITCHELL, 2012; NOBILE; JOHNSON, 2015; DE MELLO et al., 2017).

A formação do biofilme é um processo complexo ocorrendo como uma sequência de eventos moleculares e fisiológicos envolvendo mudanças físicas, químicas e biológicas que pode ser descrita em cinco etapas como representado na **Figura 2**.

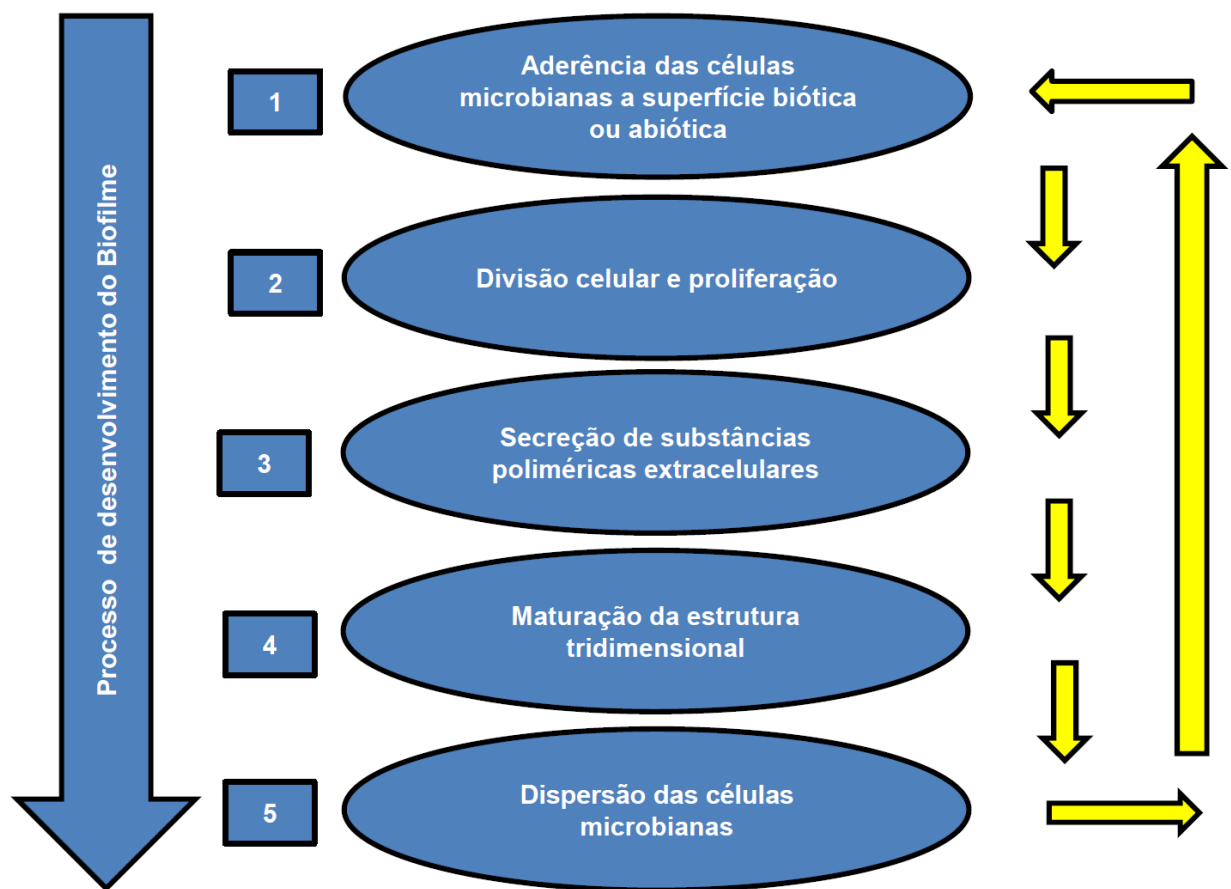


Figura 2. Esquema representativo da formação de biofilme fúngico. (1) adesão das células à superfície biótica ou abiótica, (2) divisão celular e proliferação, (3) secreção de substância polimérica extracelular que aprisiona as células e facilita a adesão célula-célula e célula-superfície, tendo como consequência a formação de microcolônias, (4) maturação da estrutura tridimensional, provendo um suporte estrutural para a arquitetura do biofilme e (5) dispersão das células em torno do substrato (setas amarelas). Nesta etapa, as células podem se separar da estrutura do biofilme e retornar para a fase planctônica de crescimento, permitindo a colonização de novas superfícies em outros locais, completando assim o ciclo de vida do biofilme. Adaptado de: De Mello e colaboradores (2017).

Durante a formação de biofilme, ocorre um mecanismo de comunicação entre microrganismos, dependente da densidade celular, conhecido como *quorum sensing* que é caracterizado pela liberação de moléculas de sinalização que afetam o metabolismo microbiano e a expressão gênica de forma sincronizada (HOGAN, 2006; ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012). Algumas moléculas desse mecanismo de comunicação são importantes na formação de biofilme de *Candida* spp., como o tirosol e farnesol, que aceleram e bloqueiam, respectivamente, a transição morfológica de leveduras para hifas (ALEM et al., 2006). Além disso, essas moléculas também são capazes de exercer *in vitro* uma interação sinérgica ou aditiva com antifúngicos de diferentes classes contra os biofilmes de *Candida* spp. (CORDEIRO et al., 2015; KATRAGKOU et al., 2015; KOVÁCS et al., 2017).

Alguns fatores influenciam a formação e a estrutura do biofilme formado por *Candida* spp., tais como o substrato em que é formado (composição química, estrutura de superfície, hidrofobicidade e a rugosidade do material), as condições de crescimento (temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes), transição de leveduras para hifas e a espécie envolvida (SILVA-DIAS et al., 2015; DE MELLO et al., 2017).

Candida albicans, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* são algumas espécies capazes de formar biofilme (ABI-CHACRA et al., 2013; D'ENFERT; JANBON, 2016; KAWAI; YAMAGISHI; MIKAMO, 2017; PIERCE et al., 2017). Sabe-se que a formação, a estrutura e a composição da matriz extracelular do biofilme são altamente dependentes da espécie envolvida, e que dentro da mesma espécie também pode variar de acordo com a cepa (SILVA et al., 2009, 2012). Um estudo conduzido por Silva e colaboradores (2009) revelou que a matriz extracelular de *C. glabrata* apresentou quantidades muito elevadas de proteínas e carboidratos em comparação com *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, podendo atingir níveis cinco vezes maiores de proteínas (SILVA et al., 2009).

Outra característica interessante é que *C. glabrata* não faz a transição morfológica de leveduras para hifas, um fenômeno crucial observado durante o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*, uma vez que essa morfogênese é necessária para criar uma espessa estrutura tridimensional (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006). Apesar disso, *C. glabrata* é capaz de formar biofilme com uma arquitetura típica caracterizada por uma espessa rede de células leveduriformes incorporadas em uma matriz extracelular e ausência total de hifas e pseudohifas (SENEVIRATNE et al., 2009; RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014).

Os biofilmes assumem grande importância no contexto clínico porque estão relacionados à persistência do microrganismo no processo infeccioso. De fato, a taxa de mortalidade, o tempo de internação e o custo com a terapia antifúngica tem sido maior em pacientes infectados por isolados de *Candida* spp. formadores de biofilme do que aqueles infectados por isolados não formadores de biofilme (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012; TUMBARELLO et al., 2012).

Dentre os atributos de virulência das espécies do gênero *Candida*, destacam-se também a capacidade de produzir e secretar enzimas hidrolíticas, como proteases, fosfolipases e lipases (SILVA et al., 2012; STANISZEWSKA et al., 2012).

As peptidases, proteases ou peptideo-hidrolases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas, gerando proteínas íntegras e/ou funcionais, cadeias peptídicas menores ou aminoácidos livres, como consequência da hidrólise total do substrato proteico (SANTOS, 2011). Dentro desse grupo complexo de enzimas, podemos destacar as aspártico proteases secretadas (Saps) que desempenham um papel importante na virulência de espécies patogênicas do gênero *Candida* como, por exemplo, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. As Saps são responsáveis pela adesão, pelo dano tecidual e evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro (STANISZEWSKA; MAŁGORZATA; ZBIGNIEW, 2016).

Ainda não foi observada a produção de aspártico proteases pertencentes à superfamília Sap em *C. glabrata*, pois esta espécie é mais filogeneticamente relacionada com *Saccharomyces cerevisiae* do que com outras espécies patogênicas de *Candida*. *Saccharomyces cerevisiae* possui uma família de cinco aspártico proteases ligadas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) denominada yapsina (YPS1-3, YPS6 e YPS7). As yapsinas estão envolvidas na manutenção da integridade da parede celular e na interação célula-célula (KRYSAN et al., 2005). *Candida glabrata* apresenta uma família de 11 aspártico proteases ligadas ao GPI. Análises genéticas evidenciaram que genes *YPS* de *C. glabrata* são necessários para sua sobrevivência durante a fase estacionária ou quando submetidas a estresse na parede celular, para a aderência às células de mamíferos, para a sobrevivência no interior de macrófagos e para a virulência em modelo murino de candidíase disseminada (KAUR; MA; CORMACK, 2007; BAIRWA et al., 2014).

As fosfolipases têm como função a degradação dos fosfolípidios que são os principais componentes de todas as membranas celulares e, juntamente com as

proteases, facilitam a invasão dos tecidos do hospedeiro, durante o processo de infecção (RÜCHEL et al., 1992; GHANNOUM, 2000; KANTARCIOGLU; YÜCEL, 2002). A ausência ou a baixa expressão dessas enzimas pode indicar uma espécie de *Candida* menos virulenta, quando comparada com uma espécie de *Candida* com alta expressão dessas enzimas (BORST; FLUIT, 2003; DAGDEVIREN; CERIKCIOGLU; KARAVUS, 2005).

As lipases extracelulares têm sido consideradas como potentes fatores de virulência de *C. albicans*. Suas possíveis funções incluem a digestão de lipídios para obtenção de nutrientes, adesão às células e tecidos do hospedeiro, interações sinérgicas com outras enzimas, hidrólise inespecífica, ativação de reações inflamatórias por afetar células do sistema imune e autodefesa (STEHR et al., 2004; SCHALLER et al., 2005; PARK; DO; JUNG, 2013). As lipases podem ser diferenciadas das esterases por catalisarem a hidrólise de ligações éster com triacilgliceróis de cadeias longa (mais de 10 carbonos), enquanto as esterases catalisam a hidrólise de triacilgliceróis constituídos por ácidos graxos de cadeia curta. A especificidade dessas enzimas ao substrato está diretamente correlacionada a hidrofobicidade. Enquanto as lipases preferem substratos altamente hidrofóbicos que são insolúveis em água e tendem a formar agregados, a atividade enzimática das esterases está restrita à hidrólise de ligações éster em substratos solúveis em água (CHAHINIAN; SARDA, 2009). *Candida albicans* possui pelo menos 10 genes (*LIP1-LIP10*) que codificam lipase, sendo todos expressos durante a transição de levedura a hifa (SCHALLER et al., 2005). Enquanto *C. parapsilosis* possui quatro genes que codificam a secreção de lipase, sendo dois deles (*CpLIP1* e *CpLIP2*) envolvidos na patogênese das infecções relacionadas com esta espécie (GÁCSER et al., 2007; NAGY et al., 2011).

As fitases (mio-inositol hexafosfato fosfohidrolases) são enzimas pertencentes ao grupo das fosfatases que hidrolisam ácido fítico a fosfatos de mio-inositol e fosfatos inorgânicos. O ácido fítico é capaz de formar complexos insolúveis com importantes minerais como cálcio, zinco e magnésio, e também com proteínas, sendo considerado um constituinte antinutricional, pois reduz a biodisponibilidade desses nutrientes (MAGA, 1982). As fitases podem ser produzidas por vegetais, tecidos animais e microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos). A atividade de fitase já foi observada em *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis* (TSANG, 2011), em espécies do complexo *C. parapsilosis* (ABI-CHACRA et al., 2013; ZICCARDI et al., 2015) e do complexo *C. haemulonii* (RAMOS; BRANQUINHA; SANTOS, 2017). A

produção de fitase pode contribuir para a sobrevivência e proliferação do fungo dentro do hospedeiro humano, onde os nutrientes são escassos (TSANG, 2011).

A produção de hemolisinas tem um importante papel na virulência. Essas proteínas são essenciais para a sobrevivência de microrganismos e estão relacionadas à aquisição de ferro. Este elemento inorgânico é indispensável para o desenvolvimento de microrganismos, incluindo leveduras, e a capacidade de obtenção deste elemento é primordial para o estabelecimento de um processo infeccioso (MANNING; MOSSER; BUCKLEY, 1994; NEVITT; THIELE, 2011).

Em geral, a aquisição de ferro por patógenos fúngicos inclui três mecanismos como (i) captação de ferro de alta afinidade pela via redutiva, onde ocorre uma reação de redução do íon férrico (Fe^{3+}) ao íon ferroso (Fe^{2+}) seguida de re-oxidação e transporte do íon Fe^{3+} para o interior da célula (KOSMAN, 2003); (ii) síntese e captação de sideróforos, um mecanismo não redutivo de alta afinidade, que fornece ferro para célula através da solubilização de Fe^{3+} extracelular (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008) e (iii) aquisição de ferro ligado ao grupo heme que se encontra em sua maioria ligado à hemoglobina, dentro dos eritrócitos.

Embora as espécies de *Candida* e *Saccharomyces* não produzam seus próprios sideróforos, geralmente são capazes de usar sideróforos produzidos por outros microrganismos (xenosideróforos) (NEVITT; THIELE, 2011).

Em microrganismos patogênicos, a função da catalase está relacionada à proteção da célula contra o estresse oxidativo que é imposto por fagócitos e ocasionado por espécies reativas de oxigênio (EROs) dentre as quais destaca-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NAKAMURA et al., 2012). A catalase desempenha uma função antioxidante, sendo capaz de converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é letal para o fungo, em água (H_2O) e oxigênio (O_2), permitindo assim o escape do fungo da resposta imune do hospedeiro (NAKAGAWA et al., 1999; NAKAMURA et al., 2012; ROMÁN et al., 2016). As EROs são compostos naturalmente formados em todos os organismos aeróbios eucariontes como subprodutos da redução de oxigênio molecular e incluem, além do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), radical hidroperoxila ($\text{HOO}\cdot$) e radical peroxila ($\text{ROO}\cdot$) (VALKO et al., 2007). A elevada reatividade dessas espécies químicas pode causar danos oxidativos nas membranas celulares e macromoléculas como DNA, proteínas, lipídios e carboidratos que em situações extremas podem conduzir à morte celular (BREEN; MURPHY, 1995). Em condições fisiológicas normais, os

níveis intracelulares de EROs são mantidos em equilíbrio pela ação de antioxidantes como, por exemplo, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, além dos sistemas glutathione e tioredoxina (VALKO et al., 2007; HERRERO et al., 2008). Dessa forma, o estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de EROs e a capacidade de defesa antioxidante das células, alterando a homeostase celular (SOSA et al., 2013; SILVA; JASIULIONIS, 2014).

Por fim, a função da catalase também está associada ao processo de formação de hifas em *C. albicans* (NAKAGAWA, 2008) e ao mecanismo de resistência a anfotericina B (NAKAMURA et al., 2012; ROMÁN et al., 2016; GUIRAO-ABAD et al., 2017).

1.7 Diagnóstico Laboratorial

Métodos de identificação fenotípica de *Candida* spp. isoladas em cultura são baseados nas suas características macro e micromorfológicas, bem como no seu perfil de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e de fermentação de açúcares, e por meio de testes fisiológicos (ELLEPOLA; MORRISON, 2005).

Macromorfolologicamente, essas leveduras apresentam colônias brancas a cremes, aspecto cremoso ou membranoso, superfície lisa ou enrugada, brilhante ou opaca. Microscopicamente, apresentam hifas verdadeiras e/ou pseudohifas, sendo que o arranjo e a disposição dos blastoconídios auxiliam na identificação das espécies (DIGNANI; SOLOMKIM; ANAISSE, 2003).

Meios cromogênicos como CHROMagar®*Candida* (BD Difco), *Candida*® ID2 (bioMérieux), Hicrome®*Candida* (HiMedia) entre outros são eficazes na detecção e identificação de algumas leveduras do gênero *Candida* como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (ERASO et al., 2006; SIVAKUMAR et al., 2009). Sistemas comerciais de fácil execução e interpretação, desenvolvidos através da capacidade assimilativa em substratos bioquímicos e enzimáticos, como API®20 C AUX (bioMérieux), ID 32 C (bioMérieux), Vitek® 2 System (bioMérieux), entre outros, também podem ser utilizados nos laboratórios de microbiologia clínica para a identificação rápida de *Candida* spp. (DURÁN-VALLE et al., 2014; AMEEN et al., 2017). Todavia, métodos convencionais tais como uso de meios cromogênicos ou testes bioquímicos não

diferenciam fenotipicamente *C. glabrata*, *C. nivariensis* e *C. bracarensis* (ALCOBA-FLOREZ et al., 2005b; HOU et al., 2017b).

Métodos moleculares podem ser utilizados como instrumentos de diagnóstico laboratorial precoce de candidíases invasivas, com resultados promissores quanto aos valores de sensibilidade e especificidade, em relação às culturas, além de possuir acurada capacidade de identificação de *Candida* spp. em amostras clínicas (ATKINS; CLARK, 2004; MOREIRA-OLIVEIRA et al., 2005).

Genes ribossomais fúngicos são alvos comuns de DNA utilizados em procedimentos para a identificação desses microrganismos a nível de espécie através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A grande variabilidade das sequências ITS1 e ITS2 (Espaçadores transcritos internos - ITS) associadas com as regiões conservadas 18S, 5,8S e 28S do DNA ribossomal (rDNA) têm sido utilizadas na PCR, em diferentes formatos, para a discriminação e identificação de leveduras (CHEN et al., 2000, 2001), assim como a região D1/D2 da subunidade maior (28S) do rDNA (LINTON et al., 2007).

Em 1990, Buchman e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que a detecção de *C. albicans* em amostras clínicas era possível através da técnica da PCR utilizando uma sequência parcial do gene que codifica a enzima lanosterol- α -demetilase (*L1A1*) (BUCHMAN et al., 1990). A partir daí, diferentes PCRs têm sido aplicadas para o diagnóstico e identificação de vários fungos patogênicos invasivos, inclusive *Candida* spp., como nested PCR multiplex (TAIRA et al., 2014), PCR multiplex (TEIXEIRA et al., 2014), PCR panfungal (BEZDICEK et al., 2016) e PCR em tempo real (ZHANG et al., 2016), entre outros.

Métodos moleculares também são extremantes importantes para distinguir espécies filogeneticamente relacionadas, como *C. nivariensis* e *C. bracarensis* em relação a *C. glabrata*. A distinção entre essas três espécies já foi possível por métodos moleculares como o sequenciamento da região ITS ou da região D1/D2 da subunidade maior (28S) do rDNA (ALCOBA-FLOREZ et al., 2005a, 2005b; CORREIA et al., 2006; GORTON et al., 2013; AZNAR-MARIN et al., 2016), tipagem do DNA usando o *primer* T3B (CORREIA et al., 2006) e os *primers* M13 ou GTG5 (WAHYUNINGSIH et al., 2008) e hibridização *in situ* usando um peptídeo de ácido nucleico fluorescente espécie-específico (PNA FISH) (BISHOP et al., 2008). Além disso, também vem sendo utilizadas a PCR multiplex (ROMEO et al., 2009; DUDIUK et al., 2017), a PCR singleplex (ENACHE-ANGOULVANT et al., 2011), associação da

técnica de PCR com a digestão enzimática de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) tendo como alvo sequências do espaçador intergênico (IGS) do rDNA (CORNET et al., 2011) e associação da técnica de PCR com a cromatografia líquida de alta performance desnaturante (PCR-dHPLC) (TELLERIA et al., 2012). A identificação molecular empregando a amplificação por PCR e o sequenciamento das regiões genômicas que são altamente conservadas, representa uma alternativa rápida e sensível para a identificação convencional de leveduras e também é útil para estabelecer relações filogenéticas (CHEN et al., 2000, 2001; LINTON et al., 2007).

A identificação de fungos pela espectrometria de massa através da técnica de Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) vem sendo introduzida nos procedimentos laboratoriais de rotina para a identificação tanto de fungos filamentosos quanto leveduriformes (PUTIGNANI et al., 2011). Esta técnica tem sido usada como uma abordagem fenotípica para a identificação de fungos e está baseada principalmente na análise de proteínas ribossomais, além de proteínas constituintes da parede celular fúngica (SANTOS et al., 2011). A técnica de MALDI-TOF MS é simples, econômica, rápida (entre 10 segundos e 2 min/ amostra) e de elevada eficácia (PANDA et al., 2015; KEÇELI; DÜNDAR; TAMER, 2016). É importante ressaltar que essa técnica pode ser usada como um método de diagnóstico de rotina nos laboratórios microbiológicos clínicos no processo de identificação e diferenciação de isolados fúngicos, englobando inclusive as espécies do complexo *C. glabrata* (PINTO et al., 2011; GORTON et al., 2013; GHOSH et al., 2015; HOU et al., 2017b).

Leveduras de importância clínica mostram diferenças espécies-específicas em relação à susceptibilidade aos fármacos antifúngicos, portanto uma identificação rápida e acurada do patógeno é essencial (BORMAN et al., 2010; CRISEO; SCORDINO; ROMEO, 2015).

1.8 Tratamento

O tratamento da candidíase é realizado de acordo com o sítio da infecção e as características conhecidas do paciente, incluindo os fatores de risco (CALANDRA et al., 2016; PAPPAS et al., 2016). Há uma variedade de fármacos antifúngicos disponíveis para tratamento das infecções por *Candida* spp., entre eles podemos citar:

nistatina e anfotericina B (desoxicolato ou na forma lipossomal) (classe dos poliênicos), clotrimazol, cetoconazol, miconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol (classe dos azólicos), caspofungina, anidulafungina e micafungina (classe das equinocandinas) e flucitosina (MENSA; PITART; MARCO, 2008; CORNELLY et al., 2009).

Nos hospitais públicos brasileiros são considerados medicamentos essenciais para tratamento das infecções fúngicas invasivas, incluindo as candidíases apenas os fármacos anfotericina B, fluconazol e itraconazol. Os antifúngicos de uso tópico disponíveis são nitrato de miconazol e cetoconazol (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O surgimento de novos fármacos antifúngicos tem modificado o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, sendo possível utilizar um fármaco mais eficaz e com menos efeitos colaterais, levando em consideração o estado clínico do paciente, a espécie envolvida e o seu perfil de suscetibilidade às drogas (CUENCA-ESTRELLA, 2010).

1.9 Fármacos Antifúngicos – Mecanismo de Ação e Resistência

O mecanismo de ação dos antifúngicos tem como alvo estruturas celulares que são vitais na manutenção do metabolismo do fungo. Desta forma, podemos citar algumas classes e seus respectivos alvos como os poliênicos e azólicos que atuam nos constituintes de membrana celular, as equinocandinas que interferem na biossíntese de parede celular e a 5-fluorocitosina que é um análogo de pirimidina que interfere na síntese de ácidos nucleicos (**Figura 3**) (CASTELLI et al., 2014; STOCKMANN et al., 2014).

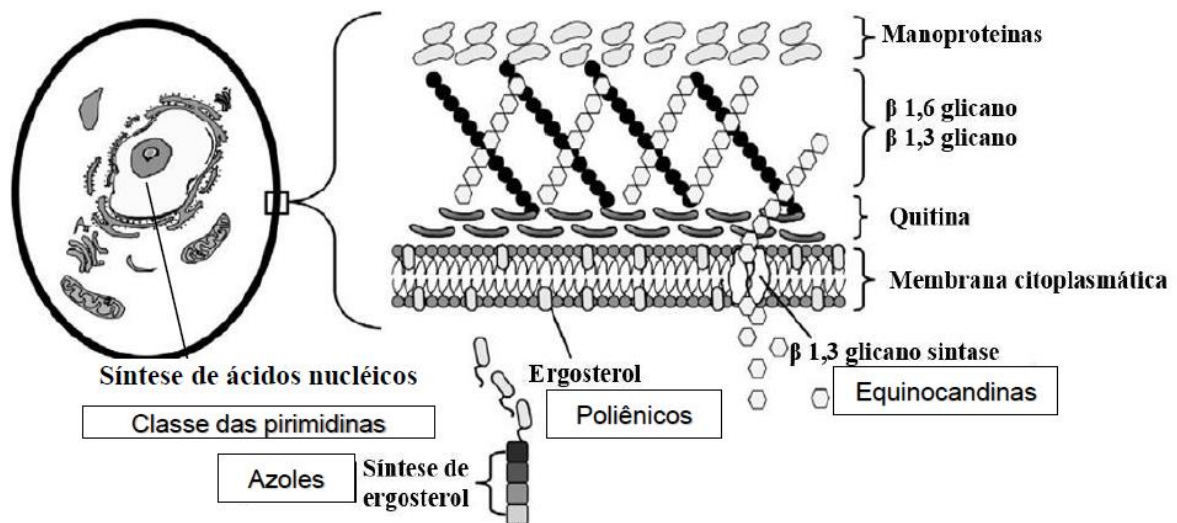


Figura 3. Esquema representativo do mecanismo de ação dos antifúngicos classificados como poliênicos, azólicos, equinocandinas e do análogo de pirimidina (5-fluorocitosina). (Adaptado de: Castelli e colaboradores (2014).

Anfotericina B pertence à classe dos poliênicos e possui atividade fungicida. Seu amplo espectro de ação inclui a maior parte das espécies fúngicas patogênicas para o homem, e até os anos 90 era a principal ou única alternativa no tratamento das micoses profundas. No entanto, a administração deste fármaco pode ser complicada devido à sua nefrotoxicidade, podendo ser necessária a redução na dose do fármaco administrado ao paciente (WALSH et al., 2002) ou mesmo o término da terapia (MOUDGAL et al., 2005). O risco potencial de toxicidade, especialmente em pacientes com função renal comprometida, levou ao desenvolvimento de formulações lipídicas da anfotericina B com eficácia similar à anfotericina tradicional, porém com nefrotoxicidade reduzida (GONZÁLEZ MARTÍNEZ et al., 2014).

O mecanismo de ação da anfotericina B se baseia na sua ligação de forma irreversível ao ergosterol presente na membrana celular fúngica, determinando a formação de canais pelos quais a célula perde íons e moléculas que levam à morte celular (CUENCA-ESTRELLA, 2010). A maior parte dos mecanismos de resistência à anfotericina B está relacionada com um decréscimo na quantidade de ergosterol da membrana ou um aumento dos fosfolípidios que reduzem a interação do fármaco com os esteróis. Essas alterações estão associadas com mutações nos genes *ERG2* ou *ERG3*, que codificam enzimas (ERG) que participam da via de síntese do ergosterol (RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELLA, 2009). E mais, o aumento da produção de

catalase tem sido sugerido como um dos mecanismos de resistência ao antifúngico poliênico anfotericina B, pois impede a formação de radicais livres responsáveis pela formação de canais pelos quais as células perdem íons e moléculas o que leva a morte celular (KERRIDGE; NICHOLAS, 1986; LINARES et al., 2013; ROMÁN et al., 2016).

Flucitosina, também conhecida como 5-fluorocitosina (5-FC), é o único fármaco antifúngico pertencente à classe das pirimidinas, sendo o seu efeito fungistático (SANGLARD, 2002). Este fármaco é um análogo fluorado da citosina que se converte em fluoracil no interior da célula. O fluoracil é convertido em 5-acido fluodeoxiuradílico que interfere na síntese de DNA e proteínas do fungo. A resistência intrínseca à fluorocitosina aparece com frequência nas leveduras e em quase todos os fungos filamentosos. Isto ocorre devido a mutações no gene que codifica a citosina desaminase, enzima responsável pela conversão do antifúngico em fluoracil (SANGLARD, 2002). A anfotericina B convencional e a fluorocitosina podem ser utilizadas no tratamento combinado em infecções do trato urinário e endocardite por *Candida* spp., apesar dessa associação de fármacos ser mais comum no tratamento da criptococose em pacientes aids (PAPPAS et al., 2016).

Fluconazol e itraconazol foram os primeiros fármacos da família dos triazólicos que começaram a ser utilizados no tratamento das candidíases invasivas e de outras infecções fúngicas. Os triazólicos, assim como os imidazólicos (cetoconazol e miconazol), pertencem ao grupo dos azólicos que são compostos heterocíclicos nitrogenados com um anel de cinco membros. Essas duas famílias de azólicos se distinguem de acordo com o número de átomos de nitrogênio presentes em sua composição química, dois no caso dos imidazólicos e três no caso dos triazólicos (CUENCA-ESTRELLA, 2010; PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016).

Os azólicos constituem um dos principais avanços terapêuticos da micologia. Fluconazol foi o primeiro antifúngico sistêmico com toxicidade reduzida e com um excelente perfil farmacocinético, com formulações oral e intravenosa, que eram muito bem toleradas pelos pacientes (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2008; RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELLA, 2009; CUENCA-ESTRELLA, 2010). O itraconazol tem um espectro de ação mais amplo que o fluconazol, sendo ativo frente às leveduras e aos fungos filamentosos. Entretanto, a maioria das leveduras resistentes ao fluconazol acaba desenvolvendo resistência cruzada ao itraconazol (SABATELLI et al., 2006).

Na primeira década do século XXI, dois novos triazólicos de uso sistêmico, voriconazol e posaconazol, começaram a ser comercializados, assim como três moléculas pertencentes à classe das candinas denominadas equinocandinas. Voriconazol foi desenvolvido a partir do fluconazol com a intenção de ampliar seu espectro de ação. É ativo frente à maior parte das leveduras e dos fungos filamentosos. Fungos da ordem *Mucorales* apresentam resistência intrínseca ao voriconazol (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2009). Posaconazol é um azólico de espectro mais amplo, com atividade frente às leveduras, e a vários fungos filamentosos, incluindo os *Mucorales* (CLARK; GRIM; LYNCH, 2015).

A atividade antifúngica dos azólicos reside na capacidade de inibir o citocromo P450 fúngico, através da demetilação da enzima 14- α -demetilase que está envolvida na síntese de ergosterol. Com o bloqueio da síntese de ergosterol, há acúmulo de produtos tóxicos, alteração de permeabilidade da membrana e inibição do desenvolvimento celular fúngico (CUENCA-ESTRELLA, 2014).

Os triazólicos como fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol mostram uma afinidade 100 vezes superior pelas enzimas fúngicas do que pelas enzimas humanas, por isso, apresentam menos toxicidade do que os imidazólicos, sendo possível administrar doses mais elevadas (CUENCA-ESTRELLA, 2010). No entanto, os azólicos têm atividade fungistática frente ao gênero *Candida* e o fenômeno da resistência, em especial ao fluconazol, emerge em algumas espécies como *C. glabrata* e *C. krusei* (WHALEY et al., 2016).

O mecanismo de resistência que se detecta com maior frequência em amostras clínicas de leveduras é a redução da concentração intracelular de azólicos. Esta redução pode ser devido a uma diminuição na captação do fármaco ou, mais frequentemente, a um aumento na expulsão do azólico e na atividade das bombas de efluxo ou transportadores. É um mecanismo de resistência secundária devido à superexpressão dos genes que os regulam. Existem dois tipos de transportadores (i) de cassete vinculado a ATP (*ATP binding cassette* - ABC) e (ii) da superfamília de transportadores facilitadores principais (*Major Facilitators Superfamily* - MFS). Os transportadores ABC se associam com a expulsão de todos os azólicos e, aparentemente, os MFS se relacionam preferencialmente com a resistência ao fluconazol (DENNING; HOPE, 2010; CUENCA-ESTRELLA, 2014).

Em *C. albicans* e outras espécies de leveduras como *C. glabrata* já foram descritos até dez genes diferentes relacionados com a produção dos transportadores

ABC, chamados *CDR1-CDR10*. A resistência aos azólicos é observada em cepas com aumento da expressão dos genes *CDR1* e *CDR2*. As bombas MFS, codificadas pelos genes *mdr*, usam gradientes de prótons como fonte de energia, no lugar de ATP, e estão associadas com a resistência secundária ao fluconazol (SANGLARD; ODDS, 2002; MORSCHHÄUSER, 2010; CUENCA-ESTRELLA, 2014).

As equinocandinas são uma família de fármacos pertencentes à classe das candinas. Seu desenvolvimento começou em 1974, mas a aprovação para uso em seres humanos não chegou antes de 2001, data em que o primeiro fármaco desta classe, a caspofungina, foi licenciada. Estão disponíveis no mercado, além da caspofungina, outras duas equinocandinas com indicações clínicas, a micafungina e a anidulafungina (DENNING; HOPE, 2010).

As equinocandinas são fármacos que agem diferentemente de outros antifúngicos já que atuam sobre a β -1,3-glucana-sintetase, enzima necessária para a formação de polímeros de β -1,3-glucana, um dos componentes da parede celular fúngica. Conseqüentemente, não afetam as células do hospedeiro, sendo a tolerância a estes fármacos maior. A inibição desta enzima reduz a síntese de glucano, causando instabilidade osmótica, lise e morte celular (CUENCA-ESTRELLA, 2010).

As equinocandinas têm efeitos fungicidas nas leveduras e fungistáticos nos fungos filamentosos, porém uma resistência secundária a estes antifúngicos vem sendo relatada (RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELLA, 2009; CUENCA-ESTRELLA, 2010, 2014).

Mutações e substituições de aminoácidos em duas regiões do gene *FKS* (*FKS1* e *FKS2*) que codificam a glucano-sintetase geram resistência as três equinocandinas e estão associadas a falhas terapêuticas. Há descrições de resistência intrínseca às equinocandinas em espécies que tenham β -1,6-glucana em sua parede, como *Cryptococcus* spp., *Fusarium* spp. e outras espécies, particularmente, pertencentes aos filos *Basidiomycota* e *Zygomycota* (ARENDRUP; PERLIN, 2014). De fato, estudos recentes sugerem um aumento no número de isolados clínicos de *C. glabrata* que demonstraram resistência não só aos azólicos, mas também às equinocandinas (MIYAZAKI; KOHNO, 2015; DELLIÈRE et al., 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Candida glabrata é um patógeno emergente nos hospitais públicos e privados brasileiros (COLOMBO et al., 2013; SAVASTANO et al., 2016). Além disso, é a primeira ou segunda espécie mais isolada de infecções fúngicas invasivas entre as *Candida não-albicans*, na América do Norte e Europa (MONTAGNA et al., 2014; PFALLER et al., 2014). Com base em análises moleculares, duas novas espécies, *C. nivariensis* e *C. bracarensis*, foram descritas como filogeneticamente relacionadas a *C. glabrata*, formando o complexo *C. glabrata* (ALCOBA-FLOREZ et al., 2005a, 2005b; CORREIA et al., 2006). Até o início desse trabalho (2014), *C. nivariensis* e *C. bracarensis* ainda não tinham sido descritas no Brasil e havia poucos dados do Rio de Janeiro sobre *C. glabrata* nas publicações.

Embora a frequência de isolamento de *C. glabrata* em infecções fúngicas esteja aumentando nos últimos anos (MORETTI et al., 2013; NUCCI et al., 2013; PFALLER et al., 2014), pouco se conhece sobre os fatores de virulência dessa espécie envolvidos na colonização, adesão, invasão, disseminação e escape das células de defesa do hospedeiro. Os estudos sobre os fatores de virulência em *C. albicans* são muito bem documentados, mas são escassos em *C. glabrata*. Conseqüentemente, para um melhor entendimento da patogenicidade nas infecções por *C. glabrata*, faz-se necessária a descrição de seus possíveis fatores de virulência e a importância desses atributos no estabelecimento do processo infeccioso.

Além disso, o uso terapêutico e profilático de fármacos antifúngicos que são administrados por períodos prolongados, sobretudo em pacientes imunocomprometidos, pode estar contribuindo para o aumento do fenômeno da resistência em *C. glabrata* (PFALLER et al., 2010; COLOMBO et al., 2013; NUCCI et al., 2013). Sendo assim, é necessária uma vigilância contínua para conhecer, monitorar e detectar diferenças no perfil de suscetibilidade aos antifúngicos dessa espécie que vem emergindo, principalmente, em ambientes hospitalares, e possivelmente das duas novas espécies do complexo *C. glabrata*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar as características fenotípicas associadas à virulência e ao perfil de suscetibilidade aos antifúngicos em isolados clínicos previamente identificados como *C. glabrata* oriundos de diferentes espécimes clínicos provenientes de pacientes com quadro de candidíase entre 1998 e 2015 em dois hospitais públicos no município do Rio de Janeiro.

3.2 Objetivos Específicos

- Confirmar a identificação dos isolados clínicos de *C. glabrata* por método morfológico e bioquímico;
- Caracterizar molecularmente os isolados clínicos de *C. glabrata*, determinando a frequência e a distribuição de espécies do complexo *glabrata* em diferentes amostras clínicas;
- Verificar a produção de aspártico protease, caseinase, fosfolipase, esterase, fitase, hemolisina e catalase associada à virulência desses isolados clínicos;
- Avaliar a formação de biofilme por esses isolados em dois diferentes meios;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de oito fármacos antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, caspofungina, micafungina e 5-fluorocitosina frente aos isolados clínicos estudados;
- Comparar a suscetibilidade aos fármacos antifúngicos nas células em suspensão e nos biofilmes;
- Correlacionar a produção de enzimas hidrolíticas tanto com o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos quanto com a formação de biofilme.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas de Referência

Candida albicans ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. glabrata* ATCC 2001 foram utilizadas como controle de qualidade no CHROMagar® *Candida*. Para a identificação molecular, a cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001, e as cepas de referência de *C. nivariensis* WM 09.150 e *C. bracarensis* WM 14.01 foram utilizadas como controles. A cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001 também foi usada como referência nos testes fenotípicos relacionados aos fatores de virulência. Para o teste de suscetibilidade aos antifúngicos, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram usadas como cepas de controle de qualidade, de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008a).

4.2 Isolados Clínicos

Foram incluídos neste estudo 92 isolados clínicos previamente identificados como *C. glabrata* oriundos de diferentes espécimes clínicos e provenientes de pacientes imunocomprometidos com quadro de candidíase entre 1998 e 2015. Os isolados foram identificados como *C. glabrata* pelo sistema API 20 C AUX (bioMérieux) e estavam armazenados no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA) e no laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), ambos localizados no município do Rio de Janeiro, Brasil.

Ao todo foram analisados 83 isolados do INCA e 09 isolados do INI. Esses isolados foram separados de acordo com o sítio de isolamento da amostra (**Quadro 1**).

Quadro 1. Noventa e dois isolados clínicos previamente identificados como *C. glabrata*, separados por diferentes sítios de isolamento, provenientes de pacientes imunocomprometidos com quadro de candidíase oriundos de dois hospitais públicos do município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2015.

Sítios Anatômicos		
Respiratório		
Espécime clínico	Origem	Nº de isolados
Escarro	INCA	04
Secreção traqueal	INCA	10
Lavado bronquico	INCA	05
Swab nasal	INCA	01
Líquido pleural	INCA	01
TOTAL		21
Gastrointestinal		
Espécime clínico	Origem	Nº de isolados
Fezes	INCA	09
Aspirado gástrico	INCA	01
Líquido peritoneal	INCA	04
Secreção abdominal	INCA	03
Líquido ascítico	INCA	02
TOTAL		19
Urogenital		
Espécime clínico	Origem	Nº de isolados
Urina	INCA	13
Secreção vaginal	INCA	02
Secreção vaginal	INI	05
Secreção abscesso renal	INI	01
TOTAL		21
Circulatório		
Espécime clínico	Origem	Nº de isolados
Sangue	INCA	22
Sangue	INI	03
TOTAL		25
Outros Sítios		
Sítio de Inserção		
Espécime clínico	Origem	Nº de isolados
Ponta cateter	INCA	04
Secreção de dreno	INCA	01
TOTAL		05
Sítio Cirúrgico		
Espécime clínico	Origem	Nº de isolados
Secreção de ferida pós-operatória	INCA	01
TOTAL		01

Fonte: Elaboração própria

4.3 Confirmação Fenotípica

4.3.1 Reisolamento e avaliação quanto à viabilidade e pureza

Os isolados de *C. glabrata* estocados em água destilada estéril foram semeados por esgotamento em estrias em placas de Petri (90 mm) contendo o meio de ágar Sabouraud dextrose (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) e as placas foram incubadas a 35°C por 72 horas para avaliar a viabilidade. A seguir, os isolados foram semeados no meio CHROMagar® *Candida* (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) e mantidas sob as mesmas condições de temperatura e tempo para avaliar a pureza. A interpretação dos resultados foi baseada no exame macroscópico das colônias e, no caso do CHROMagar® *Candida*, de acordo com as orientações do fabricante: verde, *C. albicans*; azul metálico, *C. tropicalis*; rosa, rugosa, *C. krusei*; e branca a roxo, demais espécies.

4.3.2 Identificação bioquímica pelo Vitek® 2

Após crescimento em ágar Sabouraud dextrose em tubos de ensaio mantidos à temperatura de 35°C por 24 horas, com auxílio de uma alça de semeadura de 10 µL foi preparada uma suspensão homogênea da levedura em 3 mL de salina estéril a 0,45% (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) em tubos de ensaio de poliestireno transparente (10 x 75 mm). A densidade óptica dessa suspensão foi verificada por um densitômetro (DensiCheck™, bioMérieux) e ajustada para o padrão n° 2 da escala de McFarland. O tubo da suspensão e o cartão de identificação de leveduras YST Card (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) foram colocados em estante própria e inseridos no sistema Vitek® 2 onde ocorreu a distribuição da suspensão de levedura entre os poços do cartão e em seguida as etapas de selagem, incubação a 35,5°C por um período de aproximadamente 18 horas e leitura do cartão (HATA et al., 2007). A similaridade entre os perfis bioquímicos foi analisada pelo programa DendroUPGMA disponível na internet (<http://genomes.urv.cat/UPGMA>) (GARCIA-VALLVÉ; PALAU; ROMEU, 1999).

4.4 Preservação dos Isolados Clínicos

Após confirmação fenotípica, os isolados clínicos de *C. glabrata* foram semeados em tubos de ensaio (20 × 200 mm) contendo ágar batata dextrose (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) e incubados a 35°C por 48 horas para obtenção de massa celular. Em seguida, foram adicionados 3 mL de Glicerol (Fluka Analytical, Sigma–Aldrich, St Louis, USA) a 15% e homogeneizado por pipetagem. Alíquotas de 1 mL da suspensão de leveduras foram distribuídas em criotubos de 2,0 mL e mantidas a temperatura de -80°C para posterior uso no teste de identificação molecular, de produção de enzimas hidrolíticas, formação de biofilme e no teste de suscetibilidade aos antifúngicos.

4.5 Identificação Molecular

4.5.1 Extração do DNA genômico

Antes da extração do ácido nucleico, os isolados foram descongelados e semeados em placas de Petri (90 mm) contendo o meio ágar Sabouraud dextrose. Após crescimento e partindo de uma colônia isolada, foi realizado um repique neste mesmo meio de cultura e o cultivo foi mantido a 35°C por 24 horas para obtenção de massa celular. O DNA genômico da levedura foi extraído usando o kit *Gentra® Puregene® Yeast and G+ Bacteria* (Qiagen®, Maryland, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as leveduras foram lisadas com um detergente aniônico e as proteínas removidas por precipitação salina. O DNA presente no sobrenadante foi precipitado com etanol a 70% (Merck, Darmstadt, Germany) ressuspenso em tampão TE (0,01 M Tris, 0,001M EDTA pH 8), tratado com RNase e quantificado por espectrofotometria (NanoVue Plus™ GE Healthcare). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão 1 X TBE (0,1 M de Tris-HCl pH 8,4; 0,09 M de ácido bórico; 0,001 M de EDTA) por aproximadamente 1 hora sob uma tensão de 90 V. A seguir, o gel foi submerso numa solução de brometo de etídio (Invitrogen™, Carlsbad, CA USA) a uma concentração

final de 0,5 µg/mL por 30 minutos e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta (UV) de um transiluminador (HOEFER®, MacroVue UV-20).

4.5.2 Amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA)

A reação de amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 100 ng do DNA, 1 X tampão da PCR (10 mM de Tris-HCl pH 8,4; 50 mM de KCl; 1,5 mM de MgCl₂; Invitrogen™ Brasil); 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP; Invitrogen™ Carlsbad, CA, EUA); 2,5 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen™ Brasil) e 10 pmol de cada *primer* (Invitrogen™ Brasil) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (ALCOBA-FLOREZ et al., 2005a). A PCR foi realizada em um termociclador Bio Rad (modelo C 1000) com uma desnaturação inicial do DNA por 5 minutos a 95°C; 30 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de pareamento a 55°C e extensão de 1 minuto a 72°C; seguido de uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O produto amplificado foi purificado com o QIAquick® PCR *Purification* Kit (QIAGEN®) de acordo com instruções do fabricante e foi enviado à Plataforma de Sequenciamento Genômico PDTIS/ Fiocruz, utilizando o sequenciador ABI-3730 (Applied Biosystems). As sequências foram editadas usando o programa *Sequencher* versão 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA), alinhadas e analisadas com o programa MEGA versão 6.06 (TAMURA et al., 2013). Por fim, as sequências foram comparadas com as depositadas no banco de dados do NCBI/*GenBank*. A avaliação de diferentes haplótipos e o índice de diversidade nas sequências analisadas foi realizada utilizando o software DnaSP versão 5.0 (LIBRADO; ROZAS, 2009).

4.6 Produção de Enzimas Hidrolíticas

Com exceção da atividade da catalase, para determinar a produção de enzimas hidrolíticas foram realizados testes em placas de Petri (150 mm) contendo meios específicos (vide descrição abaixo). Alíquotas de 10 µL de células da levedura (1 ×

10^7 células/mL) crescidas em caldo Sabouraud dextrose sob agitação de 150 rpm a 37°C por 24 horas (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) foram inoculadas pontualmente na superfície de cada meio e as placas foram incubadas a 37°C por 7 dias. O diâmetro da colônia (*a*) e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (*b*) foram mensurados com uma régua. As atividades enzimáticas foram expressas como valor de *Pz* ($Pz=a/b$) como descrito por Price e colaboradores (1982), sendo classificado em quatro categorias: *Pz* = 1, nenhuma atividade enzimática; *Pz* entre 0,700 e 0,999, fraco produtor enzimático; *Pz* entre 0,400 e 0,699, bom produtor e *Pz* entre 0,100 e 0,399, excelente produtor enzimático (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982) (**Quadro 2**).

Quadro 2. Critérios para avaliação da produção de enzimas hidrolíticas de acordo com o valor de *Pz* ($Pz=a/b$), sendo (*a*) o diâmetro da colônia e (*b*) o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação.

Atividade Enzimática	
Classificação	Valor de <i>Pz</i> ($Pz=a/b$)
Nenhuma	1
Fraca	0,700 e 0,999
Boa	0,400 e 0,699
Excelente	0,100 e 0,399

Fonte: Price; Wilkinson e Gentry (1982).

4.6.1 Atividade da aspártico protease

Como descrito por Rùchel e colaboradores (1982), a produção de aspártico protease foi determinada usando o meio de ágar albumina [contendo 1,17% de meio base de carbono para leveduras [meio *Yeast Carbono Base* (YCB)] (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) suplementado com 0,2% de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma–Aldrich, St Louis, USA), pH 4,0] (RÜCHEL; TEGELER; TROST, 1982). Isolados com atividade enzimática de aspártico protease apresentam uma zona clara ao redor da colônia, correspondendo à hidrólise de BSA no meio

4.6.2 Atividade da caseinase

A atividade da caseinase foi investigada usando o meio ágar caseína [composto de 2% glicose, 1,6% peptona, 5% de extrato de levedura e 0,4% de caseína (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA)] como previamente descrito por Ziccardi e colaboradores (2015) (ZICCARDI et al., 2015). Isolados com atividade enzimática da caseinase apresentam uma zona clara ao redor da colônia, correspondendo à hidrólise de caseína no meio.

4.6.3 Atividade de enzimas lipolíticas

A produção de duas enzimas lipolíticas, fosfolipase e esterase, também foram avaliadas. De acordo com Price e colaboradores (1982), a atividade de fosfolipase foi determinada usando o meio ágar gema de ovo [composto de 2% de glicose (Sigma–Aldrich, St Louis, USA); 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA); 4% de NaCl; 0,074% de CaCl₂ (Sigma–Aldrich, St Louis, USA); 1,5% de ágar (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA)]; a seguir, 2% de emulsão da gema do ovo foi adicionado ao meio, pH 7,0) (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982). De acordo com Aktas e colaboradores (2002), a produção de esterase foi avaliada usando o meio ágar Tween [1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,01% de CaCl₂; 1,5% de ágar; sendo autoclavado e resfriado a 50°C e, então, adicionado 0,1% de Tween 80 (Sigma–Aldrich, St Louis, USA), pH 7,0] (AKTAS; YIGIT; AYYILDIZ, 2002). Se presentes, as enzimas fosfolipase e esterase produzidas durante o período de incubação são capazes de promover a clivagem das ligações éster e, então, os ácidos graxos liberados poderão se ligar aos íons cálcio incorporados ao meio, para formar um complexo de cálcio insolúvel, resultando em um halo claro ao redor da colônia.

4.6.4 Atividade da fitase

Como previamente descrito por Tsang (2011), a atividade da fitase (hexafosfato de mio-inositol fosfo-hidrolase) foi determinada usando o meio contendo ágar fitato de cálcio [composto de 1% de glicose; 0,05% de (NH₄)₂ SO₄; 0,02% de KCl; 0,01% de MgSO₄.7 H₂O; 0,0005% MnSO₄; 0,0005% de FeSO₄ (Sigma–Aldrich, St Louis, USA);

0,2% de fitato de cálcio; 0,05% de extrato de levedura; 1,5% de ágar, pH 7,0] (TSANG, 2011). A atividade da fitase foi diretamente observada ao redor da colônia capaz de solubilizar o fosfato presente no meio.

4.6.5 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi verificada usando o meio comercial ágar sangue de carneiro a 5% em placa de Petri de 90 mm (Plast Labor, Brasil). A presença de um halo ao redor da colônia indica atividade hemolítica positiva.

4.6.6 Atividade da catalase

A produção de catalase foi determinada através do teste semiquantitativo descrito por (METCHOCK; NOLTE; WALLACE JR., 1999) com adaptações para aplicação em leveduras. Resumidamente, tubos de ensaio com tampas de rosca contendo o meio ágar Sabouraud dextrose foram inoculados com 200 µL de uma suspensão de células de *C. glabrata* equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland e incubados a 37°C por 48 horas. A seguir, 1 mL de uma mistura 1:1 de 10% de Tween 80 e 10% de peróxido de hidrogênio foi adicionado em cada tubo. A coluna de bolhas formada foi mensurada em milímetros depois de 5 minutos a temperatura ambiente. Um meio não inoculado foi usado como controle negativo. Uma coluna de bolhas < 15mm corresponde a baixo produtor de catalase, enquanto que uma coluna de bolhas ≥ 15mm corresponde a alto produtor de catalase (METCHOCK; NOLTE; WALLACE JR., 1999).

4.7 Formação de Biofilme

4.7.1 Produção de biomassa

Células fúngicas de *C. glabrata* foram cultivadas em caldo contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de dextrose [meio *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD)] (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) e mantidas sob agitação de 150 rpm a 37°C por 24 horas. A cultura de células obtida foi centrifugada

a 3.000 rpm por 5 minutos e lavada duas vezes com salina tamponada com fosfato [*Phosphate-Buffered Saline* (PBS)] estéril. A suspensão de células fúngicas foi ajustada para a concentração final de 1×10^6 células/mL no meio RPMI 1640. A seguir, 100 μ L dessa suspensão foram transferidos para placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços de fundo plano e incubadas a 37°C por 48 horas para formação do biofilme. Subsequentemente, os poços foram lavados três vezes com PBS (200 μ L/poço) para remover as células não aderentes. Todo esse procedimento foi realizado utilizando também o meio base de nitrogênio para leveduras [*Yeast Nitrogen Base* (YNB)] (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) suplementado com 0,2% de glicose para formação do biofilme. A biomassa resultante da formação de biofilme no meio RPMI e no meio YNB foi avaliada usando o método de cristal violeta (CV) (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). Resumidamente, uma alíquota de 100 μ L de metanol 99% (Merck, Darmstadt, Germany) foi adicionada em cada poço por 15 minutos para fixar o biofilme e, então, o sobrenadante foi retirado e as placas deixadas ao ar livre para secar. Após secagem, 200 μ L de uma solução de cristal violeta 0,4% foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos. O excesso de corante foi removido e os poços foram lavados com 200 μ L de água estéril. Finalmente, 150 μ L de ácido acético 33% (Merck, Darmstadt, Germany) foram adicionados. A absorbância foi medida a 590 nm usando um leitor de microplacas (Epoch, Biotek). A classificação quanto à produção de biomassa foi realizada da seguinte maneira: valores de absorbância menores que 0,44 correspondem à baixa produção de biomassa, valores de 0,44 a 1,17 correspondem à moderada produção de biomassa e valores maiores que 1,17 correspondem à alta produção de biomassa (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014) **(Quadro 3)**.

Quadro 3. Critérios para avaliação da produção de biomassa pelo método de coloração pelo cristal violeta (CV) e da viabilidade celular pelo ensaio de redução do XTT utilizando o meio RPMI 1640 para a produção de biofilme.

Classificação	Método	
	Cristal Violeta Absorbância ($\lambda=590$ nm)	XTT Absorbância ($\lambda=490$ nm)
Baixa	< 0,44	< 0,097
Moderada	0,44 a 1,17	0,097 a 0,2
Alta	> 1,17	0,2

Fonte: Marcos-Zambrano e colaboradores (2014).

4.7.2 Viabilidade celular

Em paralelo ao teste de produção de biomassa, as células viáveis no biofilme foram avaliadas através de ensaio colorimétrico que investiga a redução do metabolito 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5[(fenil-amino) carbonil]-2H-tetrazólio hidroxido (XTT) a um produto castanho solúvel em água, a formazana. Neste sentido, 200 µL de uma solução XTT/ menadiona (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) [contendo 40 µL de uma solução estoque de XTT 1mg/mL em PBS e 2 µL de uma solução estoque de Menadiona 0,4mM em acetona] foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas no escuro a 37°C por 3 horas. A seguir, 100 µL do sobrenadante de cada poço foram transferidos para uma nova placa de microtitulação e as mudanças colorimétricas foram mensuradas a 490 nm usando um leitor de microplacas (Epoch, Biotek) (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). Para o XTT, valores de absorbância menores que 0,097 correspondem à baixa atividade metabólica; valores de 0,097 a 0,2 correspondem à moderada atividade metabólica e valores maiores que 0,2 correspondem à alta atividade metabólica (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014) **(Quadro 3)**.

4.8 Teste de Suscetibilidade aos Antifúngicos (Células em Suspensão)

Todos os isolados incluídos neste estudo foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo de acordo com o documento de referência preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) M27-A3 (CLSI, 2008a) com algumas modificações. Foram utilizadas placas estéreis de microtitulação de poliestireno de 96 poços de fundo plano (Jet Biofil, Guangdong, China) e a leitura dos resultados foi realizada num leitor de microplacas (Epoch, Biotek) a 530 nm de comprimento de onda.

Os fármacos testados foram anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, caspofungina, micafungina e 5-fluorocitosina (Sigma–Aldrich, St Louis, USA).

Para os antifúngicos insolúveis em água (anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol), o reagente dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como diluente no preparo da primeira série de diluições e o meio RPMI 1640 (com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio) (Sigma–Aldrich, St Louis, USA), tamponado com 0,165 M de MOPS (3-*N*- morpholinopropane-sulphonic acid) (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil), pH 7,0 na segunda série de diluições. Para os antifúngicos solúveis em água (fluconazol, 5-fluorocitosina, caspofungina e micafungina), o diluente empregado em todas as diluições foi o meio RPMI-1640.

A partir de soluções estoques dos antifúngicos [1.600 µg/mL (para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol), 800 µg/mL (para caspofungina e micafungina) e 5.280 µg/mL (para fluconazol e 5-fluorocitosina)], cada antifúngico foi preparado em 10 diferentes concentrações seriadas. Para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, a faixa de concentração foi de 0,0313 a 16 µg/mL; para fluconazol e 5-fluorocitosina foi de 0,25 a 128 µg/mL; e para caspofungina e micafungina foi de 0,015 a 8 µg/mL conforme foi descrito nas **Figuras 4 e 5**.

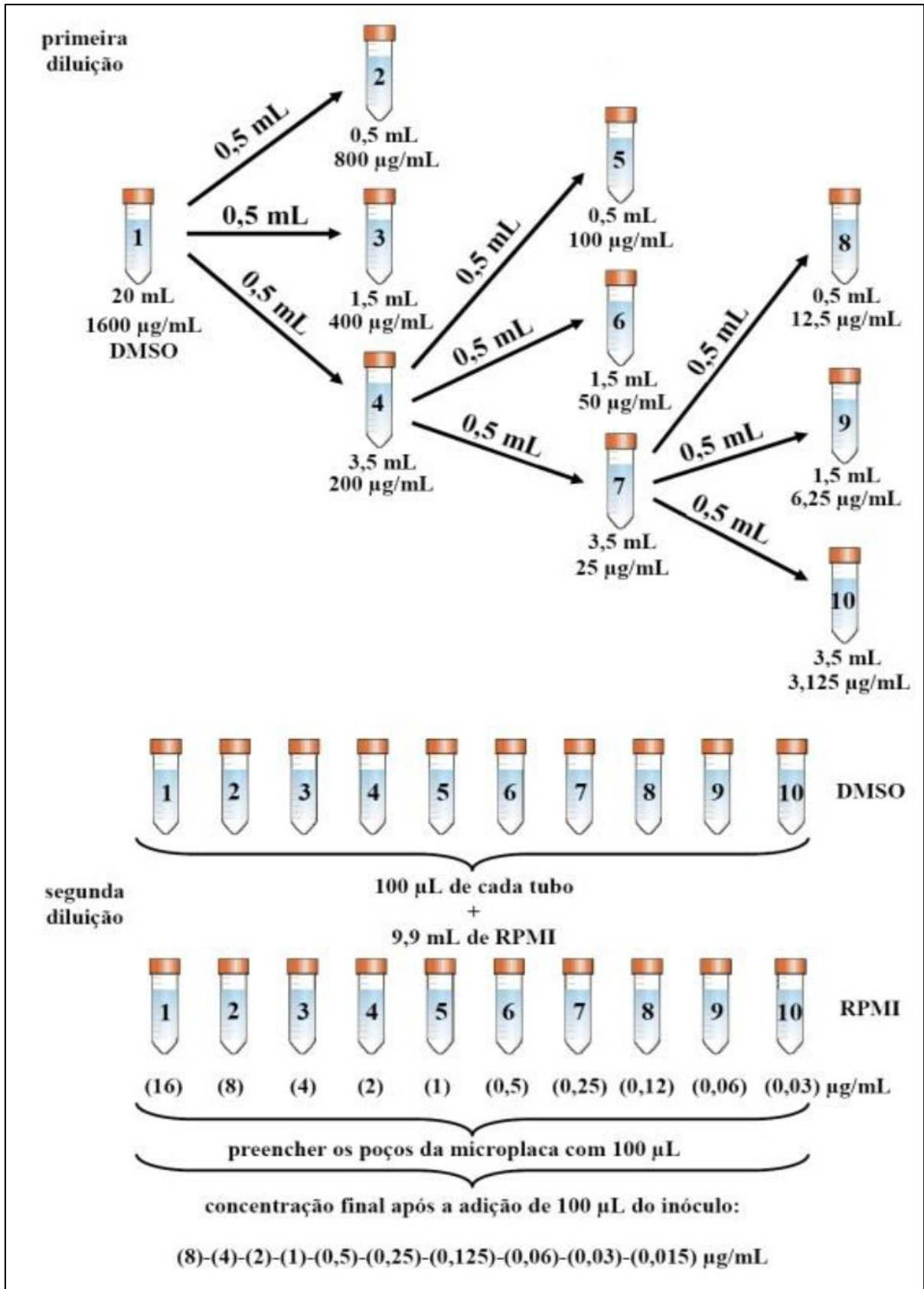


Figura 4. Esquema de diluição dos fármacos antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (protocolo M27-A3). Para caspofungina e micafungina, a concentração da solução estoque (representada pelo tubo 1) é de 800 µg/mL.

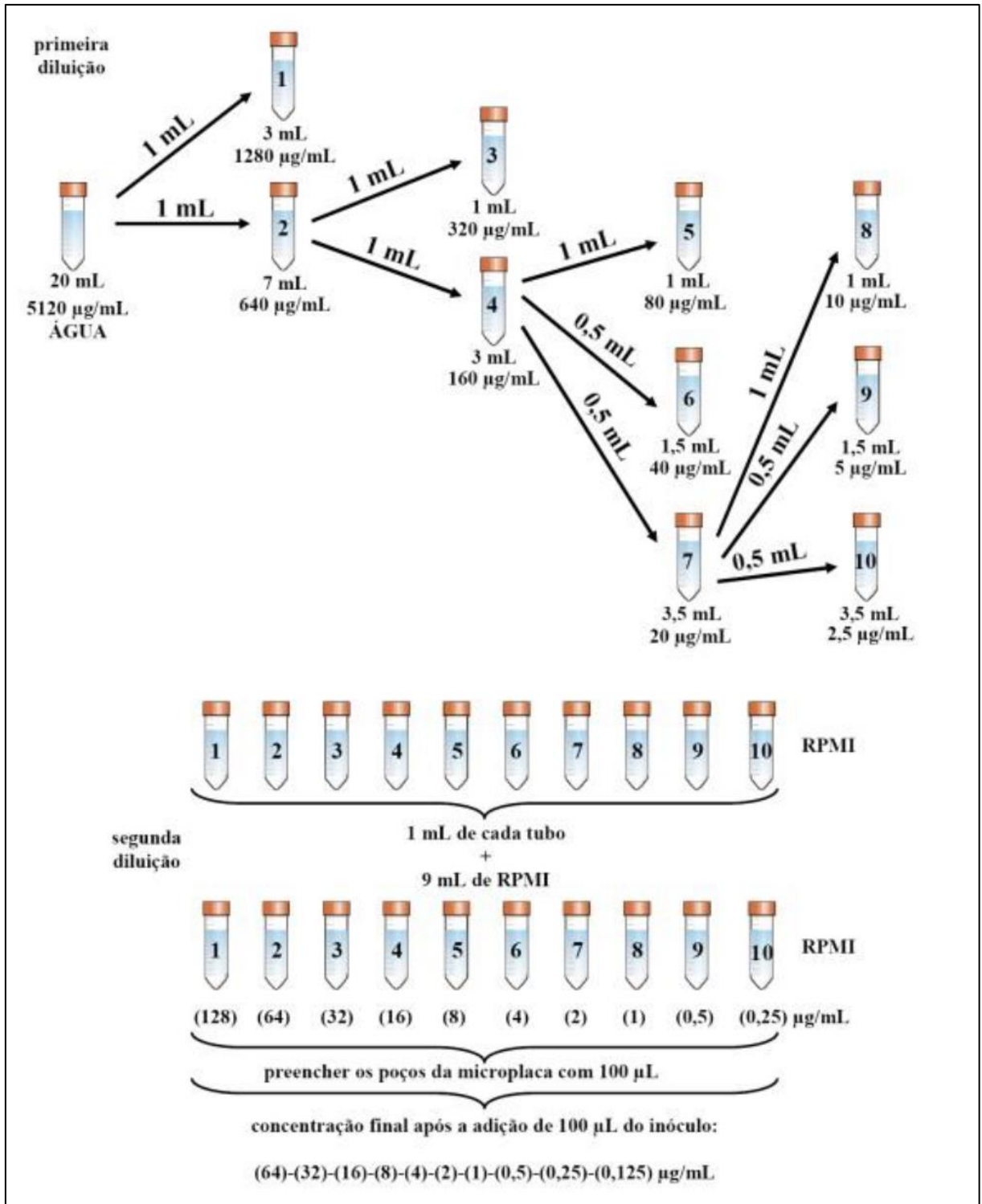


Figura 5. Esquema de diluição dos fármacos antifúngicos fluconazol e 5-fluorocitosina pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (protocolo M27-A3).

Os poços entre as colunas 02 e 11 das placas de microtitulação de 96 poços (com 8 linhas identificadas de A-H e 12 colunas numeradas de 1 a 12) foram preenchidos com alíquotas de 100 µL das 10 diluições seriadas do antifúngico. Os poços da coluna 01 foram preenchidos com 200 µL de RPMI-1640 para controle de esterilidade e os poços da coluna 12 foram preenchidos com 100 µL de RPMI-1640 ou 100 µL de RPMI-1640 com DMSO 0,2% para controle de crescimento.

Para obtenção do inóculo dos isolados clínicos do complexo *C. glabrata*, um repique de 24 horas no meio ágar Sabouraud dextrose foi realizado. A seguir, uma suspensão de leveduras foi preparada em 3 mL de salina a 0,85% e a densidade óptica ajustada através de um densitômetro para o padrão nº 0,5 da escala de McFarland que corresponde a aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Para produzir uma concentração celular entre $1-5 \times 10^3$ UFC/mL, essa suspensão foi ainda diluída a 1:1.000 em RPMI-1640.

Em seguida, alíquotas de 100 µL do inóculo foram adicionadas nos poços das placas entre as colunas 02 e 12 reduzindo à metade as diferentes concentrações de antifúngico e do inóculo ($0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/mL). Em cada placa foram distribuídos seis inóculos de leveduras e as duas cepas de referência: *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. As placas foram fechadas e incubadas a 35°C por até 48 horas, e no caso da anfotericina B protegida da luz. Os testes foram realizados em duplicata e, em caso de discrepâncias, foram repetidos mais uma vez.

A leitura dos resultados foi realizada num leitor de microplacas (Epoch, Biotek) a 530 nm de comprimento de onda após 24 horas de incubação. Caso o crescimento da levedura no poço controle tenha sido insuficiente (absorbância < 0,200), uma nova leitura deve ser realizada após 48 horas de incubação (Protocolo M27-S4, CLSI 2012b). Para a anfotericina B, os valores das CIMs foram definidos como a menor concentração do antifúngico capaz de inibir 100% do crescimento e para os demais fármacos os valores das CIMs foram definidos como a menor concentração do antifúngico capaz de inibir 50% do crescimento quando comparado ao poço controle (livre do fármaco). Os resultados foram interpretados de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2008b, 2012) (**ANEXOS A, B, C e D**) e também usando os valores de pontes de corte epidemiológicos (ECV) (PFALLER; DIEKEMA, 2012; ESPINEL-INGROFF et al., 2014).

4.9 Teste de Suscetibilidade aos Antifúngicos (Células no biofilme)

Dentre os fármacos antifúngicos testados, quatro foram incluídos nesse teste, sendo um poliênico (anfotericina B), um azólico (itraconazol), uma equinocandina (micafungina) e um análogo de pirimidina (5-fluorocitosina). O critério para a escolha desses fármacos baseou-se no fato de que todos esses antifúngicos possuem pontos de corte clínicos estabelecidos pelo CLSI, além da existência de isolados clínicos de *C. glabrata* do estudo suscetíveis aos fármacos.

Para a anfotericina B e o itraconazol, a faixa de concentração foi de 0,5 a 16 µg/mL; para a micafungina foi de 0,06 a 2 µg/mL e para a 5-fluorocitosina foi de 4 a 128 µg/mL.

A formação de biofilme foi realizada em meio RPMI 1640 conforme descrito no item 4.7.1. Depois da formação de biofilme, o meio de suspensão foi removido e o biofilme foi lavado três vezes com PBS estéril (200 µL/ poço). A seguir, 100 µL dos antifúngicos foram adicionados nas microplacas contendo o biofilme de *Candida* e incubados a 35°C por 24h. Após a incubação, a atividade metabólica das células no biofilme foi mensurada pelo ensaio colorimétrico de redução do XTT (item 4.7.2). Para a anfotericina B, o valor de CIMB foi definido na menor concentração do fármaco capaz de inibir 100% do crescimento da levedura. Para o itraconazol, a micafungina e a 5-fluorocitosina os valores das CIMBs foram definidos como a menor concentração do antifúngico capaz de inibir 50% do crescimento quando comparado ao poço controle (livre do fármaco) (PIERCE et al., 2008). Os testes foram realizados em duplicata e, em caso de discrepâncias, foram repetidos mais uma vez.

4.10 Análise de Resultados

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 5*. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. A comparação de medianas entre dois diferentes grupos foi realizada utilizando o teste Mann-Whitney e entre três ou mais grupos foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis. A comparação de medianas entre dois grupos pareados foi realizada através do teste dos postos sinalizados de Wilcoxon. O coeficiente de correlação de postos

de Spearman (r_s) foi utilizado para avaliar com que intensidade a relação entre duas variáveis distintas pode ser descrita pelo uso de uma função monótona.

Para avaliar a intensidade da concordância entre dois métodos de classificação foi utilizada a análise Kappa. Os valores de Kappa foram interpretados conforme descrito na literatura (LANDIS; KOCH, 1977), onde Kappa < 0 indica nenhuma concordância; entre 0,01 e 0,19 indica uma concordância muito baixa; entre 0,20 e 0,39, concordância baixa; entre 0,40 e 0,59, concordância moderada; entre 0,60 e 0,79, concordância substancial, entre 0,80 e 0,99, concordância quase perfeita e Kappa = 1 indica concordância plena.

Em relação ao teste de suscetibilidade aos antifúngicos, análises estatísticas descritivas de frequência acumulada foram realizadas para determinar: (1) o intervalo de CIM representando o limite superior e inferior das CIMs de cada antifúngico; (2) a CIM₅₀ que equivale à concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados testados; (3) a CIM₉₀ definida como a concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados testados e (4) a média geométrica das CIMs.

5 RESULTADOS

5.1 Confirmação Fenotípica

Inicialmente, os 92 isolados clínicos previamente identificados como *C. glabrata* foram reisolados e avaliados quanto a sua viabilidade e pureza, e a seguir, reidentificados por método bioquímico.

5.1.1 Características macromorfológicas das leveduras

Todos os 92 isolados clínicos foram capazes de crescer em meio ágar Sabouraud dextrose e as características morfológicas das colônias foram observadas. Em relação à pigmentação, houve variação do levemente branco ao creme com reverso branco; as bordas foram delineadas; textura cremosa e homogênea de aspecto úmido ou seco; relevo glabro e, quanto ao brilho, foi verificado ora um aspecto lustroso ora opaco. Para fins ilustrativos, o nosso número amostral foi representado pela cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001 e por um isolado clínico de sítio respiratório (DM 28) (**Figura 6**). Todos os demais isolados apresentaram macromorfologia semelhante em ágar Sabouraud dextrose.



Figura 6. Macromorfologia de *Candida* em meio ágar Sabouraud dextrose após incubação a 35°C por 72 horas. **(a)** *C. glabrata* ATCC 2001 e **(b)** um isolado do sítio respiratório (DM 28).

Em meio CHROMagar® *Candida*, 91 isolados apresentaram colônias de pigmentação cobre representado pelo isolado clínico de sítio circulatório (DM 45) e um isolado apresentou pigmentação branca (DM 28). Não foram observadas colônias de cor verde, azul e/ ou rosa com bordas rugosas, correspondentes à identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, respectivamente, no meio cromogênico, descartando então a presença dessas colônias mistas nos isolados clínicos estudados (**Figura 7**).

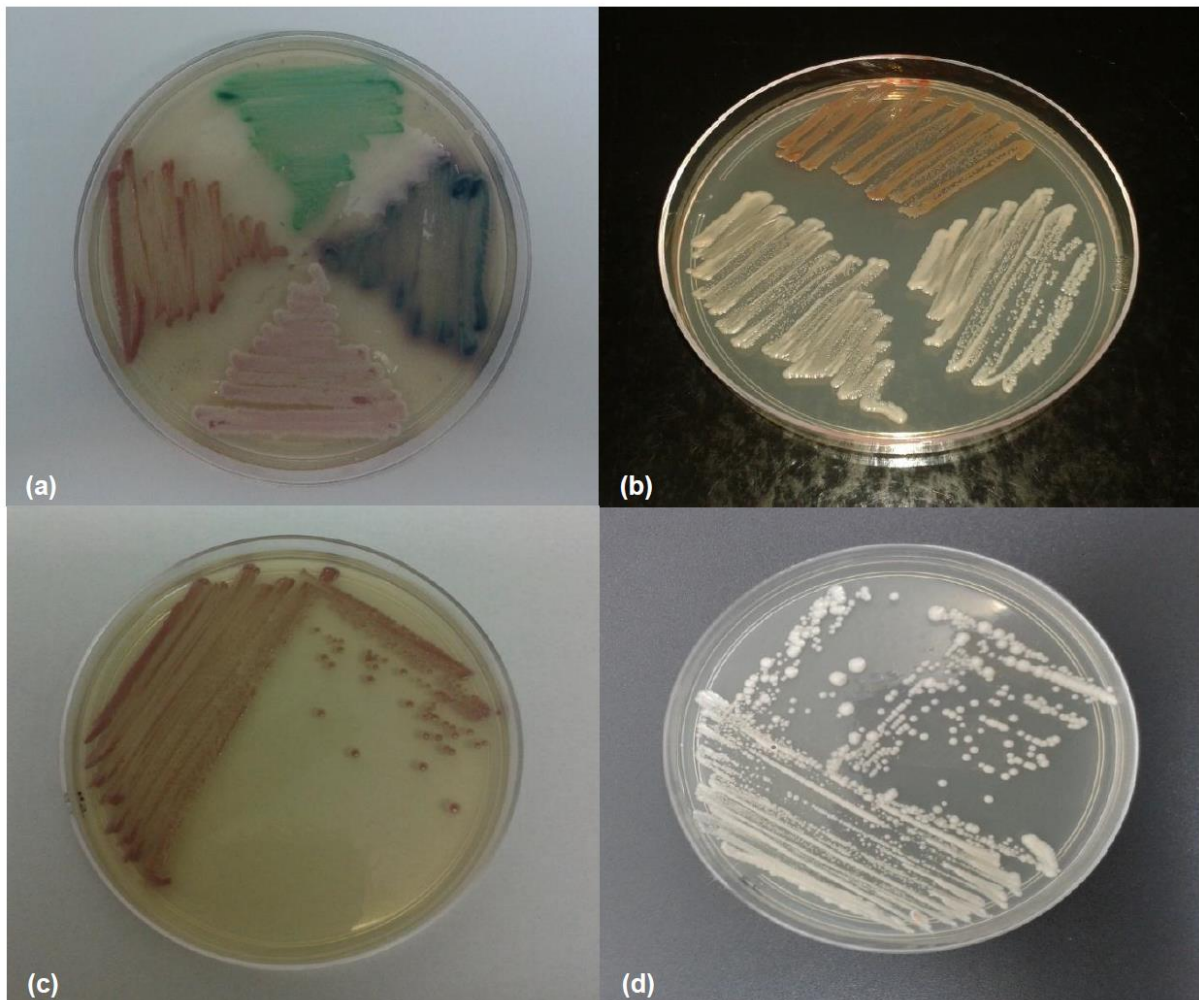


Figura 7. Macromorfologia de espécies de *Candida* no meio cromogênico CHROMagar *Candida* após incubação a 35° por 72 horas **(a)** no sentido horário a partir de 12 horas: *C. albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 2001; **(b)** no sentido horário a partir de 12 horas: *C. glabrata* ATCC 2001, *C. nivariensis* WM 09.150 e *C. bracarensis* WM 14.01; **(c)** isolado clínico do sítio circulatório (DM 45) e **(d)** isolado clínico do sítio respiratório (DM 28). Posteriormente, os isolados DM 45 e DM 28 foram identificados molecularmente como *C. glabrata* e *C. nivariensis*, respectivamente.

5.1.2 Identificação bioquímica pelo Vitek® 2

Todos os 92 isolados foram analisados pelo sistema automatizado Vitek® 2 utilizando o cartão *YST Card* e a média do percentual de probabilidade foi de 98% em relação à identificação da levedura como *Candida glabrata*. Todos os isolados assimilaram glicose e trealose (**Tabela 1**).

Tabela 1. Caracterização bioquímica de 92 isolados oriundos de diferentes espécimes clínicos provenientes de pacientes imunocomprometidos com quadro de candidíase em dois hospitais públicos no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2015.

Método	Identificação da Espécie (% de Probabilidade)			
	Intervalo (%)	Média (%)	Assimilação Glicose/ Trealose (%)	IC 95%
Vitek® 2 <i>YST Card</i>	94,0–99,0	<i>Candida glabrata</i> 98,0	100,0	93,8–99,4

IC, intervalo de confiança

No entanto, analisando todos os resultados dos testes contidos no cartão *YST Card* (64 ao todo) do Vitek® 2 foi possível gerar um dendrograma onde foram observados 26 perfis bioquímicos diferentes entre os 92 isolados em estudo em relação à cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001 (**Figura 8**).



Figura 8. Dendrograma baseado na análise dos perfis bioquímicos obtidos pelo Vitek® 2 de 92 isolados clínicos previamente identificados como *C. glabrata* e da cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001. *Candida albicans* ATCC 18804 foi utilizada como grupo externo. A similaridade entre os perfis bioquímicos foi analisada pelo programa DendroUPGMA sendo utilizados o coeficiente de Jaccard e 100 réplicas de *bootstrap* na construção do dendrograma.

O perfil bioquímico com o maior número de isolados clínicos foi o perfil 08 (N=33), seguido pelo perfil 01 (N=13) e pelo perfil 13 (N=11), sendo que esses isolados estavam distribuídos em cinco diferentes sítios de isolamento (**Tabela 2**).

Tabela 2. Isolados clínicos do complexo de espécies *C. glabrata* de acordo com o perfil bioquímico obtido pelo Vitek® 2 e o sítio de isolamento das amostras.

Perfil (P)	Nº de Isolados						
	Sítios Anatômicos				Outros Sítios		TOTAL
	Respiratório	Gastrointestinal	Urogenital	Circulatório	Inserção ¹	Cirúrgico ²	
P01	04	03	03	02	01	-	13
P02	01	-	-	-	-	-	01
P03	-	-	-	-	01	-	01
P04	-	-	-	01	-	-	01
P05	-	-	01	-	-	-	01
P06	-	01	-	02	-	-	03
P07	01	-	-	-	-	-	01
P08	08	09	07	08	01	-	33
P09	-	02	02	04	01	-	09
P10	-	-	-	-	-	01	01
P11	-	-	01	-	-	-	01
P12	-	-	-	01	-	-	01
P13	03	02	03	02	01	-	11
P14	01	-	-	-	-	-	01
P15	01	-	-	-	-	-	01
P16	-	-	-	01	-	-	01
P17	-	-	-	01	-	-	01
P18	01	-	-	-	-	-	01
P19	-	01	-	-	-	-	01
P20	-	-	01	-	-	-	01
P21	01	-	-	-	-	-	01
P22	-	-	-	01	-	-	01
P23	-	-	01	01	-	-	02
P24	-	01	01	-	-	-	02
P25	-	-	01	-	-	-	01
P26	-	-	-	01	-	-	01
TOTAL	21	19	21	25	05	01	92

¹Sítio de inserção (ponta de cateter, dreno)

²Sítio cirúrgico (ferida pós-operatória)

As variações ocorreram em 12 testes contidos no cartão YST *Card* do Vitek 2: teste de arginina (ARG), detecção de urease (URE) e nos testes de assimilação de glicerol (GLYLa), xilitol (XLTa), D-turanose (dTRUa), D-galacturonato (dGATa), L-glutamato (l-GLTa), DL-lactato (LATa), glucuronato (GRTa), L-prolina (l-PROa), 2-ceto-D-gluconato (2KGa) e D-gluconato (dGNTa) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Perfil bioquímico de 92 isolados clínicos identificados pelo Vitek® 2 como *C. glabrata*.

		Testes bioquímicos que variaram no cartão YST Card											
		ARG	GLYLa	XLTa	URE	dTRUa	dGTaA	IGLTa	LATa	GRTa	I-PROa	2KGa	dGNTa
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001		-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
Perfil (P)	Nº de isolados	ARG	GLYLa	XLTa	URE	dTRUa	dGTaA	IGLTa	LATa	GRTa	I-PROa	2KGa	dGNTa
P01	13	.	+	+
P02	01	.	+	.	.	.	+	+
P03	01	+	+	.	.	.	+	.
P04	01	+	+
P05	01	+	+	+	.	+	.	.	.
P06	03	+	+	-
P07	01	.	+	.	.	.	+	+	-
P08	33	+	-
P09	09	+	-
P10	01	+	-	.	.	+	.
P11	01	+	.	+	-
P12	01	+	-	.	-	.	.
P13	11	+	-
P14	01	+	.	-
P15	01	.	.	.	+	.	.	.	-
P16	01	.	.	.	+	.	.	+	-
P17	01	.	+	+	-
P18	01	.	+	-
P19	01	.	+	+	.	.	.	+
P20	01	.	+	.	.	.	+	+	-
P21	01	.	.	+	-
P22	01	.	.	+	.	.	+	+	-
P23	02	.	.	+	.	.	.	+	-
P24	02	-
P25	01	+	-	.	.	.	-
P26	01	.	.	+	.	.	+	.	-	.	.	.	-

ARG, arginina; GLYLa, assimilação de glicerol; XLTa, assimilação de xilitol; URE, detecção de urease; dTRUa, assimilação de D-turanose; dGTaA, assimilação de D-galacturonato; I-GLTa, assimilação de L-glutamato; LATa, assimilação de DL-lactato; GRTa, assimilação de glucuronato; I-PROa, assimilação de L-prolina; 2KGa, assimilação de 2-ceto-D-gluconato; dGNTa, assimilação de D-gluconato. (.) significa que o isolado em análise apresentou o mesmo perfil bioquímico da cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001.

De acordo com o perfil bioquímico obtido pelo Vitek® 2, para os testes de arginina (ARG) e para assimilação de glucuronato (GRTa), apenas um isolado do trato urogenital foi positivo. Enquanto que para o teste de assimilação de glicerol (GLYLa), 19 isolados foram positivos. Já para o teste de assimilação de xilitol (XLTa), a positividade foi observada em seis isolados. Todos de diferentes sítios de isolamento.

Por outro lado, para o teste de detecção de urease (URE), um isolado clínico do trato respiratório e outro do circulatório foram positivos para produção de urease. Esse teste foi repetido utilizando o caldo de uréia de Christensen (CHRISTENSEN, 1946) e o resultado foi negativo para ambos os isolados.

Um único isolado do trato urogenital foi positivo para o teste de assimilação de D-turanose (dTRUa). Para o teste de assimilação de D-galacturonato (dGTaA), 12 isolados foram positivos. No entanto, a maior positividade foi observada em 74 isolados no teste de assimilação de L-glutamato (I-GLTa) e a maior negatividade foi observada em 64 isolados no teste de assimilação de DL-lactato (LATa).

Para o teste de assimilação da prolina (I-PROa), um único isolado do trato gastrointestinal foi negativo. Por outro lado, para o teste de assimilação de 2-ceto-D-gluconato (2-KGa), um isolado de sítio de inserção e outro de sítio cirúrgico foram positivos. Por fim, quatro isolados foram negativos para o teste de assimilação de D-gluconato (dGNTa), sendo um isolado do trato gastrointestinal, dois isolados do trato urogenital e um do trato circulatório.

5.2 Identificação Molecular

A identificação molecular foi realizada pela amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. Todos os 92 isolados clínicos em estudo foram caracterizados molecularmente sendo 91 (98,9%) isolados identificados como *C. glabrata stricto sensu* e um (1,1%) isolado identificado como *C. nivariensis*. Nenhum isolado foi identificado como *C. bracarensis* na nossa amostragem (**Figura 9**).

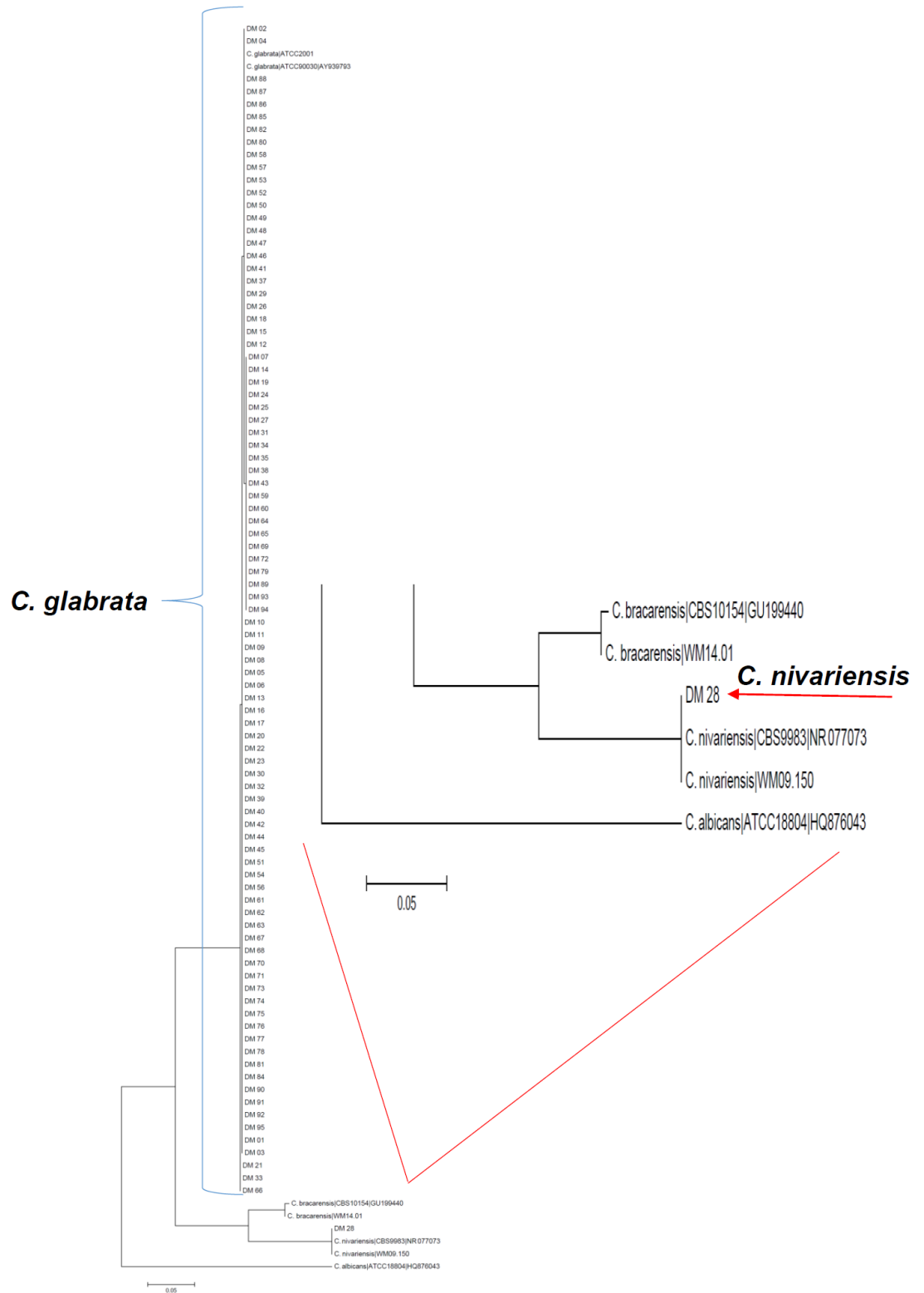


Figura 9. Dendrograma baseado na análise da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA das seqüências de 99 táxons, sendo 92 isolados, três cepas de referência (*C. glabrata* ATCC 2001, *C. bracarensis* WM 14.01 e *C. nivariensis* WM 09.150) e quatro seqüências oriundas do GenBank (AY939793, GU199440, NR_077073, HQ876043). A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Join (NJ). A distância evolutiva foi computada utilizando o método *Maximum Composite Likelihood*. Um total de 484 bases foi observado no conjunto final (Programa MEGA 6.0.)

Os isolados de *C. glabrata stricto sensu* apresentaram entre 99-100% de similaridade quando comparados com a sequência de *C. glabrata* AY939793 depositada no GenBank; por outro lado, o isolado identificado como *C. nivariensis* apresentou 100% de similaridade quando comparado à sequência de *C. nivariensis* GU199444 disponível no NCBI/GenBank.

Todas as sequências obtidas para a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foram depositadas no GenBank sob os números de acesso KX450781-KX450814, KX450816-KX450833, KX450835-KX450861, KX450863-KX450874 para os isolados de *C. glabrata Stricto Sensu*; e KJ957824 para o isolado de *C. nivariensis*.

A análise das sequências de nucleotídeos utilizando o software DnaSP versão 5.0 (LIBRADO; ROZAS, 2009) constatou a presença de 13 haplótipos diferentes com um índice de diversidade (HD) de 0,7630 (**Tabela 4**).

Tabela 4. Distribuição de haplótipos após o alinhamento de 91 sequências de nucleotídeos de isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* oriundas do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2.

Haplótipo (H)	Nº de sequências	Posição das bases nitrogenadas						
		123	316	330	381	597	774	784
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001		T	C	G	C	A	A	T
H01	36	.	A	A	A	.	.	.
H02	02	.	.	.	A	G	.	.
H03	12
H04	21	G	.	C
H05	02	.	A	A
H06	02	C	A	A	.	.	.	C
H07	04	C	.	.	.	G	.	.
H08	04	.	A	A	.	G	.	.
H09	01	.	.	A	.	G	.	.
H10	03	C	.	.	.	G	T	.
H11	02	G	.	.
H12	01	.	A	.	.	G	.	C
H13	01	.	A	.	.	G	.	.

T, timina; C, citosina; G, guanina; A, adenina.

(.) significa que a(s) sequência(s) em análise, em determinadas posições, tem a mesma base nitrogenada da cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001.

O haplótipo com o maior número de isolados clínicos foi o H01 (N=36), seguido pelo H04 (N=21) e pelo H03 (N=12), sendo que esses isolados não estavam agrupados e sim distribuídos em diferentes sítios de isolamento (**Tabela 5**).

Tabela 5. Isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* de acordo com o perfil genotípico (haplótipo) obtido após sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 e o sítio de isolamento das amostras.

Haplótipo (H)	Nº de Isolados						
	Sítios Anatômicos				Outros Sítios		TOTAL
	Respiratório	Gastrointestinal	Urogenital	Circulatório	Inserção ¹	Cirúrgico ²	
H01	10	07	07	12	-	-	36
H02	-	01	-	01	-	-	02
H03	01	03	04	02	02	-	12
H04	06	05	02	04	03	01	21
H05	-	-	-	02	-	-	02
H06	-	-	-	02	-	-	02
H07	02	-	02	-	-	-	04
H08	01	02	01	-	-	-	04
H09	-	-	01	-	-	-	01
H10	-	-	02	01	-	-	03
H11	-	01	-	01	-	-	02
H12	-	-	01	-	-	-	01
H13	-	-	01	-	-	-	01
TOTAL	20	19	21	25	05	01	91

¹Sítio de inserção (ponta de cateter, dreno)

²Sítio cirúrgico (ferida pós-operatória)

Comparando os 26 perfis bioquímicos e os 13 haplótipos (**Tabela 6**), foi possível observar que os isolados de *C. glabrata stricto sensu* não se encontram agrupados em um determinado perfil e/ou haplótipo e sim distribuídos entre eles. Já o perfil bioquímico 18 correspondeu especificamente ao haplótipo da espécie *C. nivariensis*.

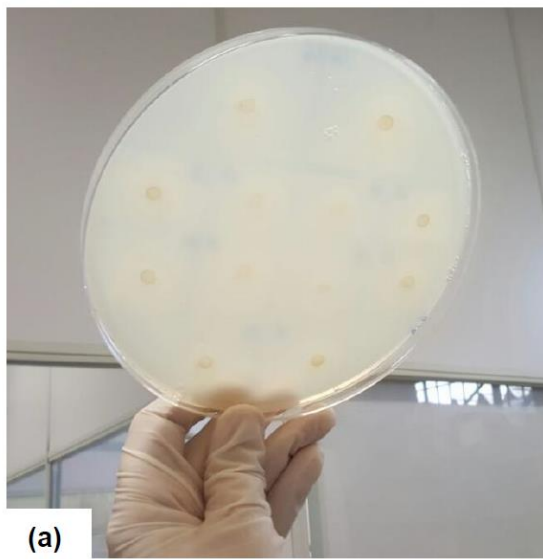
Tabela 6. Número de isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* em comum após análise do resultado do perfil bioquímico e do haplótipo.

FENÓTIPO Perfil (P)	GENÓTIPO													TOTAL
	Haplótipo (H) - N° de Isolados													
	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12	H13	
P01	07	01	-	03	-	-	-	01	-	-	-	01	-	13
P02	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P03	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	-	-	01
P05	-	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P06	02	-	-	-	-	-	01	-	-	-	-	-	-	03
P07	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P08	14	-	05	07	-	-	01	02	01	02	01	-	-	33
P09	02	01	02	01	-	02	01	-	-	-	-	-	-	09
P10	-	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	01
P12	-	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P13	04	-	01	03	-	-	02	-	-	01	-	-	-	11
P14	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P15	-	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P16	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P17	-	-	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P19	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P20	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P21	-	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P22	-	-	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P23	01	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02
P24	01	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02
P25	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
P26	-	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
TOTAL	36	02	12	21	02	02	04	04	01	03	02	01	01	91

5.3 Produção de Enzimas Hidrolíticas

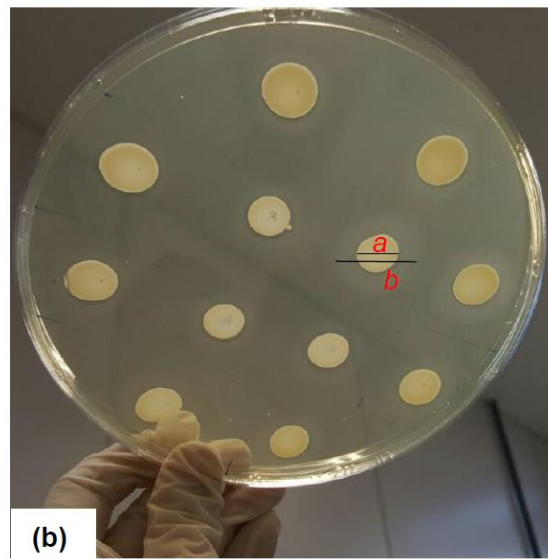
Um total de 92 isolados clínicos do complexo *C. glabrata* foi avaliado quanto à capacidade de produzir *in vitro* diferentes enzimas hidrolíticas e a atividade enzimática foi determinada com base no valor de *Pz* como descrito no **Quadro 2**.

Para fins ilustrativos, o nosso N amostral foi representado por seis isolados clínicos do mesmo sítio de isolamento (circulatório) dispostos em duplicata em placas de Petri contendo meios específicos para o teste da atividade enzimática para aspártico protease, esterase e fitase. Para o teste da atividade hemolítica só foi possível adicionar um isolado (sítio de inserção - ponta cateter) em duplicata por placa, devido ao tamanho reduzido desta placa (90 mm) em relação aos demais meios de cultura. Esses isolados apresentaram atividade enzimática evidenciada pela presença de um halo ao redor da colônia e no cada do teste da catalase realizado em tubos de ensaio com rosca foi possível observar a presença de bolhas evidenciando a hidrólise do peróxido de hidrogênio com consequente liberação de oxigênio como representado na **Figura 10**.



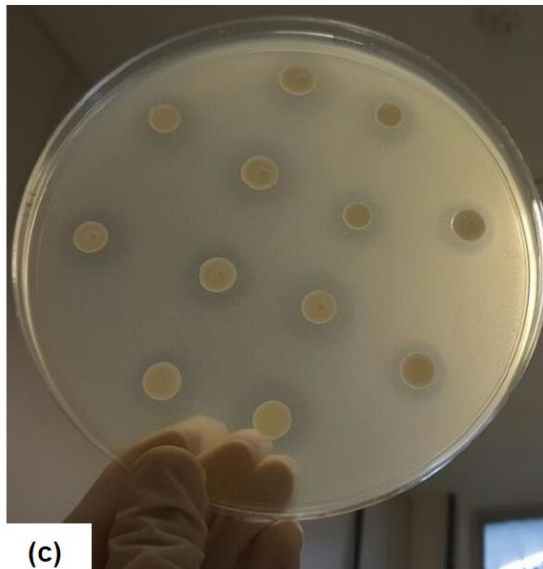
(a)

Aspártico protease



(b)

Esterase



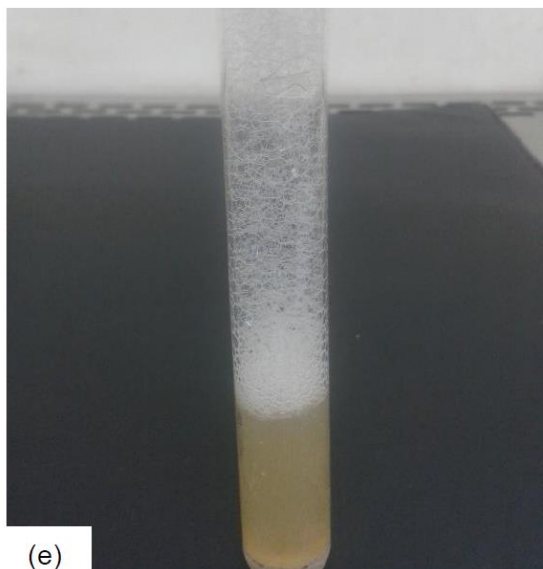
(c)

Fitase



(d)

Atividade hemolítica



(e)

Catalase

Figura 10. Fotos ilustrativas de isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* produtores de enzimas hidrolíticas. **(a)** Aspártico protease (ágar YCB/ BSA), **(b)** Esterase (ágar Tween), **(c)** Fitase (ágar fitato de cálcio) e **(d)** Atividade hemolítica (ágar sangue de carneiro). As atividades enzimáticas foram expressas como valor de Pz ($Pz=a/b$) sendo (a) o diâmetro da colônia e (b) o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação [vide **Figura (b)**]. **(e)** Teste da catalase onde a coluna de bolhas indica a hidrólise de peróxido de hidrogênio.

As atividades enzimáticas de caseinase e fosfolipase não foram detectadas em nenhum dos isolados testados sob as condições experimentais empregadas nesse estudo. Porém, 87 isolados de *C. glabrata stricto sensu* (95,6%) foram capazes de produzir aspártico protease (P_z variando de 0,100 a 0,583), sendo 30 isolados (33,0%) considerados excelentes produtores (P_z variando de 0,100 a 0,395) e 57 isolados (62,6%) considerados bons produtores (P_z variando de 0,400 a 0,583).

A produção de esterase foi detectada em 51 isolados de *C. glabrata stricto sensu* (56%), sendo um isolado (1,1%) classificado como excelente produtor (média de $P_z = 0,393$), 48 isolados (52,7%) considerados bons produtores (P_z variando de 0,414 a 0,667) e dois isolados (2,2%) foram classificados como fracos produtores (P_z variando de 0,762 a 0,800).

Em relação à produção de fitase, todos os 91 isolados de *C. glabrata stricto sensu* (100%) foram positivos (P_z variando de 0,114 a 0,762). Em resumo, 10 isolados (11,0%) foram considerados excelentes produtores (P_z variando de 0,114 a 0,380), 80 isolados (87,9%) foram classificados como bons produtores (P_z variando de 0,400 a 0,692) e um isolado (1,1%) classificado como fraco produtor de fitase (média de $P_z = 0,762$).

A atividade hemolítica foi observada em 90 isolados de *C. glabrata stricto sensu* (98,9%), sendo um isolado (1,1%) considerado excelente produtor de hemolisina (média de $P_z = 0,385$), 82 isolados (90,1%) classificados como bons produtores (P_z variando de 0,409 a 0,688) e sete isolados (7,7%) considerados fracos produtores (P_z variando de 0,722 a 0,795).

A cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001 foi considerada excelente produtora de aspártico protease (média de $P_z = 0,357$) e fraca produtora de fitase (média de $P_z = 0,714 \pm 0,000$). Não foram detectadas atividades de caseinase, fosfolipase, esterase e hemolítica para essa cepa sob as condições experimentais empregadas nesse estudo.

A atividade da catalase foi detectada em todos os isolados de *C. glabrata stricto sensu* estudados, incluindo a cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001. Após a hidrólise do peróxido de hidrogênio, houve produção de muitas bolhas em 32 isolados (35,2%) sendo estes classificados como altos produtores de catalase (coluna de bolhas ≥ 15 mm), enquanto 59 isolados (64,8%) foram classificados como baixos produtores de catalase (coluna de bolhas < 15 mm).

O isolado clínico de *C. nivariensis* também foi avaliado quanto a produção de enzimas hidrolíticas, sendo considerado excelente produtor de aspártico protease (média de $P_z=0,347$), bom produtor de fitase (média de $P_z=0,629$) e alto produtor de catalase (coluna de bolhas ≥ 15 mm). Entretanto, nenhuma atividade enzimática de caseinase, fosfolipase, esterase e hemolisina foram detectadas para esse isolado sob as condições experimentais empregadas nesse estudo.

5.4 Formação de Biofilme

Todos os isolados clínicos foram avaliados quanto à capacidade de formar biofilme. Foram realizadas análises quantitativas em relação à produção de biomassa pelo método de coloração pelo cristal violeta e em relação à viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico de redução do XTT que avalia a atividade metabólica nas células do biofilme. Todos os isolados clínicos foram classificados com base no valor de absorbância em fraca, moderada ou alta produção de biomassa ou de viabilidade celular de acordo com o **Quadro 3**.

A classificação dos isolados de acordo com a produção de biomassa e de viabilidade celular nos meios RPMI 1640 e YNB com 0,2% de glicose foi apresentada na **Tabela 7**.

Tabela 7. Produção de biomassa e viabilidade celular em meio RPMI1640 e YNB suplementado com glicose por isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* e *C. nivariensis*

Espécie (Nº total de isolados)	Classificação	Nº de isolados			
		RPMI 1640		YNB/ Glicose	
		Produção de biomassa Cristal Violeta	Viabilidade celular XTT	Produção de biomassa Cristal Violeta	Viabilidade celular XTT
<i>C. glabrata stricto sensu</i> (91)	baixa	82	07	81	23
	moderada	09	13	10	20
	alta	-	71	-	48
<i>C. nivariensis</i> (1)	baixa	01	-	01	-
	moderada	-	-	-	-
	alta	--	01	-	01

RPMI, meio destinado à cultura de células humanas e de outros animais desenvolvido no *Roswell Park Memorial Institute*; YNB, meio base de nitrogênio para leveduras; XTT, metabólito 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5[(fenil-amino) carbonil]-2H-tetrazólio hidróxido

Em relação ao meio RPMI 1640, os 91 isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* apresentaram valores de absorbância variando de 0,029 a 1,014 para a

produção de biomassa, sendo a maioria dos isolados classificados como baixos produtores de biomassa. Quanto à viabilidade celular, os valores de absorvância variam de 0,064 a 1,512, sendo a viabilidade celular, predominantemente, classificada como alta. O isolado clínico de *C. nivariensis* também foi capaz de produzir biofilme, sendo os valores de absorvância para a produção de biomassa e a viabilidade celular de 0,409 e 0,921, respectivamente, sendo essa espécie classificada como baixa produtora de biomassa, mas com alta atividade metabólica na formação do biofilme.

Utilizando o meio YNB com 0,2% de glicose, os 91 isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* apresentaram valores de absorvância variando de 0,017 a 1,161 para a produção de biomassa e de 0,015 a 0,988 para a viabilidade celular. Enquanto que o valor da absorvância para o isolado clínico de *C. nivariensis* foi de 0,330 para a produção de biomassa e de 1,173 para a viabilidade celular, sendo esse perfil semelhante ao observado no meio RPMI.

Em geral, o mesmo perfil foi observado entre os dois meios: baixa produção de biomassa e alta atividade metabólica. No entanto, a concordância entre os dois meios foi classificada como moderada de acordo com o coeficiente Kappa para produção de biomassa e da viabilidade celular em isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* (0,589 e 0,448, respectivamente). *Candida nivariensis* apresentou o mesmo padrão de produção de biomassa e de viabilidade celular nos dois meios em estudo.

A produção de biomassa e a viabilidade celular no meio RPMI 1640 também foram analisadas de acordo com o sítio de isolamento das amostras (**Figura 11**).

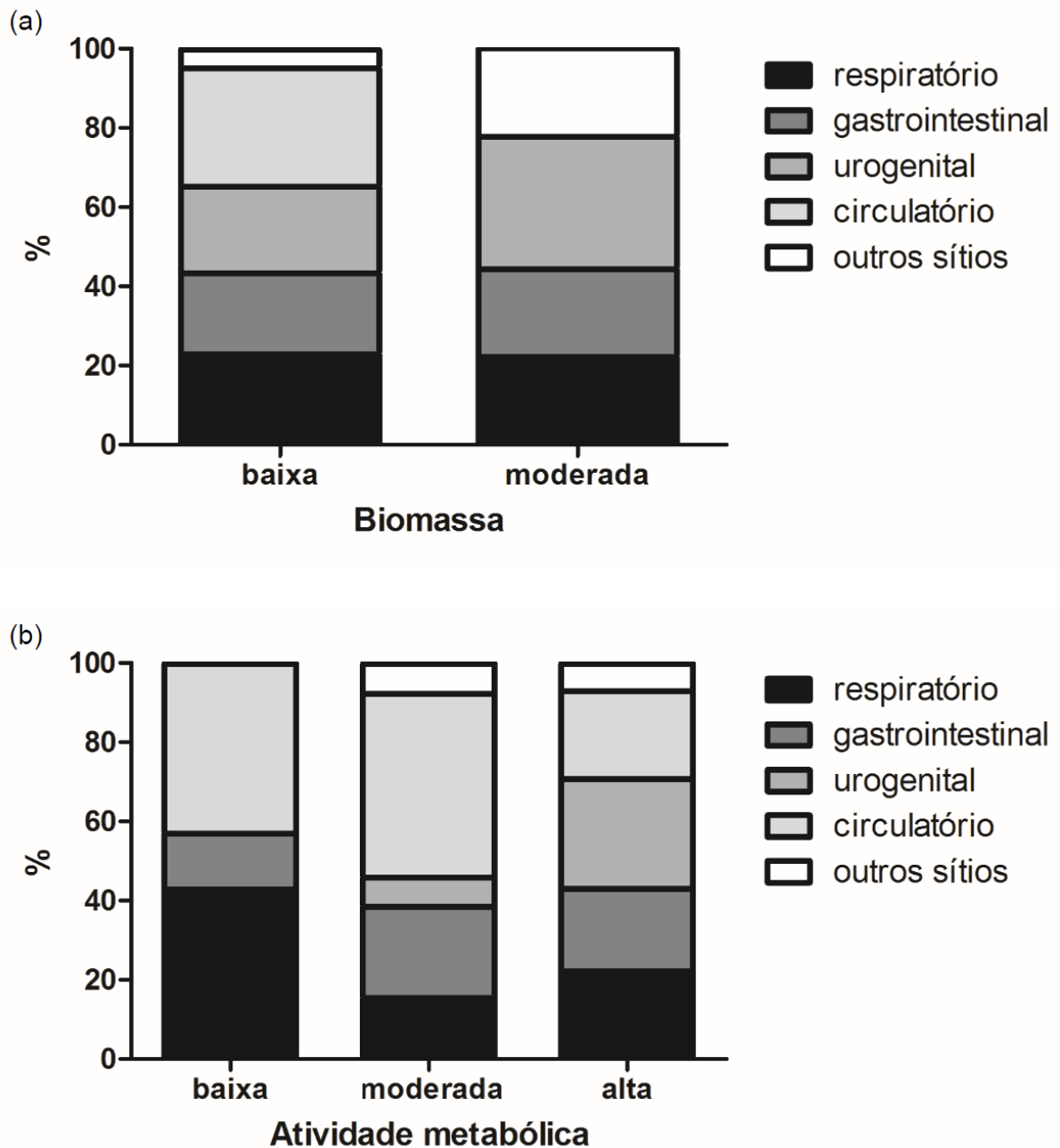


Figura 11. Percentual de isolados do complexo *C. glabrata* separados por sítio de isolamento em relação **(a)** à produção de biomassa e **(b)** à atividade metabólica.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a formação de biofilme e os diferentes sítios de isolamento das amostras em estudo. Mesmo assim, foi possível notar que todos os isolados (N=25) do sítio anatômico circulatório foram classificados como baixos produtores de biomassa. A produção de biomassa foi classificada como moderada apenas em nove isolados, sendo dois isolados de sítio respiratório, dois isolados de sítio gastrointestinal, três isolados de sítio urogenital e dois isolados de sítio de inserção (um de ponta de cateter e outro de dreno cirúrgico).

Quanto à viabilidade celular, a atividade metabólica foi baixa apenas em sete isolados clínicos, sendo três isolados de sítio respiratório, um de gastrointestinal e três de sítio circulatório. Vale ressaltar que dentre os sítios anatômicos, o sítio urogenital foi o que apresentou maior número de isolados de *C. glabrata stricto sensu* produtores de biomassa e com alta atividade metabólica em relação à formação de biofilme. (**Figura 11**).

5.5 Perfil de Suscetibilidade aos Antifúngicos - (Células em Suspensão)

Todos os 92 isolados clínicos incluídos neste estudo foram testados. Os resultados foram validados após utilização em cada ensaio de duas cepas de referência *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 cujos valores estavam dentro da faixa de CIM recomendada pelo protocolo M27-S4 (CLSI, 2012).

O perfil de suscetibilidade antifúngica *in vitro* dos 92 isolados do complexo de espécies de *C. glabrata* está apresentado na **Tabela 8**.

Tabela 8. Perfil de suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* de isolados clínicos do complexo de espécies de *C. glabrata* oriundos de pacientes imunocomprometidos com quadro de candidíase em dois hospitais públicos no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2015 pelo método da microdiluição em caldo (Protocolo M27-A3, CLSI).

Espécies (N° de isolados)	Antifúngicos	CIM (µg/mL)			CLSI Interpretação N° de isolados			ECV Interpretação N° de isolados	
		Variação	CIM ₅₀ / CIM ₉₀	MG	S	SDD/ I	R	WT	non-WT
<i>C. glabrata stricto sensu</i> (91)	ANF B ¹	0,06-8	0,5/ 2	0,61	82	-	09	87	04
	FLC ²	0,5-≥64	16/ 64	11,23	-	77	14	41	50
	ITC ¹	0,016-4	0,25/ 0,5	0,22	31	55	05	89	02
	VRC ³	0,016-4	0,25/ 1	0,19	-	-	-	61	30
	POS ³	0,03-2	0,25/ 1	0,26	-	-	-	87	04
	CAS ²	0,03-2	0,25/ 0,25	0,17	46	37	08	46	45
	MCF ²	0,016-1	0,06/ 0,25	0,08	51	26	14	26	65
	5-FC ¹	0,12	0,12/ 0,12	0,12	91	-	-	91	-
<i>C. nivariensis</i> (1)	ANF B ¹	0,25	-/ -	-	01	-	-	01	-
	FLC ²	≥64	-/ -	-	-	-	01	-	01
	ITC ¹	0,25	-/ -	-	-	01	-	01	-
	VRC ³	0,25	-/ -	-	-	-	-	01	-
	POS ³	2	-/ -	-	-	-	-	-	01
	CAS ²	0,03	-/ -	-	01	-	-	01	-
	MCF ²	0,25	-/ -	-	-	-	01	-	01
	5-FC ¹	0,25	-/ -	-	01	-	-	01	-

CIM, concentração inibitória mínima; ANF B, anfotericina B; FLC, fluconazol; ITC, itraconazol; VRC, voriconazol; POS, posaconazol; CAS, caspofungina; MCF, micafungina; 5-FC, fluorocitosina; MG, média geométrica; S, suscetível; SDD, suscetível dose-dependente; I, Intermediário; R, resistente; WT, tipo selvagem; non-WT, tipo não-selvagem.

¹Pontos de corte estabelecidos pelo protocolo M27-S3 (CLSI, 2008b). Em geral, isolados com CIM >1 µg/mL são considerados resistentes para ANF B.

²Pontos de corte estabelecidos pelo protocolo M27-S4 (CLSI, 2012).

³Não há pontos de corte definidos pelo CLSI.

⁴ECV, valores de *cutoff* epidemiológicos para *Candida glabrata*. Para ANF B WT=CIM ≤2; FLC WT=CIM ≤8; ITC WT=CIM ≤2; VRC WT=CIM ≤0,25; POS WT=CIM ≤1; CAS WT=CIM ≤0,12; MCF WT=CIM ≤0,03; 5-FC WT=CIM ≤0,5.

Suscetibilidade *in vitro* à anfotericina B e 5-fluorocitosina.

Em relação aos isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu*, nove isolados (9.9%) foram considerados resistentes à anfotericina B, sendo que cinco isolados apresentaram CIM igual a 2 µg/mL, um isolado apresentou CIM igual a 4 µg/mL e três isolados apresentaram CIM igual a 8 µg/mL. Para 5-fluorocitosina, todos os isolados foram suscetíveis a esse fármaco (CIM = 0,12 µg/mL). De acordo com os valores de *cutoff* epidemiológicos (ECV), todos os isolados de *C. glabrata stricto sensu* foram tipo selvagem (WT) somente para 5-fluorocitosina (CIM ≤ 0,5 µg/mL). Para anfotericina B, quatro isolados foram classificados como não tipo selvagem (non-WT) (CIM > 2 µg/mL).

O isolado clínico de *C. nivariensis* apresentou baixo valor de CIM para anfotericina B (CIM = 0,25 µg/mL) e foi suscetível a 5-fluorocitosina (CIM = 0,25 µg/mL). Em relação ao ECV, o isolado de *C. nivariensis* foi classificado como WT tanto para anfotericina B quanto para 5-fluorocitosina (**Tabela 8**).

A cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001 foi suscetível à anfotericina B e 5-fluorocitosina (CIM = 0,12 µg/mL para ambos os fármacos) e foi classificada como WT para esses dois fármacos.

Suscetibilidade *in vitro* aos azólicos.

Os isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* apresentaram uma suscetibilidade variável em relação aos azólicos testados. Levando em consideração os pontos de corte clínicos, o fluconazol foi o antifúngico azólico com maior porcentagem de isolados resistentes (15,4%), seguido pelo itraconazol (5,5%). Ainda não foram estabelecidos pontos de corte pelo CLSI para o voriconazol e posaconazol. Analisando os valores de CIMs obtidas em relação ao ECV, o fluconazol foi o antifúngico azólico com maior número de isolados non-WT, seguido pelo voriconazol, posaconazol e itraconazol.

O isolado clínico de *C. nivariensis* foi resistente ao fluconazol e suscetível dose-dependente ao itraconazol. Em relação ao ECV, o isolado de *C. nivariensis* foi classificado como tipo non-WT para fluconazol e posaconazol (**Tabela 8**).

A cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001 foi suscetível dose-dependente ao fluconazol (CIM = 8 µg/mL) e suscetível ao itraconazol (CIM = 0,06 µg/mL). Para o

voriconazol e posaconazol, o valor da CIM foi o mesmo (0,03 µg/ mL). A cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001 foi classificada como WT para os quatro azólicos testados.

Suscetibilidade *in vitro* à caspofungina e micafungina

Em relação aos isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu*, 50,5% dos isolados foram suscetíveis a caspofungina e 56,0% dos isolados foram suscetíveis a micafungina. No entanto, a porcentagem de isolados resistentes foi maior para micafungina (15,4%) em comparação com a caspofungina (8,8%). O número de isolados non-WT também foi maior para micafungina.

O isolado clínico de *C. nivariensis* foi sensível à caspofungina e resistente à micafungina. Em relação ao ECV, o isolado de *C. nivariensis* foi classificado como non-WT somente para micafungina (**Tabela 8**).

A cepa tipo *C. glabrata* ATCC 2001 foi suscetível à caspofungina e micafungina (CIM = 0,12 e 0,06 µg/mL, respectivamente), sendo classificada como WT para caspofungina e non-WT para micafungina.

Resistência a dois ou mais fármacos antifúngicos

Em relação ao total de isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu*, 15 isolados (16,5%) foram classificados como resistentes a dois ou mais fármacos antifúngicos. Dentre os isolados resistentes a ao fluconazol (N=14) e à micafungina (N=14), apenas dois isolados foram resistentes a ambos os fármacos simultaneamente. Já o isolado clínico de *C. nivariensis* foi resistente ao fluconazol e à micafungina (**Tabela 9**).

Tabela 9. Resistência a dois ou mais fármacos antifúngicos em isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* e *C. nivariensis*.

Espécies (Nº de isolados)	Antifúngicos	Nº de Isolados Resistentes	Sítios de Isolamento (Nº de isolados)
<i>C. glabrata stricto sensu</i> (15)	ANF B e FLC	5	Respiratório (2), Circulatório (2), Urogenital (1)
	ANF B, FLC e MCF	1	Gastrointestinal (1)
	FLC e ITC	2	Respiratório (1), Urogenital (1)
	FLC e MCF	2	Circulatório (1), Urogenital (1)
	FLC, ITC, e MCF	1	Urogenital (1)
	ITC e CAS	1	Gastrointestinal (1)
	CAS e MCF	3	Respiratório (1), Urogenital (2)
<i>C. nivariensis</i> (1)	FLC e MCF	1	Respiratório (1)

ANF B, Anfotericina B; FLC, fluconazol; MCF, micafungina; ITC, itraconazol; CAS, caspofungina.

5.6 Perfil de Suscetibilidade aos Antifúngicos (Células no Biofilme)

Para avaliar a possibilidade da formação do biofilme influenciar na resistência aos fármacos antifúngicos, vinte e três isolados de *C. glabrata stricto sensu* e o isolado de *C. nivariensis* foram incluídos na nossa amostragem. Os fármacos testados foram anfotericina B, itraconazol, micafungina e 5-fluorocitosina. Todos os 24 isolados foram classificados como suscetíveis ou intermediários aos fármacos em questão nas células em suspensão, com exceção da *C. nivariensis* cujo valor da CIM para micafungina foi de 0,25 µg/mL.

Em relação a *C. glabrata stricto sensu*, os valores da CIMs para anfotericina B variaram de 0,06 a 1 µg/mL nas células em suspensão e de 1 a >16 µg/mL nas células no biofilme. Apesar do aumento do valor da CIM, seis isolados apresentaram CIMB igual a 1 µg/mL o que sugere suscetibilidade a este fármaco mesmo na presença do biofilme. Para o itraconazol, os valores de CIM variaram de 0,06 a 0,25 µg/mL nas células em suspensão e de 0,5 a >16 µg/mL nas células no biofilme. Houve um aumento do valor da CIMB, com exceção de um isolado que permaneceu com o mesmo valor da CIM (0,25 µg/mL) nas células em suspensão e no biofilme, sendo classificado como suscetível dose-dependente nas duas condições. Para a micafungina, os valores de CIM variaram de 0,015 a 0,12 µg/mL nas células em suspensão e de 0,06 a 0,5 µg/mL nas células no biofilme. Apesar do aumento do valor da CIMB, três isolados foram suscetíveis para a micafungina no biofilme, sendo que dois destes também foram suscetíveis para anfotericina B na presença do biofilme. Outros seis isolados foram classificados como intermediários para micafungina. Para

a 5-fluorocitosina, todos os isolados apresentaram o mesmo valor da CIM (0,12 $\mu\text{g/mL}$) nas células em suspensão enquanto que o valor da CIM variou de 8 a 128 $\mu\text{g/mL}$ nas células no biofilme.

Em relação à *C. nivariensis*, o valor da CIM foi de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ nas células em suspensão e de 8 $\mu\text{g/mL}$ nas células no biofilme para a anfotericina B. Para o itraconazol, o valor da CIM passou de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ nas células em suspensão para > 16 $\mu\text{g/mL}$ nas células no biofilme. Por outro lado, o valor da CIM da micafungina foi o mesmo (CIM = 0,25 $\mu\text{g/mL}$), tanto para as células em suspensão quanto no biofilme. Enquanto que para a 5-fluorocitosina, o valor da CIM nas células em suspensão e no biofilme foi de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e >128 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

A variação da concentração inibitória mínima dos fármacos antifúngicos testados em isolados clínicos do complexo *C. glabrata* nas células em suspensão e no biofilme foram apresentados na **Figura 12**.

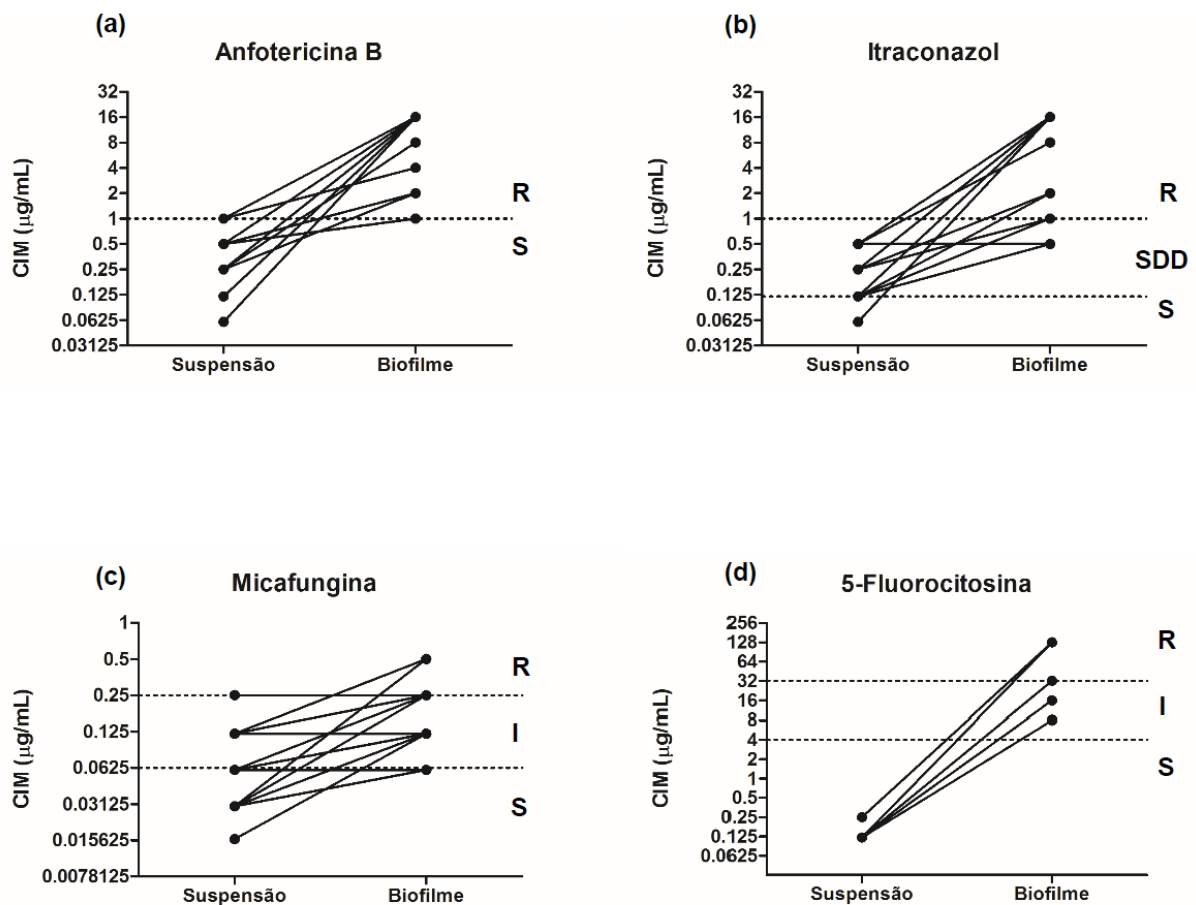


Figura 12. Variação da concentração inibitória mínima (CIM) em isolados clínicos do complexo *C. glabrata*. **(a)** Anfotericina B; **(b)** Itraconazol; **(c)** Micafungina; **(d)** 5-fluorocitosina, nas células em suspensão e no biofilme. Os isolados foram classificados como suscetível (S), suscetível dose-dependente (SDD), intermediário (I) ou resistente (R).

5.7 Relação entre o Perfil de Suscetibilidade aos Antifúngicos (Células em Suspensão) e a Produção de Enzimas Hidrolíticas

Conforme apresentado na **Tabela 10**, em relação aos isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu*, nenhuma associação foi detectada entre o perfil de suscetibilidade (suscetíveis e resistentes) a anfoterina B e a produção de diferentes enzimas hidrolíticas (p -valor $> 0,05$). Entretanto, associações estatisticamente significantes, foram detectadas entre o perfil de suscetibilidade a micafungina e a produção de esterase, bem como entre o perfil de suscetibilidade ao fluconazol, itraconazol e micafungina e a atividade hemolítica.

Tabela 10. Relação entre o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos e a produção de diferentes enzimas hidrolíticas em isolados clínicos de *Candida glabrata stricto sensu*.

Antifúngicos	Enzimas Hidrolíticas (p -valor*)				
	Aspártico protease	Esterase	Fitase	Hemolisina	Catalase
Anfotericina B	0,6990	0,8071	0,0743	0,2200	0,0905
Fluconazol	0,5736	0,3383	0,6201	0,0352	0,9603
Itraconazol	0,4347	0,5216	0,3371	0,0382	0,6308
Micafungina	0,1188	0,0023	0,6865	0,0002	0,3787

* p -valor $\leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Além disso, a mediana de P_z da atividade hemolítica foi menor para os isolados resistentes ao fluconazol, itraconazol e micafungina, o que significa que os isolados resistentes produzem mais hemolisinas que os isolados suscetíveis a esses fármacos. Em contraste, a mediana de P_z da esterase foi maior para os isolados resistentes a micafungina, o que significa que os isolados resistentes para esse fármaco produziram menos esterases que os isolados suscetíveis (**FIGURA 13**).

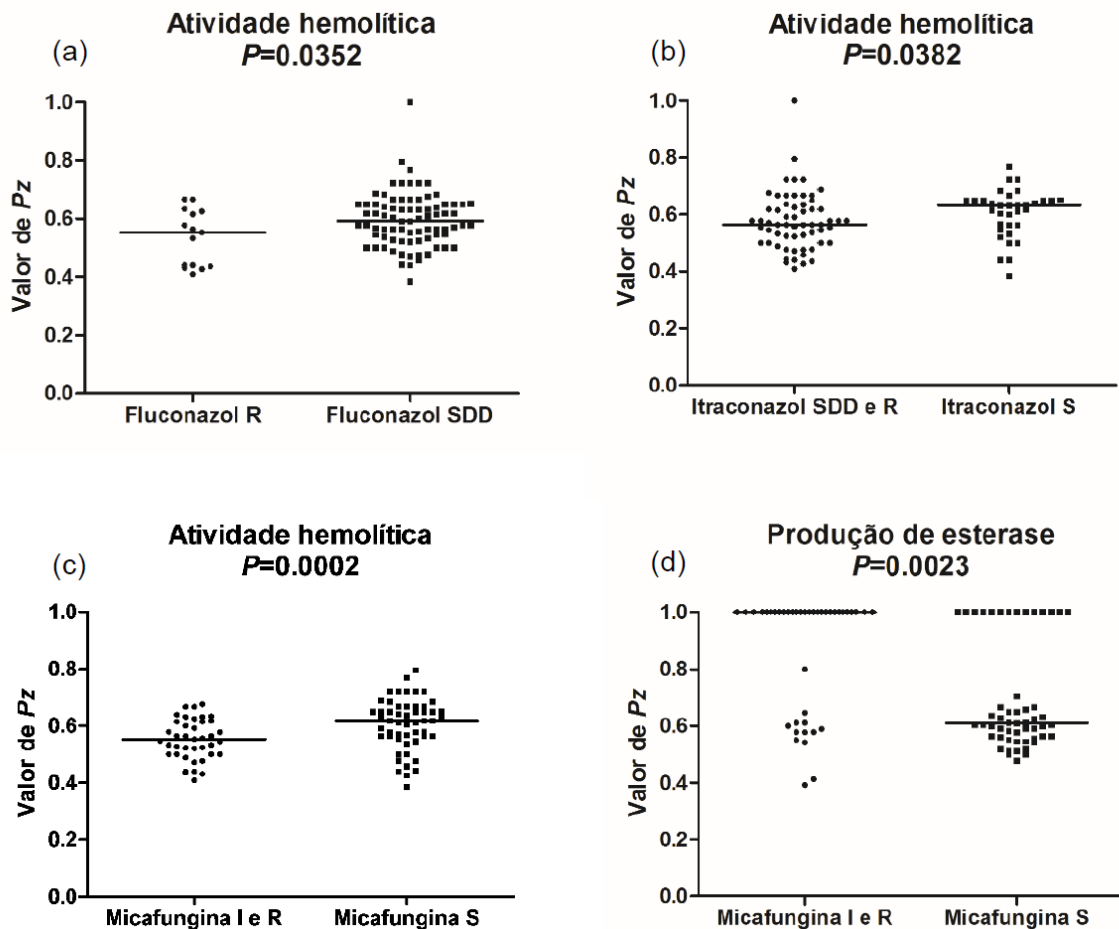


Figura 13. Expressão diferencial de enzimas hidrolíticas em 91 isolados de *C. glabrata stricto sensu* com diferentes perfis de suscetibilidade aos antifúngicos **(a)** atividade hemolítica em relação a suscetibilidade ao fluconazol; **(b)** atividade hemolítica em relação a suscetibilidade ao itraconazol; **(c)** atividade hemolítica em relação a suscetibilidade à micafungina; **(d)** produção de esterase em relação a suscetibilidade a micafungina. As linhas representam as medianas de cada grupo. Em todos os casos, diferenças entre as medianas dos grupos com diferentes perfis de suscetibilidade foram estatisticamente significativas (p -valor $\leq 0,05$).

A correlação de Spearman revelou associações significativas entre produção de fitase e a CIM da anfotericina B; entre a produção de hemolisina e a CIM do fluconazol e entre a produção de hemolisina e a CIM da micafungina, sendo observada uma correlação negativa fraca para todos de acordo com análise de Spearman (r_s). Enquanto que uma correlação positiva moderada foi observada entre os valores de P_z da esterase e a CIM da micafungina (**Tabela 11**).

Tabela 11. Correlação entre a produção de cinco enzimas relacionadas à virulência e as concentrações inibitórias mínimas de quatro fármacos antifúngicos em 91 isolados clínicos de *Candida glabrata stricto sensu*.

Antifúngicos	Enzimas Hidrolíticas, <i>p</i> -valor* (<i>r_s</i>)				
	Aspártico Protease	Esterase	Fitase	Hemolisina	Catalase
Anfotericina B	0,7409 (0,04)	0,3865 (0,09)	0,0353 (-0,22)	0,1771 (-0,14)	0,2567 (0,12)
Fluconazol	0,7230 (-0,04)	0,1493 (0,15)	0,0910 (-0,18)	0,0040 (-0,30)	0,4128 (-0,09)
Itraconazol	0,6495 (0,05)	0,4667 (0,08)	0,3749 (0,09)	0,1418 (-0,15)	0,8592 (-0,02)
Micafungina	0,0559 (-0,20)	0,0001 (0,40)	0,3768 (-0,09)	0,0034 (-0,30)	0,0922 (-0,18)

**p*-valor < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos; *r_s*, coeficiente de Spearman

5.8 Relação entre a Produção de Enzimas Hidrolíticas e a Formação de Biofilme em Isolados Clínicos de *C. glabrata stricto sensu*

Em relação aos isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu*, nenhuma associação foi detectada entre a produção de aspártico protease, fitase e catalase e a formação de biofilme (*p*-valor > 0,05). Entretanto, associações estatisticamente significativas foram observadas entre a produção de esterase e a formação de biofilme, bem como entre a atividade hemolítica e a formação de biofilme, tanto em relação à produção de biomassa quanto em relação à viabilidade celular. Porém, o tipo de correlação variou, sendo negativa para esterase e positiva para a hemolisina de acordo com o coeficiente *r* de Spearman (**Tabela 12**). Logo, quanto maior a produção da esterase, maior foi a capacidade de formação de biofilme. Por outro lado, a produção de hemolisina diminuiu à medida que aumentava a capacidade de formação de biofilme nos isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu*.

Tabela 12. Relação entre a produção de diferentes enzimas hidrolíticas e a formação de biofilme em isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu*.

Biofilme	Enzimas Hidrolíticas <i>p</i> -valor* (<i>r_s</i>)				
	Aspártico protease	Esterase	Fitase	Hemolisina	Catalase
Produção de biomassa	0,1524 (0,15)	0,0470 (-0,21)	0,7957 (0,03)	0,0183 (0,25)	0,3026 (0,11)
Viabilidade celular	0,1505 (0,15)	<0,0001/ (-0,40)	0,2786 (0,11)	0,0038 (0,30)	0,2001 (0,13)

**p*-valor ≤ 0,05 foram considerados estatisticamente significativos; *r_s*, coeficiente de Spearman.

5.9 Outras Correlações

Neste estudo, nenhuma associação foi encontrada entre o perfil de enzimas hidrolíticas relacionadas à virulência e a origem clínica ou o ano de isolamento dessas leveduras, sendo o mesmo observado em relação ao biofilme e a origem ou ano de isolamento (*p*-valor > 0,05).

Também não foi detectada nenhuma relação entre a resistência dos isolados clínicos estudados e a origem clínica ou o ano de isolamento dessas amostras para nenhum dos fármacos antifúngicos testados (*p*-valor > 0,05).

6 DISCUSSÃO

Dentro do gênero *Candida*, *C. glabrata* se destaca como agente de infecções fúngicas invasivas, especialmente em pacientes idosos com câncer internados em unidades de terapia intensiva e naqueles com exposição prévia ao fluconazol (YAPAR, 2014), sendo a espécie de *Candida* não-*albicans* mais isolada em alguns países da América do Norte (PFALLER et al., 2014), Europa (BASSETTI et al., 2017; SASSO; ROGER; LACHAUD, 2017; TROUVÉ et al., 2017), e no Chile, país da América do Sul (SIRI et al., 2017). Nos hospitais brasileiros, *C. glabrata* vêm emergindo como um patógeno fúngico oportunista entre as espécies de *Candida* não-*albicans* (COLOMBO et al., 2013; WILLE et al., 2013; DOI et al., 2016). Os resultados desse estudo corroboram estes dados apresentando grande número de isolados de *C. glabrata* em pacientes oncológicos. De fato, pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles portadores de doenças graves como neoplasias, síndrome da imunodeficiência adquirida, assim como pacientes submetidos à terapia imunossupressora, relacionada ou não a transplante de órgãos ou de medula óssea são altamente suscetíveis a infecções fúngicas invasivas por *Candida* spp. (BROWN et al., 2012).

Com o advento das metodologias baseadas em DNA, principalmente as que envolvem a PCR, tem sido identificados diferentes complexos de espécies relacionadas ao gênero *Candida*, como por exemplo, os complexos *C. parapsilosis* (TAVANTI et al., 2005), *C. guilliermondii* (BAI; LIANG; JIA, 2000; LAN; XU, 2006), *C. haemulonii* (CENDEJAS-BUENO et al., 2012), *C. rugosa* (PAREDES et al., 2012; CHAVES et al., 2013) e o complexo *C. glabrata* (ALCOBA-FLOREZ et al., 2005a, 2005b; CORREIA et al., 2006) formado por três espécies geneticamente heterogêneas: *C. glabrata*, *C. nivariensis* e *C. bracarensis*.

Métodos fenotípicos não são discriminatórios para diferenciar as espécies do complexo *C. glabrata* (ALCOBA-FLOREZ et al., 2005b). Entretanto, baseado na visualização da cor das colônias no meio CHROMAGAR *Candida* foi possível separar os isolados em dois grupos no presente estudo, onde a grande maioria dos isolados apresentavam colônias de cor cobre e um único isolado apresentou colônias de cor branca. *Candida nivariensis* e *C. bracarensis* apresentam colônias de cor branca no meio CHROMagar *Candida* em contraste com colônias de cor cobre de *C. glabrata* (LOCKHART et al., 2009; SWOBODA-KOPEĆ et al., 2014; TAY et al., 2014). Por outro

lado, o sistema automatizado Vitek[®] 2 identificou todos os isolados deste estudo como *C. glabrata*, corroborando resultados de estudos anteriores (ALCOBA-FLOREZ et al., 2005b; LOCKHART et al., 2009; HOU et al., 2017b). Porém, analisando os perfis bioquímicos gerados pelo Vitek[®] 2 de todos os nossos isolados clínicos foi possível observar um perfil bioquímico exclusivo para *C. nivariensis*, mas devido ao baixo número amostral desta espécie em nosso estudo não foi possível afirmar que com base na identificação bioquímica seja possível diferenciar *C. glabrata* de *C. nivariensis*.

A PCR seguida pelo sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 foi utilizada como padrão ouro para a identificação molecular das espécies do complexo *C. glabrata* neste estudo. A região ITS, por ser altamente conservada, intraespecificamente, mas variável entre diferentes espécies, tem se mostrado eficaz para a identificação molecular de leveduras de importância médica (IRINYI et al., 2015) e vem sendo utilizada para caracterizar as espécies dentro do complexo *C. glabrata* (ALCOBA-FLOREZ et al., 2005a; ROMEO et al., 2009).

Dos 92 isolados clínicos caracterizados molecularmente, *C. glabrata stricto sensu* foi a espécie predominante seguida de *C. nivariensis*. A frequência observada em nosso estudo dessas espécies foi similar em outros trabalhos envolvendo a caracterização do complexo *C. glabrata* (SWOBODA-KOPEĆ et al., 2014; TAY et al., 2014; MORALES-LÓPEZ et al., 2016).

De acordo com dados da literatura até agosto de 2017, a frequência de isolamento de *C. nivariensis* tem sido baixa. Ao todo 75 isolados de *C. nivariensis* têm sido descritos em 41 casos na Europa (ALCOBA-FLOREZ et al., 2005a; BORMAN et al., 2008; GORTON et al., 2013; LÓPEZ-SORIA et al., 2013; PARMELAND et al., 2013; SWOBODA-KOPEĆ et al., 2014; AZNAR-MARIN et al., 2016), 31 casos na Ásia (FUJITA et al., 2007; WAHYUNINGSIH et al., 2008; CHOWDHARY et al., 2010; SHARMA et al., 2013; LI et al., 2014; TAY et al., 2014; FENG et al., 2015; HOU et al., 2017b), um caso na Austrália (LOCKHART et al., 2009) e dois casos na América do Sul, um no Brasil (presente estudo) (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2016) e o outro na Argentina (MORALES-LÓPEZ et al., 2016). Nenhuma *C. bracarensis* foi encontrada em nosso estudo e ainda não há nenhum relato dessa espécie no Brasil ou em outros países da América do Sul até agosto de 2017 de acordo com as principais bases de dados para pesquisa de artigos científicos como PubMed, Bireme e Scielo.

Para o nosso conhecimento, esse estudo descreveu pela primeira vez a presença de *C. nivariensis* na América do Sul e no Brasil (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2016) (**APÊNDICE A**). *Candida nivariensis* já foi isolada de diferentes espécimes clínicos como: sangue, lavado bronco-alveolar, urina, cateter, escarro, biópsia de pulmão, fluido pleural, swab vaginal, unha, entre outros (ALCOBA-FLOREZ et al., 2005b; FUJITA et al., 2007; BORMAN et al., 2008; WAHYUNINGSIH et al., 2008; LOCKHART et al., 2009; CHOWDHARY et al., 2010; GORTON et al., 2013; LÓPEZ-SORIA et al., 2013; PARMELAND et al., 2013; SHARMA et al., 2013; LI et al., 2014; SWOBODA-KOPEĆ et al., 2014; TAY et al., 2014; FENG et al., 2015; AZNAR-MARIN et al., 2016; MORALES-LÓPEZ et al., 2016), mas até o presente estudo não havia sido isolada de uma secreção nasal (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2016).

Nós reforçamos a necessidade de novas ferramentas de diagnóstico para a identificação rápida e correta do complexo *C. glabrata*, visto que este número pode estar subestimado por conta da dificuldade de realização de sequenciamento de DNA em laboratórios clínicos.

Em espécies de *Candida*, as enzimas hidrolíticas extracelulares facilitam a nutrição, aderência, colonização, penetração de tecidos ou células, invasão, disseminação e escape das respostas imunes do hospedeiro (SARDI et al., 2013; ELLS et al., 2014). Além disso, a secreção de algumas enzimas hidrolíticas tem a capacidade de regular a resistência a determinados fármacos antifúngicos (SILVA; NERY; DIAS, 2014).

As aspártico proteases são enzimas com alta atividade proteolítica e estabilidade em pH ácido (RAO et al., 1998). Essas enzimas controlam vários passos na evasão imune inata e degradam proteínas relacionadas à defesa imunológica, como anticorpos, complemento e citocinas, permitindo que o fungo escape da primeira linha de defesas do hospedeiro (STANISZEWSKA; MAŁGORZATA; ZBIGNIEW, 2016).

Em nosso estudo, a maioria dos isolados de *C. glabrata stricto sensu* foi classificada como boa produtora de aspártico protease, enquanto *C. nivariensis* foi uma excelente produtora desta enzima. Entretanto, *C. glabrata* não possui os genes clássicos de aspártico proteases secretadas (*SAP*) em seu genoma (PARRA-ORTEGA et al., 2009; SILVA; NERY; DIAS, 2014). Provavelmente, a degradação enzimática da albumina verificada neste estudo deve ser relacionada à produção de yapsinas. As yapsinas (YPS) são uma família de cinco aspártico proteases ligadas a

glicosil-fosfatidil-inositol não segregadas que têm um papel bem conhecido na integridade da parede celular (KRYSAN et al., 2005) e nas interações célula-célula (SILVA; NERY; DIAS, 2014). A expressão dos genes *yps* aumentou significativamente a capacidade de *Saccharomyces cerevisiae* sobreviver dentro de macrófagos humanos (KRYSAN et al., 2005). Um estudo desenvolvido por Swoboda-Kopeć e colaboradores confirmou a prevalência de três genes (*YPS2*, *YPS4* e *YPS6*) na maioria das cepas de *C. glabrata* isoladas de espécimes clínicos. Entretanto, a prevalência desses genes em 13 isolados clínicos de *C. nivariensis* foi baixa (SWOBODA-KOPEĆ et al., 2014).

A caseína é uma mistura de fosfoproteínas que podem ser hidrolisadas por uma série de enzimas coletivamente chamadas caseinases. Essas enzimas pertencem mais provavelmente às famílias metaloprotease e serina protease (CLINCKE et al., 2011). A atividade de caseinase não foi detectada nas condições experimentais empregadas para qualquer um dos isolados de *C. glabrata stricto sensu* e *C. nivariensis*. No entanto, estes resultados foram discordantes daqueles encontrados por Abbes e colaboradores (2017) que relataram a atividade da caseinase em 16 isolados de *C. glabrata* (ABBES et al., 2017). A atividade de caseinase também foi observada em *C. parapsilosis Stricto Sensu* (ZICCARDI et al., 2015), nas espécies do complexo *Candida haemulonii* (RAMOS; BRANQUINHA; SANTOS, 2017) e *Yarrowia lipolytica* (ABBES et al., 2017). Por outro lado, Parnanen e colaboradores identificaram uma serina protease em *C. glabrata* ligada à parede celular fúngica, mas seu papel na virulência de *C. glabrata* permanece incerto (PÄRNÄNEN; MEURMAN; NIKULA-IJÄS, 2015).

As fosfolipases e as esterases são enzimas lipolíticas extracelulares envolvidas na virulência de *Candida* spp. (ZICCARDI et al., 2015; RAMOS; BRANQUINHA; SANTOS, 2017). Suas possíveis funções incluem a digestão de lipídios para aquisição de nutrientes, adesão a células e tecidos do hospedeiro, interações sinérgicas com outras enzimas, hidrólise não específica, iniciação de processos inflamatórios por afetar as células do sistema imunológico e autodefesa (SCHALLER et al., 2005).

Neste trabalho, nenhum dos isolados de *C. glabrata stricto sensu* apresentou níveis detectáveis de fosfolipase. O mesmo foi observado em *C. nivariensis*. Udayalaxmi e colaboradores também não encontraram atividade de fosfolipase em 14 cepas clínicas de *C. glabrata* isoladas do trato geniturinário (UDAYALAXMI; JACOB; D'SOUZA, 2014). Um estudo do Brasil que analisou cepas de *C. glabrata*, detectou a

atividade da fosfolipase pela metodologia empregada neste estudo somente em uma cepa de *C. glabrata* isolada da saída do ducto nasolacrimal de um cavalo (BRILHANTE et al., 2016). Em uma pesquisa realizada com isolados vaginais de *Candida* spp. do Egito, a atividade da fosfolipase foi observada em um pequeno número de cepas de *C. glabrata*, confirmando a baixa produção de fosfolipase em *C. glabrata*, especialmente em isolados de espécimes clínicos humanos. Este mesmo estudo também detectou o gene da fosfolipase B *PB2* em algumas cepas de *C. glabrata* estudadas. Por outro lado, a incidência do gene da fosfolipase B *PB1* na população de *Candida glabrata* estudada foi alta, variando de 87,5% a 95%, dependendo do histórico do paciente para diabetes (BASSYOUNI et al., 2015). Juntos, estes dados sugerem que a expressão *in vivo* de genes da fosfolipase em *C. glabrata* é um evento bem regulado, ao contrário do que ocorre em condições *in vitro*.

A atividade de esterase não foi detectada no isolado clínico de *C. nivariensis*. Além disso, a produção de esterase foi o fenótipo relacionado à virulência com maior variação entre os isolados de *C. glabrata stricto sensu*. Em um estudo no Irã com oito cepas de *C. glabrata* isoladas de mucosa oral, a produção de esterase apresentou menor variação do que o presente trabalho, com a maioria das cepas classificadas como produtoras de esterase (FATAHINIA; POORMOHAMADI; ZAREI MAHMOUDABADI, 2015). Por outro lado, um estudo da Turquia revelou que apenas uma dentre 14 cepas de *C. glabrata* isoladas de infecções de corrente sanguínea foi considerada positiva no ensaio de ágar esterase. Uma possibilidade que explicaria as diferenças entre esses trabalhos seria relacionada com a fonte do material clínico a partir do qual as cepas foram isoladas, porém como não verificamos associação entre a produção de esterase e a origem do material clínico, nós acreditamos que esses dados na verdade refletem uma heterogeneidade intraespecífica na produção de esterase em *C. glabrata*.

A fitase é uma fosfohidrolase que cliva o fitato liberando fosfato inorgânico e inositol, dois nutrientes essenciais para todas as células vivas (LEI; PORRES, 2003). Neste estudo, a atividade da fitase foi detectada em todos os isolados de *C. glabrata stricto sensu* e no isolado de *C. nivariensis*. Resultados semelhantes foram relatados em diferentes *Candida* spp., incluindo *C. glabrata* (TSANG, 2011), espécies do complexo *C. parapsilosis* (ABI-CHACRA et al., 2013; ZICCARDI et al., 2015) e do complexo *C. haemulonii* (RAMOS; BRANQUINHA; SANTOS, 2017). Em *Candida* spp., a manutenção de um suprimento de inositol e fosfato mediado pela fitase parece

ser especialmente importante para a sobrevivência e persistência do patógeno no hospedeiro (TSANG, 2011).

A captação de ferro é um dos requisitos fundamentais para que fungos patogênicos sobrevivam e cresçam em seus hospedeiros. Portanto, sua sobrevivência depende de mecanismos especializados para se adaptar às restrições de micronutrientes durante a patogênese. Em geral, durante o parasitismo animal, os fungos têm que lisar os glóbulos vermelhos para assimilar o ferro associado à hemoglobina (CRAWFORD; WILSON, 2015). Apenas um dos isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* deste estudo e a cepa tipo não foram capazes de produzir hemolisinas, resultados similares aos de publicações anteriores (SENEVIRATNE et al., 2011; CHIN et al., 2013; ROSSONI et al., 2013), o que reflete a importância deste fator de virulência para esta levedura. De fato, os mecanismos de captação do ferro têm sido demonstrados como necessários para a virulência em *C. glabrata* (SRIVASTAVA; SUNEETHA; KAUR, 2014).

A catalase foi expressa por todos os isolados de *C. glabrata stricto sensu*. O mesmo foi observado no isolado de *C. nivariensis* neste estudo. Não há outros estudos em *C. nivariensis*. Porém há relatos de resistência ao estresse oxidativo associada a alta atividade da catalase em *C. glabrata* (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2008; ABEGG et al., 2010). Outras espécies como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. guilhiermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis* (ABEGG et al., 2010), *C. parapsilosis Stricto Sensu* e *C. orthopsilosis* (ABI-CHACRA et al., 2013) também foram capazes de expressar atividade de catalase. *Candida glabrata* possui mecanismos enzimáticos e de glutathione para resistir ao estresse oxidativo induzido pelas defesas imunológicas do hospedeiro (BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO et al., 2014) e nossos resultados reforçam a importância dos mecanismos enzimáticos para manter a homeostase celular nos isolados clínicos de *C. glabrata*.

A formação de biofilme está intimamente associada à persistência do microrganismo no processo infeccioso e deve ser considerada como um fator de virulência importante durante a candidíase, principalmente, em relação à candidemia (TUMBARELLO et al., 2012; DE MELLO et al., 2017), pois pode conferir resistência significativa à terapia antifúngica, limitando a penetração dessas substâncias através da matriz extracelular e protegendo as células do interior do biofilme do sistema imune do hospedeiro (BERILA; HYROŠŠOVÁ; SUBÍK, 2011; RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014).

Todos os isolados deste estudo foram capazes de formar biofilme tanto no meio RPMI 1640 quanto no YNB com 0,2% de glicose, porém com uma correlação moderada entre os meios, sugerindo que o meio de cultura utilizado pode influenciar na formação do biofilme de *C. glabrata*. Um estudo desenvolvido por Serrano-Fujarte e colaboradores (2015) verificou que a formação de biofilme de *C. glabrata* foi influenciada pela utilização de meios de culturas (YP ou YNB) com diferentes concentrações de glicose (SERRANO-FUJARTE et al., 2015). A produção de biomassa foi baixa na maioria dos nossos isolados de *C. glabrata stricto sensu* e em *C. nivariensis*, enquanto que a atividade metabólica das células no biofilme foi predominante alta em ambas as espécies nas duas condições experimentais adotadas. Nossos resultados corroboram com os achados de alta atividade metabólica em células de *C. glabrata* formando biofilme (FERREIRA et al., 2013), embora sejam divergentes em relação à produção de biomassa. Por outro lado, um estudo conduzido por Marcos-Zambrano e colaboradores (2014) verificou resultados similares em relação à produção de biomassa e à atividade metabólica no biofilme de isolados clínicos de *C. glabrata* (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014). Este padrão de baixa biomassa e alta atividade metabólica observado na formação de biofilme em *C. glabrata* foi contrário ao descrito em outras espécies de *Candida* como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (ABI-CHACRA et al., 2013; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014; ZICCARDI et al., 2015).

Relações significativas foram encontradas entre a produção de enzimas hidrolíticas, tais como esterase e hemolisina, e a formação de biofilme neste estudo. Para o nosso conhecimento, não há dados na literatura associando produção de enzimas hidrolíticas à formação de biofilme em *C. glabrata*. Porém, um estudo conduzido por Rajendran e colaboradores (2010) observou uma relação significativa entre a formação de biofilme e a secreção de enzimas hidrolíticas envolvidas na lise de proteínas em amostras de *C. albicans* isoladas de pacientes diabéticos, porém nenhuma correlação foi observada em relação à fosfolipase e hemolisina (RAJENDRAN et al., 2010). Estes resultados não foram observados em *C. glabrata* (presente estudo), sugerindo que a haja uma variação entre as espécies com relação à produção de enzimas hidrolíticas e a formação de biofilme. Mais estudos são necessários para comprovar esta hipótese e conhecer mais sobre o envolvimento da esterase na formação do biofilme em *C. glabrata*.

Correlacionando a produção de hemolisinas com a formação do biofilme, uma diminuição da produção de hemolisinas foi observada à medida que aumentava a formação de biofilme, sugerindo que outras estratégias para captação de ferro possam estar sendo utilizadas por *C. glabrata* durante a formação de biofilme onde, provavelmente, aumenta a escassez desse micronutriente. Um estudo desenvolvido por Gervier e colaboradores (2017), investigou estratégias de aquisição de ferro por *C. glabrata* e constatou que difere de outros fungos patogênicos como *C. albicans*, na medida em que depende de um conjunto limitado de fontes de ferro do hospedeiro e que não foi detectada a atividade da redutase férrica presente na superfície celular. Entretanto, uma redução férrica extracelular foi observada em *C. glabrata* o que, possivelmente, compensa a perda da atividade da redutase férrica de superfície que está envolvida no mecanismo de aquisição de ferro de alta afinidade (GERWIEN et al., 2017).

Embora os antifúngicos para o tratamento das micoses invasivas possuam um amplo espectro de ação, nem todas as infecções fúngicas podem ser tratadas da mesma forma (PAPPAS et al., 2016). Algumas espécies de leveduras podem apresentar resistência intrínseca ou adquirida a determinados fármacos antifúngicos. Por isso, a identificação da espécie e os estudos de suscetibilidade antifúngica são importantes para a prática clínica (PAPPAS et al., 2016).

Entre os agentes antifúngicos utilizados no manejo da candidíase destacam-se a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol, equinocandinas e 5-fluorocitosina (PAPPAS et al., 2016). Infelizmente, apenas o fluconazol e as equinocandinas têm “novos” pontos de cortes clínicos descritos pelo CLSI para *C. glabrata* (CLSI, 2012). Embora não tenham sido sugeridos pontos de corte para a anfotericina B, o documento do CLSI indica que os valores de CIM > 1 µg/mL são sugestivos de resistência para este fármaco (CLSI, 2008). Os pontos de corte clínicos para caspofungina e *C. glabrata* foram descritos, entretanto, alguns estudos têm apontado que o teste de microdiluição de caldo não é adequado para a determinação de CIM de caspofungina, uma vez que as diferenças interlaboratoriais inexplicáveis são muito comuns para esta droga (ARENDRUP; PERLIN, 2014; BEN-AMI et al., 2014; PERLIN, 2014). Por isso, a micafungina foi escolhida para verificar se os atributos de virulência regulam a resistência às equinocandinas, uma vez que este fármaco não levanta os mesmos problemas observados durante a determinação *in vitro* de CIM da caspofungina (PERLIN, 2014). No nosso trabalho, isolados de *C.*

glabrata stricto sensu resistentes a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, caspofungina ou micafungina foram encontrados. Resultados semelhantes têm sido descritos por outros autores na China (LIU et al., 2014), na Itália (MONTAGNA et al., 2015), no Irã (AMIRRAJAB et al., 2016) e em um estudo global desenvolvido durante o programa de vigilância de antifúngicos sentinela 2014 (PFALLER et al., 2017). Entretanto, estudos prévios desenvolvidos no Peru (RODRIGUEZ et al., 2017) e no Brasil (ALMEIDA et al., 2013; DOI et al., 2016; FORNARI et al., 2016) com um número reduzido de isolados de *C. glabrata* (N=15, N=3, N=11 e N=10, respectivamente) não encontraram cepas CIM > 1 µg/mL para anfotericina B e os fármacos caspofungina e micafungina não foram testados.

Entretanto, alguns isolados de *C. glabrata stricto sensu* foram resistentes tanto ao fluconazol quanto a micafungina. Resultados significativos também foram encontrados em outros estudos mostrando que os isolados de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol também foram resistentes a uma ou mais equinocandinas (PFALLER et al., 2012a; ALEXANDER et al., 2013; HOU et al., 2017b). A resistência às equinocandinas aumentou de 4,9% para 12,3% entre 2001 e 2010 (ALEXANDER et al., 2013) e parece estar associada à prolongada terapia com esses fármacos, bem como à presença de mutações no gene *FKS* (SHIELDS et al., 2012; ALEXANDER et al., 2013), enquanto a resistência ao azólico fluconazol aumentou de 18% para 30% no mesmo período (ALEXANDER et al., 2013) e pode ser o resultado de uma alteração da enzima alvo de lanosterol 14 α -desmetilase, seja pela super expressão da enzima ou por mutações no seu gene codificante conhecido como *ERG11* (HENRY; NICKELS; EDLIND, 2000) ou pela super expressão de bombas de efluxo mediada pela ativação de transportadores ABC ou MFS (SANGLARD et al., 1995; CHEN et al., 2007; PAUL; MOYE-ROWLEY, 2014). A resistência a multidrogas como a anfotericina B, aos azólicos e às equinocandinas tem sido descrita, principalmente, em *C. glabrata* e, mais recentemente, em *C. auris* (ARENDRUP; PATTERSON, 2017) e o nosso resultado corrobora com esse achado em relação a *C. glabrata*. Vale ressaltar ainda a resistência cruzada entre os azólicos em alguns dos nossos isolados de *C. glabrata stricto sensu*, fato também descrito em outros trabalhos (LIU et al., 2014; XIAO et al., 2015).

Neste estudo, a 5-fluorocitosina demonstrou maior atividade antifúngica *in vitro* frente aos isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* e *C. nivariensis* em relação aos demais fármacos testados, corroborando com outro estudo também desenvolvido

no Brasil, em um hospital público do Maranhão, onde todos os isolados de *C. glabrata* (N=4) foram suscetíveis a 5-fluorocitosina. O mesmo perfil de suscetibilidade também foi encontrado em 12 isolados de *C. nivariensis* oriundo de 10 hospitais na China (HOU et al., 2017b). Possivelmente, a suscetibilidade de todos nossos isolados frente a 5-fluorocitosina seja decorrente do fato de que este antifúngico não esteja disponível para uso imediato nos hospitais brasileiros, resultando em uma falta de exposição prévia dos isolados incluídos neste estudo a 5-fluorocitosina (COSTA et al., 2015). Na prática clínica, este fármaco é habitualmente administrado em combinação com outro agente antifúngico devido à alta taxa de emergência de resistência durante a monoterapia para candidíase (PAPPAS et al., 2016).

Em um estudo conduzido por Borman e colaboradores, 16 isolados de *C. nivariensis* foram testados para sete antifúngicos, incluindo posaconazol e itraconazol. Estes isolados apresentaram valores elevados de CIM (2 e > 16 µg/mL, respectivamente) para estes fármacos. Resultado semelhante foi encontrado no presente estudo para o posaconazol. Os estudos de Borman e colaboradores (2008), Fujita e colaboradores (2007) e de Sharma e colaboradores (2013) também revelaram altas CIMs para o fluconazol (64, 128 e 16 µg/mL, respectivamente) e consequente resistência para este fármaco. Além disso, não foram encontradas CIM elevadas para anfotericina B e voriconazol em *C. nivariensis*, tal como no presente trabalho (FUJITA et al., 2007; BORMAN et al., 2008; SHARMA et al., 2013).

Valores de pontos de corte epidemiológicos (ECVs) foram determinados para *Candida* spp. pelo método de referência da microdiluição em caldo pelo CLSI para a anfotericina B, itraconazol, as equinocandinas, 5-fluorocitosina (PFALLER; DIEKEMA, 2012), fluconazol, posaconazol e voriconazol (ESPINEL-INGROFF et al., 2014). Os ECVs foram estabelecidos para diferenciar cepas tipo selvagem (aquelas sem resistência adquirida ou mutações) de cepas tipo não-selvagem (aquelas com resistência adquirida ou com mutações). Em relação ao complexo *C. glabrata*, os novos pontos de corte foram definidos somente para *C. glabrata* até o momento (PFALLER; DIEKEMA, 2012; ESPINEL-INGROFF et al., 2014).

Na ausência de pontos de corte clínicos, os ECVs podem ajudar a caracterizar o perfil de susceptibilidade aos diferentes fármacos antifúngicos em *Candida* spp. e assim monitorar a emergência de isolados com mutações que podem levar a uma susceptibilidade reduzida ou resistência aos antifúngicos (PFALLER et al., 2012b). Baseado nos ECVs, os isolados de *C. glabrata stricto sensu* foram

predominantemente não tipo-selvagem para o voriconazol, seguido do posaconazol de acordo com os pontos de corte epidemiológicos estabelecidos por Espinel-Ingroff e colaboradores (2014) (ESPINEL-INGROFF et al., 2014). Resultados similares foram encontrados em *C. glabrata* em estudo conduzido por Pfaller e colaboradores (2015) (PFALLER et al., 2015).

Em relação ao perfil de suscetibilidade a quatro classes distintas de antifúngicos nas células em suspensão e no biofilme, os fármacos anfotericina B e micafungina foram capazes de penetrar a barreira imposta pelo biofilme e inibir o crescimento celular de alguns isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu*. Enquanto a atividade do itraconazol e da 5-fluorocitosina não foi eficiente na presença do biofilme frente aos isolados testados. Um estudo sobre a eficácia in vitro da anfotericina B, da micafungina e do fluconazol contra os biofilmes de *Candida* spp., incluindo *C. glabrata*, também constatou a eficácia da anfotericina B mesmo na presença do biofilme (KAWAI; YAMAGISHI; MIKAMO, 2017).

Correlacionando a produção de enzimas hidrolíticas com o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2017) **(APÊNDICE B)**, um aumento da produção de esterase em isolados suscetíveis à micafungina foi observado neste estudo. Enzimas com a capacidade de degradar quitina também são classificadas como esterases (CAUFRIER et al., 2003) e altos níveis de quitina estão associados com uma resistência à caspofungina em algumas espécies de *Candida* (WALKER; GOW; MUNRO, 2013). Desconhece-se até que ponto o ensaio de esterase em placa utilizado nesse estudo pode também detectar quitina desacetilases ou se a expressão de genes para todas as famílias de esterase possuem a mesma regulação nos isolados clínicos de *C. glabrata*. Nossos isolados suscetíveis à micafungina produziram mais esterases do que os isolados resistentes, o que poderia estar relacionado ao menor teor de quitina em suas paredes celulares devido à degradação da quitina. Mais estudos são necessários para verificar esta hipótese.

A captação de ferro também está envolvida na resistência de *Cryptococcus neoformans* (KIM et al., 2012) e espécies de *Candida* (PRASAD et al., 2006) ao fluconazol. Durante a aquisição da resistência ao fluconazol por uma cepa de *C. glabrata* exposta a concentrações crescentes deste azólico, observou-se também um aumento da atividade hemolítica associada à expressão do gene da hemolisina (SAMARANAYAKE et al., 2011). Portanto, supõe-se que as cepas resistentes ao fluconazol expressam mais hemolisinas, como foi observado no nosso estudo para

fluconazol e também para o itraconazol, outro azólico. Uma vez que um número significativo de resistência cruzada entre fluconazol e itraconazol não foi observado em nosso estudo, poderíamos sugerir que os mecanismos que levam ao aumento da resistência ao itraconazol conferido pelo ferro são independentes daqueles que causam resistência ao fluconazol. Surpreendentemente, também foi observado que as expressões de hemolisinas foram mais elevadas em isolados de *C. glabrata* resistentes à micafungina. Um efeito sinérgico entre a micafungina e o deferasirox, um quelante de ferro, foi descrito para *Phytium insidiosum*, sugerindo que o ferro aumenta a resistência a essa equinocandina (ZANETTE et al., 2015). Nossos resultados sustentam que um mecanismo semelhante possa ocorrer em *C. glabrata*. Em suma, a captação de ferro está associada não só à resistência ao fluconazol em *C. glabrata*, mas também à resistência a outros azólicos como o itraconazol, além das equinocandinas, como a micafungina. Esses resultados estimulam o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas envolvendo a depleção de ferro, já descritas para *C. albicans* (KOBAYASHI et al., 2011), para o tratamento de infecções invasivas por *C. glabrata*.

Este estudo contribuiu para um melhor entendimento dos fatores de virulência relacionados à patogenicidade das espécies *C. glabrata stricto sensu* e *C. nivariensis*, além do conhecimento do perfil de suscetibilidade aos fármacos antifúngicos dessas espécies. A associação entre alguns atributos de virulência e a regulação da resistência antifúngica encoraja o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas envolvendo mecanismos de virulência como potenciais alvos para o desenvolvimento de uma droga efetiva para o tratamento de infecções por *C. glabrata*.

7 CONCLUSÃO

- *Candida nivariensis* foi pela primeira vez descrita no Brasil. Entretanto, a frequência de isolamento de *C. glabrata stricto sensu* foi bem maior do que *C. nivariensis* neste estudo.
- *C. glabrata stricto sensu* e *C. nivariensis* apresentaram algumas características fenotípicas distintas, mas não suficientes para discriminar uma espécie da outra, sendo necessária a identificação molecular pelo sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2.
- *C. glabrata stricto sensu* foi capaz de produzir em diferentes níveis enzimas hidrolíticas extracelulares, tais como aspártico protease, fitase, esterase, hemolisina e catalase, assim como *C. nivariensis*, com exceção de esterase e hemolisina.
- *C. glabrata stricto sensu* foi capaz de formar biofilme, em geral, com baixa produção de biomassa e alta atividade metabólica, tal como *C. nivariensis*.
- A formação de biofilme foi influenciada pelo meio de cultura, visto que atividade metabólica foi mais elevada no meio RPMI1640 do que no meio YNB suplementado com 0,2% glicose entre os isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu*.
- 5-fluorocitosina foi o fármaco mais eficaz *in vitro* frente a todos os isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* e o isolado clínico de *C. nivariensis* nas células em suspensão.
- Resistência tanto ao fluconazol quanto à micafungina foram encontradas em *C. glabrata stricto sensu* e *C. nivariensis*.
- Resistência a multidrogas como anfotericina B, fluconazol e micafungina foi encontrada em um isolado de *C. glabrata stricto sensu*

- Anfotericina B e micafungina foram os fármacos mais eficazes frente aos isolados clínicos de *C. glabrata stricto sensu* na presença do biofilme.
- Relações significativas foram encontradas entre a produção de determinadas enzimas hidrolíticas e o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos testados, bem como entre a produção de enzimas hidrolíticas e a formação de biofilme em *C. glabrata stricto sensu*.

REFERÊNCIAS

ABBES, S.; AMOURI, I.; TRABELSI, H.; NEJI, S.; SELLAMI, H.; RAHMOUNI, F.; MAKNI, F.; REBAI, T.; AYADI, A. Analysis of Virulence Factors and in Vivo Biofilm-Forming Capacity of *Yarrowia lipolytica* Isolated from Patients with Fungemia. **Medical Mycology**, v. 55, n. 2, p. 193–202, fev. 2017.

ABEGG, M. A.; ALABARSE, P. V. G.; CASANOVA, A.; HOSCHIED, J.; SALOMON, T. B.; HACKENHAAR, F. S.; MEDEIROS, T. M.; BENFATO, M. S. Response to Oxidative Stress in Eight Pathogenic Yeast Species of the Genus *Candida*. **Mycopathologia**, v. 170, n. 1, p. 11–20, jul. 2010.

ABI-CHACRA, É. A.; SOUZA, L. O. P.; CRUZ, L. P.; BRAGA-SILVA, L. A.; GONÇALVES, D. S.; SODRÉ, C. L.; RIBEIRO, M. D.; SEABRA, S. H.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; BARBEDO, L. S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; ZICCARDI, M.; SANTOS, A. L. S. Phenotypical Properties Associated with Virulence from Clinical Isolates Belonging to the *Candida parapsilosis* Complex. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 8, p. 831–848, dez. 2013.

AKTAS, E.; YIGIT, N.; AYYILDIZ, A. Esterase Activity in Various *Candida* Species. **The Journal of International Medical Research**, v. 30, n. 3, p. 322–324, jun. 2002.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; CASTELLI, M. V.; CUESTA, I.; ZARAGOZA, O.; MONZÓN, A.; MELLADO, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. In Vitro Activity of Antifungals against Zygomycetes. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15 Suppl 5, p. 71–76, out. 2009.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum Sensing in Fungi--a Review. **Medical Mycology**, v. 50, n. 4, p. 337–345, maio 2012.

ALCOBA-FLOREZ, J.; DEL PILAR AREVALO, M.; GONZALEZ-PAREDES, F. J.; CANO, J.; GUARRO, J.; PEREZ-ROTH, E.; MENDEZ-ALVAREZ, S. PCR Protocol for Specific Identification of *Candida nivariensis*, a Recently Described Pathogenic Yeast. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 6194–6196, dez. 2005a.

ALCOBA-FLOREZ, J.; MENDEZ-ALVAREZ, S.; CANO, J.; GUARRO, J.; PEREZ-ROTH, E.; DEL PILAR AREVALO, M. Phenotypic and Molecular Characterization of *Candida nivariensis* Sp. Nov., a Possible New Opportunistic Fungus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4107–4111, ago. 2005b.

ALEM, M. A. S.; OTEEF, M. D. Y.; FLOWERS, T. H.; DOUGLAS, L. J. Production of Tyrosol by *Candida albicans* Biofilms and Its Role in Quorum Sensing and Biofilm Development. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1770–1779, out. 2006.

ALEXANDER, B. D.; JOHNSON, M. D.; PFEIFFER, C. D.; JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C.; CATANIA, J.; BOOKER, R.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; PERLIN, D. S.; PFALLER, M. A. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*: Clinical Failure Correlates With Presence of *FKS* Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1724–1732, jun. 2013.

ALMEIDA, A. A. de; MESQUITA, C. S. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; OLIVEIRA, K. M. P. de. Antifungal Susceptibility and Distribution of *Candida* Spp. Isolates from the University Hospital in the Municipality of Dourados, State of Mato Grosso Do Sul, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 335–339, jun. 2013.

AMEEN, F.; MOSLEM, M.; AL TAMI, M.; AL-AJLAN, H.; AL-QAHTANI, N. Identification of *Candida* Species in Vaginal Flora Using Conventional and Molecular Methods. **Journal De Mycologie Medicale**, jun. 2017.

AMIRRAJAB, N.; BADALI, H.; DIDEHDAR, M.; AFSARIAN, M. H.; MOHAMMADI, R.; LOTFI, N.; SHOKOHI, T. In Vitro Activities of Six Antifungal Drugs Against *Candida glabrata* Isolates: An Emerging Pathogen. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 5, p. e36638, maio 2016.

ANTINORI, S.; MILAZZO, L.; SOLLIMA, S.; GALLI, M.; CORBELLINO, M. Candidemia and Invasive Candidiasis in Adults: A Narrative Review. **European Journal of Internal Medicine**, v. 34, p. 21–28, out. 2016.

ARENDRUP, M. C. *Candida* and Candidaemia. Susceptibility and Epidemiology. **Danish Medical Journal**, v. 60, n. 11, p. B4698, nov. 2013.

ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_3, p. S445–S451, ago. 2017.

ARENDRUP, M. C.; PERLIN, D. S. Echinocandin Resistance: An Emerging Clinical Problem? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 484–492, dez. 2014.

ATKINS, S. D.; CLARK, I. M. Fungal Molecular Diagnostics: A Mini Review. **Journal of Applied Genetics**, v. 45, n. 1, p. 3–15, 2004.

AZNAR-MARIN, P.; GALAN-SANCHEZ, F.; MARIN-CASANOVA, P.; GARCÍA-MARTOS, P.; RODRÍGUEZ-IGLESIAS, M. *Candida nivariensis* as a New Emergent Agent of Vulvovaginal Candidiasis: Description of Cases and Review of Published Studies. **Mycopathologia**, v. 181, n. 5–6, p. 445–449, jun. 2016.

BAI, F. Y.; LIANG, H. Y.; JIA, J. H. Taxonomic Relationships among the Taxa in the *Candida guilliermondii* Complex, as Revealed by Comparative Electrophoretic Karyotyping. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50 Pt 1, p. 417–422, jan. 2000.

BAIRWA, G.; RASHEED, M.; TAIGWAL, R.; SAHOO, R.; KAUR, R. GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Linked Aspartyl Proteases Regulate Vacuole Homeostasis in *Candida glabrata*. **The Biochemical Journal**, v. 458, n. 2, p. 323–334, mar. 2014.

BASSETTI, M.; PEGHIN, M.; CARNELUTTI, A.; RIGHI, E.; MERELLI, M.; ANSALDI, F.; TRUCCHI, C.; ALICINO, C.; SARTOR, A.; TONIUTTO, P.; WAUTERS, J.; LALEMAN, W.; TASCINI, C.; MENICHETTI, F.; LUZZATI, R.; BRUGNARO, P.; MESINI, A.; RAVIOLO, S.; DE ROSA, F. G.; LAGUNES, L.; RELLO, J.;

DIMOPOULOS, G.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; VENA, A.; BOUZA, E.; MUÑOZ, P.; TUMBARELLO, M.; LOSITO, R.; MARTIN-LOECHES, I.; VISCOLI, C. Clinical Characteristics and Predictors of Mortality in Cirrhotic Patients with Candidemia and Intra-Abdominal Candidiasis: A Multicenter Study. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 4, p. 509–518, abr. 2017.

BASSETTI, M.; RIGHI, E.; ANSALDI, F.; MERELLI, M.; SCARPARO, C.; ANTONELLI, M.; GARNACHO-MONTERO, J.; DIAZ-MARTIN, A.; PALACIOS-GARCIA, I.; LUZZATI, R.; ROSIN, C.; LAGUNES, L.; RELLO, J.; ALMIRANTE, B.; SCOTTON, P. G.; BALDIN, G.; DIMOPOULOS, G.; NUCCI, M.; MUNOZ, P.; VENA, A.; BOUZA, E.; DE EGEA, V.; COLOMBO, A. L.; TASCINI, C.; MENICHETTI, F.; TAGLIAFERRI, E.; BRUGNARO, P.; SANGUINETTI, M.; MESINI, A.; SGANGA, G.; VISCOLI, C.; TUMBARELLO, M. A Multicenter Multinational Study of Abdominal Candidiasis: Epidemiology, Outcomes and Predictors of Mortality. **Intensive Care Medicine**, v. 41, n. 9, p. 1601–1610, set. 2015.

BASSYOUNI, R. H.; WEGDAN, A. A.; ABDELMONEIM, A.; SAID, W.; ABOELNAGA, F. Phospholipase and Aspartyl Proteinase Activities of *Candida* Species Causing Vulvovaginal Candidiasis in Patients with Type 2 *Diabetes Mellitus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1734–1741, out. 2015.

BEN-AMI, R.; HILEROWICZ, Y.; NOVIKOV, A.; GILADI, M. The Impact of New Epidemiological Cutoff Values on *Candida glabrata* Resistance Rates and Concordance between Testing Methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 2, p. 209–213, jun. 2014.

BERILA, N.; HYROŠŠOVÁ, P.; SUBÍK, J. Oxidative Stress Response and Virulence Factors in *Candida glabrata* Clinical Isolates. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 2, p. 116–121, mar. 2011.

BISHOP, J. A.; CHASE, N.; MAGILL, S. S.; KURTZMAN, C. P.; FIANDACA, M. J.; MERZ, W. G. *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**, v. 46, n. 2, p. 443–446, fev. 2008.

BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to Build a Biofilm: A Fungal Perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 588–594, dez. 2006.

BORMAN, A. M.; LINTON, C. J.; OLIVER, D.; PALMER, M. D.; SZEKELY, A.; JOHNSON, E. M. Rapid Molecular Identification of Pathogenic Yeasts by Pyrosequencing Analysis of 35 Nucleotides of Internal Transcribed Spacer 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3648–3653, out. 2010.

BORMAN, A. M.; PETCH, R.; LINTON, C. J.; PALMER, M. D.; BRIDGE, P. D.; JOHNSON, E. M. *Candida nivariensis*, an Emerging Pathogenic Fungus with Multidrug Resistance to Antifungal Agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 933–938, mar. 2008.

BORST, A.; FLUIT, A. C. High Levels of Hydrolytic Enzymes Secreted by *Candida albicans* Isolates Involved in Respiratory Infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. Pt 11, p. 971–974, nov. 2003.

BREEN, A. P.; MURPHY, J. A. Reactions of Oxy Radicals with DNA. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 6, p. 1033–1077, jun. 1995.

BRILHANTE, R. S. N.; BITTENCOURT, P. V.; CASTELO-BRANCO, D. de S. C. M.; DE OLIVEIRA, J. S.; ALENCAR, L. P. de; CORDEIRO, R. de A.; PINHEIRO, M.; NOGUEIRA-FILHO, E. F.; PEREIRA-NETO, W. de A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Trends in Antifungal Susceptibility and Virulence of *Candida* Spp. from the Nasolacrimal Duct of Horses. **Medical Mycology**, v. 54, n. 2, p. 147–154, fev. 2016.

BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO, M.; ORTA-ZAVALZA, E.; JUAREZ-CEPEDA, J.; GUTIERREZ-ESCOBEDO, G.; CAÑAS-VILLAMAR, I.; CASTAÑO, I.; DE LAS PEÑAS, A. The Oxidative Stress Response of the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida glabrata*. **Revista Iberoamericana De Micología**, v. 31, n. 1, p. 67–71, mar. 2014.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, dez. 2012.

BRUDER-NASCIMENTO, A.; CAMARGO, C. H.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, A. C.; MONDELLI, A. L.; BAGAGLI, E. Species Distribution and Susceptibility Profile of *Candida* Species in a Brazilian Public Tertiary Hospital. **BMC research notes**, v. 3, p. 1, jan. 2010.

BUCHMAN, T. G.; ROSSIER, M.; MERZ, W. G.; CHARACHE, P. Detection of Surgical Pathogens by in Vitro DNA Amplification. Part I. Rapid Identification of *Candida albicans* by *In Vitro* Amplification of a Fungus-Specific Gene. **Surgery**, v. 108, n. 2, p. 338- 346; discussion 346-347, ago. 1990.

CALANDRA, T.; ROBERTS, J. A.; ANTONELLI, M.; BASSETTI, M.; VINCENT, J.-L. Diagnosis and Management of Invasive Candidiasis in the ICU: An Updated Approach to an Old Enemy. **Critical Care (London, England)**, v. 20, n. 1, p. 125, maio 2016.

CANNON, R. D.; CHAFFIN, W. L. Oral Colonization by *Candida albicans*. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists**, v. 10, n. 3, p. 359–383, 1999.

CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; RHOMBERG, P. R.; PFALLER, M. A. Antifungal Susceptibility Patterns of a Global Collection of Fungal Isolates: Results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 2, p. 200–204, jun. 2016.

CASTELLI, M. V.; BUTASSI, E.; MONTEIRO, M. C.; SVETAZ, L. A.; VICENTE, F.; ZACCHINO, S. A. Novel Antifungal Agents: A Patent Review (2011 - Present). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 3, p. 323–338, mar. 2014.

CAUFRIER, F.; MARTINOU, A.; DUPONT, C.; BOURIOTIS, V. Carbohydrate Esterase Family 4 Enzymes: Substrate Specificity. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 7, p. 687–692, 28 mar. 2003.

CENDEJAS-BUENO, E.; KOLECKA, A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; THEELEN, B.; GROENEWALD, M.; KOSTRZEWA, M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; GÓMEZ-LÓPEZ, A.; BOEKHOUT, T. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3641–3651, nov. 2012.

CHAHINIAN, H.; SARDA, L. Distinction between Esterases and Lipases: Comparative Biochemical Properties of Sequence-Related Carboxylesterases. **Protein and Peptide Letters**, v. 16, n. 10, p. 1149–1161, 2009.

CHAVES, G. M.; TERÇARIOLI, G. R.; PADOVAN, A. C. B.; ROSAS, R. C.; FERREIRA, R. C.; MELO, A. S. A.; COLOMBO, A. L. *Candida mesorugosa* Sp. Nov., a Novel Yeast Species Similar to *Candida rugosa*, Isolated from a Tertiary Hospital in Brazil. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 231–242, abr. 2013.

CHEN, K.-H.; MIYAZAKI, T.; TSAI, H.-F.; BENNETT, J. E. The BZip Transcription Factor Cgap1p Is Involved in Multidrug Resistance and Required for Activation of Multidrug Transporter Gene *CgFLR1* in *Candida glabrata*. **Gene**, v. 386, n. 1–2, p. 63–72, jan. 2007.

CHEN, Y. C.; EISNER, J. D.; KATTAR, M. M.; RASSOULIAN-BARRETT, S. L.; LAFE, K.; BUI, U.; LIMAYE, A. P.; COOKSON, B. T. Polymorphic Internal Transcribed Spacer Region 1 DNA Sequences Identify Medically Important Yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4042–4051, nov. 2001.

CHEN, Y. C.; EISNER, J. D.; KATTAR, M. M.; RASSOULIAN-BARRETT, S. L.; LAFE, K.; YARFITZ, S. L.; LIMAYE, A. P.; COOKSON, B. T. Identification of Medically Important Yeasts Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2302–2310, jun. 2000.

CHIN, V. K.; FOONG, K. J.; MAHA, A.; RUSLIZA, B.; NORHAFIZAH, M.; NG, K. P.; CHONG, P. P. *Candida albicans* Isolates from a Malaysian Hospital Exhibit More Potent Phospholipase and Haemolysin Activities than Non-*albicans Candida* Isolates. **Tropical Biomedicine**, v. 30, n. 4, p. 654–662, dez. 2013.

CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; KHAN, Z. U.; AHMAD, S.; JUNEJA, S.; SHARMA, B.; ROY, P.; SUNDAR, G.; JOSEPH, L. First Isolations in India of *Candida nivariensis*, a Globally Emerging Opportunistic Pathogen. **Medical Mycology**, v. 48, n. 2, p. 416–420, mar. 2010.

CHRISTENSEN, W. B. Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. **Journal of Bacteriology**, v. 52, n. 4, p. 461–466, out. 1946.

CLARK, N. M.; GRIM, S. A.; LYNCH, J. P. Posaconazole: Use in the Prophylaxis and Treatment of Fungal Infections. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 5, p. 767–785, out. 2015.

CLSI. Reference Method for Both Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard - Third Edition. CLSI DOCUMENT M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008a.

CLSI. Reference Method for Both Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard - Third Information Supplement. CLSI DOCUMENT M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008b.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard - Fourth Information Supplement. CLSI document M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2012. .

COLOMBO, A. L.; GARNICA, M.; ARANHA CAMARGO, L. F.; DA CUNHA, C. A.; BANDEIRA, A. C.; BORGHI, D.; CAMPOS, T.; SENNA, A. L.; VALIAS DIDIER, M. E.; DIAS, V. C.; NUCCI, M. *Candida glabrata*: An Emerging Pathogen in Brazilian Tertiary Care Hospitals. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 38–44, jan. 2013.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599–607, out. 2003.

CORDEIRO, R. de A.; TEIXEIRA, C. E. C.; BRILHANTE, R. S. N.; CASTELOBRANCO, D. S. C. M.; ALENCAR, L. P.; DE OLIVEIRA, J. S.; MONTEIRO, A. J.; BANDEIRA, T. J. P. G.; SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B.; ROCHA, M. F. G. Exogenous Tyrosol Inhibits Planktonic Cells and Biofilms of *Candida* Species and Enhances Their Susceptibility to Antifungals. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 4, p. fov012, jun. 2015.

CÓRDOBA, S.; VIVOT, W.; BOSCO-BORGEAT, M. E.; TAVERNA, C.; SZUSZ, W.; MURISENGO, O.; ISLA, G.; DAVEL, G.; RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE MICOLOGIA. Species Distribution and Susceptibility Profile of Yeasts Isolated from Blood Cultures: Results of a Multicenter Active Laboratory-Based Surveillance Study in Argentina. **Revista Argentina De Microbiologia**, v. 43, n. 3, p. 176–185, set. 2011.

CORMACK, B. P.; GHORI, N.; FALKOW, S. An Adhesin of the Yeast Pathogen *Candida glabrata* Mediating Adherence to Human Epithelial Cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5427, p. 578–582, jul. 1999.

CORNELY, O. A.; BÖHME, A.; BUCHHEIDT, D.; EINSELE, H.; HEINZ, W. J.; KARTHAUS, M.; KRAUSE, S. W.; KRÜGER, W.; MASCHMEYER, G.; PENACK, O.; RITTER, J.; RUHNKE, M.; SANDHERR, M.; SIENIAWSKI, M.; VEHRERESCHILD, J.-J.; WOLF, H.-H.; ULLMANN, A. J. Primary Prophylaxis of Invasive Fungal Infections in Patients with Hematologic Malignancies. Recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the German Society for Haematology and Oncology. **Haematologica**, v. 94, n. 1, p. 113–122, jan. 2009.

CORNET, M.; SENDID, B.; FRADIN, C.; GAILLARDIN, C.; POULAIN, D.; NGUYEN, H.-V. Molecular Identification of Closely Related *Candida* Species Using Two Ribosomal Intergenic Spacer Fingerprinting Methods. **The Journal of molecular diagnostics: JMD**, v. 13, n. 1, p. 12–22, jan. 2011.

CORREIA, A.; SAMPAIO, P.; JAMES, S.; PAIS, C. *Candida bracarensis* Sp. Nov., a Novel Anamorphic Yeast Species Phenotypically Similar to *Candida glabrata*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. Pt 1, p. 313–317, jan. 2006.

COSTA, C.; PONTE, A.; PAIS, P.; SANTOS, R.; CAVALHEIRO, M.; YAGUCHI, T.; CHIBANA, H.; TEIXEIRA, M. C. New Mechanisms of Flucytosine Resistance in *C. glabrata* Unveiled by a Chemogenomics Analysis in *S. Cerevisiae*. **PloS One**, v. 10, n. 8, p. e0135110, 2015.

CRAWFORD, A.; WILSON, D. Essential Metals at the Host-Pathogen Interface: Nutritional Immunity and Micronutrient Assimilation by Human Fungal Pathogens. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 7, nov. 2015.

CRISEO, G.; SCORDINO, F.; ROMEO, O. Current Methods for Identifying Clinically Important Cryptic *Candida* Species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 111, p. 50–56, abr. 2015.

CUÉLLAR-CRUZ, M.; BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO, M.; CAÑAS-VILLAMAR, I.; MONTALVO-ARREDONDO, J.; RIEGO-RUIZ, L.; CASTAÑO, I.; DE LAS PEÑAS, A. High Resistance to Oxidative Stress in the Fungal Pathogen *Candida glabrata* Is Mediated by a Single Catalase, Cta1p, and Is Controlled by the Transcription Factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 5, p. 814–825, maio 2008.

CUÉLLAR-CRUZ, M.; LÓPEZ-ROMERO, E.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J. C.; RUIZ-BACA, E. *Candida* Species: New Insights into Biofilm Formation. **Future Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 755–771, jun. 2012.

CUENCA-ESTRELLA, M. [Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances]. **Revista Espanola de Quimioterapia: Publicacion Oficial de La Sociedad Espanola de Quimioterapia**, v. 23, n. 4, p. 169–176, dez. 2010.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal Drug Resistance Mechanisms in Pathogenic Fungi: From Bench to Bedside. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 54–59, jun. 2014.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; ISLA, G.; RODRIGUEZ, D.; ALMIRANTE, B.; PAHISSA, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; BARCELONA CANDIDEMIA PROJECT STUDY GROUP. Prevalence of *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* in a Spanish Collection of Yeasts: Comparison of Results from a Reference Centre and from a Population-Based Surveillance Study of Candidemia. **Medical Mycology**, v. 49, n. 5, p. 525–529, jul. 2011.

D'ENFERT, C.; JANBON, G. Biofilm Formation in *Candida glabrata*: What Have We Learnt from Functional Genomics Approaches? **FEMS yeast research**, v. 16, n. 1, p. fov111, fev. 2016.

DAGDEVIREN, M.; CERIKCIOGLU, N.; KARAVUS, M. Acid Proteinase, Phospholipase and Adherence Properties of *Candida parapsilosis* Strains Isolated from Clinical Specimens of Hospitalised Patients. **Mycoses**, v. 48, n. 5, p. 321–326, set. 2005.

DE GROOT, P. W. J.; KRANEVELD, E. A.; YIN, Q. Y.; DEKKER, H. L.; GROSS, U.; CRIELAARD, W.; DE KOSTER, C. G.; BADER, O.; KLIS, F. M.; WEIG, M. The Cell Wall of the Human Pathogen *Candida glabrata*: Differential Incorporation of Novel Adhesin-like Wall Proteins. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 11, p. 1951–1964, nov. 2008.

DE MELLO, T. P.; DE SOUZA RAMOS, L.; BRAGA-SILVA, L. A.; BRANQUINHA, M. H.; DOS SANTOS, A. L. S. Fungal Biofilm - A Real Obstacle against an Efficient Therapy: Lessons from *Candida*. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, jan. 2017.

DELLIÈRE, S.; HEALEY, K.; GITS-MUSELLI, M.; CARRARA, B.; BARBARO, A.; GUIGUE, N.; LECEFEL, C.; TOURATIER, S.; DESNOS-OLLIVIER, M.; PERLIN, D. S.; BRETAGNE, S.; ALANIO, A. Fluconazole and Echinocandin Resistance of *Candida glabrata* Correlates Better with Antifungal Drug Exposure Rather than with MSH2 Mutator Genotype in a French Cohort of Patients Harboring Low Rates of Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 2038, 2016.

DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for Fungal Diseases: Opportunities and Priorities. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 195–204, maio 2010.

DESAI, C.; MAVRIANOS, J.; CHAUHAN, N. *Candida glabrata* Pwp7p and Aed1p Are Required for Adherence to Human Endothelial Cells. **FEMS yeast research**, v. 11, n. 7, p. 595–601, nov. 2011.

DIEKEMA, D.; ARBEFEVILLE, S.; BOYKEN, L.; KROEGER, J.; PFALLER, M. The Changing Epidemiology of Healthcare-Associated Candidemia over Three Decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 45–48, maio 2012.

DIGNANI, M.; SOLOMKIM, J.; ANAÏSSE, E. *Candida*. In: ANAÏSSE E, MCGINNIS MR, PFALLER MA, editors. **MEDICAL MYCOLOGY**. 1. ed. Filadélfia: Churchill Livingstone, 2003.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; SIQUEIRA, R. A.; DA MOTA, V. P.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DUDIUK, C.; MORALES-LÓPEZ, S. E.; PODESTA, V.; MACEDO, D.; LEONARDELLI, F.; VITALE, R. G.; TOSELLO, M. E.; CABEZA, M. S.; BIASOLI, M.; GAMARRA, S.; GARCIA-EFFRON, G. Multiplex PCR Designed to Differentiate Species within the *Candida glabrata* Complex. **Revista Iberoamericana De Micología**, v. 34, n. 1, p. 43–45, mar. 2017.

DURÁN-VALLE, M. T.; SANZ-RODRÍGUEZ, N.; MUÑOZ-PARAÍSO, C.; ALMAGRO-MOLTÓ, M.; GÓMEZ-GARCÉS, J. L. Identification of Clinical Yeasts by Vitek MS System Compared with API ID 32 C. **Medical Mycology**, v. 52, n. 4, p. 342–349, maio 2014.

EL-KIRAT-CHATEL, S.; BEAUSSART, A.; DERCLAYE, S.; ALSTEENS, D.; KUCHARÍKOVÁ, S.; VAN DIJCK, P.; DUFRÊNE, Y. F. Force Nanoscopy of Hydrophobic Interactions in the Fungal Pathogen *Candida glabrata*. **ACS nano**, v. 9, n. 2, p. 1648–1655, 24 fev. 2015.

ELLEPOLA, A. N. B.; MORRISON, C. J. Laboratory Diagnosis of Invasive Candidiasis. **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 43 Spec No, p. 65–84, fev. 2005.

ELLS, R.; KILIAN, W.; HUGO, A.; ALBERTYN, J.; KOCK, J. L. F.; POHL, C. H. Virulence of South African *Candida albicans* Strains Isolated from Different Clinical Samples. **Medical Mycology**, v. 52, n. 3, p. 246–253, abr. 2014.

EMARA, M.; AHMAD, S.; KHAN, Z.; JOSEPH, L.; AL-OBAID, I.; PUROHIT, P.; BAFNA, R. *Candida auris* Candidemia in Kuwait, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 1091–1092, jun. 2015.

ENACHE-ANGOULVANT, A.; GUITARD, J.; GRENOUILLET, F.; MARTIN, T.; DURRENS, P.; FAIRHEAD, C.; HENNEQUIN, C. Rapid Discrimination between *Candida glabrata*, *Candida nivariensis*, and *Candida bracarensis* by Use of a Singleplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3375–3379, set. 2011.

ERASO, E.; MORAGUES, M. D.; VILLAR-VIDAL, M.; SAHAND, I. H.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, N.; PONTÓN, J.; QUINDÓS, G. Evaluation of the New Chromogenic Medium *Candida* ID 2 for Isolation and Identification of *Candida albicans* and Other Medically Important *Candida* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3340–3345, set. 2006.

ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M. A.; BUSTAMANTE, B.; CANTON, E.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GONZALEZ, G. M.; LASS-FLÖRL, C.; LOCKHART, S. R.; MARTIN-MAZUELOS, E.; MEIS, J. F.; MELHEM, M. S. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, T.; SZESZS, M. W.; ST-GERMAIN, G.; BONFIETTI, L. X.; GUARRO, J.; TURNIDGE, J. Multilaboratory Study of Epidemiological Cutoff Values for Detection of Resistance in Eight *Candida* Species to Fluconazole, Posaconazole, and Voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2006–2012, 2014.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal Biofilms. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.

FATAHINIA, M.; POORMOHAMADI, F.; ZAREI MAHMOUDABADI, A. Comparative Study of Esterase and Hemolytic Activities in Clinically Important *Candida* Species, Isolated From Oral Cavity of Diabetic and Non-Diabetic Individuals. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 3, p. e20893, mar. 2015.

FENG, X.; LING, B.; YANG, X.; LIAO, W.; PAN, W.; YAO, Z. Molecular Identification of *Candida* Species Isolated from Onychomycosis in Shanghai, China. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5–6, p. 365–371, dez. 2015.

FERREIRA, A. V.; PRADO, C. G.; CARVALHO, R. R.; DIAS, K. S. T.; DIAS, A. L. T. *Candida albicans* and Non-*C. albicans* *Candida* Species: Comparison of Biofilm Production and Metabolic Activity in Biofilms, and Putative Virulence Properties of Isolates from Hospital Environments and Infections. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3–4, p. 265–272, abr. 2013.

FIDEL, P. L.; SOBEL, J. D. Immunopathogenesis of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 3, p. 335–348, jul. 1996.

FIDEL, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 80–96, jan. 1999.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; RAMOS, L. de S.; BARBEDO, L. S.; CHAVES, A. L. da S.; MURAMOTO, I. A.; SANTOS, A. L. S. dos; ALMEIDA-PAES, R.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. First Description of *Candida nivariensis* in Brazil: Antifungal Susceptibility Profile and Potential Virulence Attributes. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 51–58, jan. 2016.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; RAMOS, L. de S.; BARBEDO, L. S.; DE OLIVEIRA, J. C. A.; DOS SANTOS, A. L. S.; ALMEIDA-PAES, R.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Relationship between the Antifungal Susceptibility Profile and the Production of Virulence-Related Hydrolytic Enzymes in Brazilian Clinical Strains of *Candida glabrata*. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 8952878, 2017.

FORNARI, G.; VICENTE, V. A.; GOMES, R. R.; MURO, M. D.; PINHEIRO, R. L.; FERRARI, C.; HERKERT, P. F.; TAKIMURA, M.; CARVALHO, N. S. de; QUEIROZ-TELLES, F. Susceptibility and Molecular Characterization of *Candida* Species from Patients with Vulvovaginitis. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 47, n. 2, p. 373–380, jun. 2016.

FUJITA, S.; SENDA, Y.; OKUSI, T.; OTA, Y.; TAKADA, H.; YAMADA, K.; KAWANO, M. Catheter-Related Fungemia Due to Fluconazole-Resistant *Candida nivariensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3459–3461, out. 2007.

GÁCSEK, A.; TROFA, D.; SCHÄFER, W.; NOSANCHUK, J. D. Targeted Gene Deletion in *Candida parapsilosis* Demonstrates the Role of Secreted Lipase in Virulence. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 10, p. 3049–3058, out. 2007.

GARCIA-VALLVÉ, S.; PALAU, J.; ROMEU, A. Horizontal Gene Transfer in Glycosyl Hydrolases Inferred from Codon Usage in *Escherichia Coli* and *Bacillus Subtilis*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 9, p. 1125–1134, set. 1999.

GEORGIADOU, S. P.; TARRAND, J.; SIPSAS, N. V.; KONTOYIANNIS, D. P. Candiduria in Haematologic Malignancy Patients without a Urinary Catheter: Nothing More than a Frailty Marker? **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 311–314, maio 2013.

GERWIEN, F.; SAFYAN, A.; WISGOTT, S.; BRUNKE, S.; KASPER, L.; HUBE, B. The Fungal Pathogen *Candida glabrata* Does Not Depend on Surface Ferric Reductases for Iron Acquisition. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 8 jun. 2017. GHANNOUM, M. A. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 122–143, table of contents, jan. 2000.

GHOSH, A. K.; PAUL, S.; SOOD, P.; RUDRAMURTHY, S. M.; RAJBANSHI, A.; JILLWIN, T. J.; CHAKRABARTI, A. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Rapid Identification of Yeasts Causing Bloodstream Infections. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 372–378, abr. 2015.

GÓMEZ-LÓPEZ, A.; ZARAGOZA, O.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Pharmacotherapy of Yeast Infections. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 16, p. 2801–2816, nov. 2008.

GONZÁLEZ, G. M.; TREVIÑO-RANGEL, R. de J.; PALMA-NICOLÁS, J. P.; MARTÍNEZ, C.; GONZÁLEZ, J. G.; AYALA, J.; CABALLERO, A.; MORFÍN-OTERO, R.; RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; VELARDE, F.; ASCENCIO, E. P.; TINOCO, J. C.; VÁZQUEZ, J. A.; CANO, M. A.; LEÓN-SICAIROS, N.; GONZÁLEZ, R.; RINCÓN, J.; ELÍAS, M. A.; BONIFAZ, A. Species Distribution and Antifungal Susceptibility of Bloodstream Fungal Isolates in Paediatric Patients in Mexico: A Nationwide Surveillance Study. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2847–2851, dez. 2013.

GONZÁLEZ MARTÍNEZ, M.; MARIÑO MARTÍNEZ, C.; BALDOMINOS UTRILLA, G.; FERNÁNDEZ MARTÍNEZ, M. N. [Analysis of the use of liposomal amphotericin B]. **Revista Iberoamericana De Micología**, v. 31, n. 2, p. 109–113, jun. 2014.

GORTON, R. L.; JONES, G. L.; KIBBLER, C. C.; COLLIER, S. *Candida Nivariensis* Isolated from a Renal Transplant Patient with Persistent Candiduria-Molecular

Identification Using ITS PCR and MALDI-TOF. **Medical Mycology Case Reports**, v. 2, p. 156–158, 25 out. 2013.

GUIRAO-ABAD, J. P.; SÁNCHEZ-FRESNEDA, R.; ALBURQUERQUE, B.; HERNÁNDEZ, J. A.; ARGÜELLES, J.-C. ROS Formation Is a Differential Contributory Factor to the Fungicidal Action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 307, n. 4–5, p. 241–248, jun. 2017.

HAAS, H.; EISENDLE, M.; TURGEON, B. G. Siderophores in Fungal Physiology and Virulence. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 149–187, 2008.

HAJJEH, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, L. H.; LYON, G. M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; BENJAMIN, L. E.; SANZA, L. T.; HUIE, S.; YEO, S. F.; BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W. Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and in Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1519–1527, abr. 2004.

HALEY, L. D. Yeasts of Medical Importance. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 36, p. 227–234, set. 1961.

HALLIWELL, S. C.; SMITH, M. C. A.; MUSTON, P.; HOLLAND, S. L.; AVERY, S. V. Heterogeneous Expression of the Virulence-Related Adhesin Epa1 between Individual Cells and Strains of the Pathogen *Candida glabrata*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 2, p. 141–150, fev. 2012.

HATA, D. J.; HALL, L.; FOTHERGILL, A. W.; LARONE, D. H.; WENGENACK, N. L. Multicenter Evaluation of the New VITEK 2 Advanced Colorimetric Yeast Identification Card. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1087–1092, abr. 2007.

HENRY, K. W.; NICKELS, J. T.; EDLIND, T. D. Upregulation of ERG Genes in *Candida* Species by Azoles and Other Sterol Biosynthesis Inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2693–2700, out. 2000.

HERRERO, E.; ROS, J.; BELLÍ, G.; CABISCOL, E. Redox Control and Oxidative Stress in Yeast Cells. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 11, p. 1217–1235, nov. 2008.

HOGAN, D. A. Talking to Themselves: Autoregulation and Quorum Sensing in Fungi. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 4, p. 613–619, 1 abr. 2006.

HOU, X.; XIAO, M.; CHEN, S. C.-A.; KONG, F.; WANG, H.; CHU, Y.-Z.; KANG, M.; SUN, Z.-Y.; HU, Z.-D.; LI, R.-Y.; LU, J.; LIAO, K.; HU, T.-S.; NI, Y.-X.; ZOU, G.-L.; ZHANG, G.; FAN, X.; ZHAO, Y.-P.; XU, Y.-C. Molecular Epidemiology and Antifungal Susceptibility of *Candida glabrata* in China (August 2009 to July 2014): A Multi-Center Study. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 23 maio 2017a.

HOU, X.; XIAO, M.; CHEN, S. C.-A.; WANG, H.; YU, S.-Y.; FAN, X.; KONG, F.; XU, Y.-C. Identification and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a Multi-Center Chinese Collection of Yeasts. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 5, 2017b.

IRINYI, L.; SERENA, C.; GARCIA-HERMOSO, D.; ARABATZIS, M.; DESNOS-OLLIVIER, M.; VU, D.; CARDINALI, G.; ARTHUR, I.; NORMAND, A.-C.; GIRALDO, A.; DA CUNHA, K. C.; SANDOVAL-DENIS, M.; HENDRICKX, M.; NISHIKAKU, A. S.; DE AZEVEDO MELO, A. S.; MERSEGUÉL, K. B.; KHAN, A.; PARENTE ROCHA, J. A.; SAMPAIO, P.; DA SILVA BRIONES, M. R.; E FERREIRA, R. C.; DE MEDEIROS MUNIZ, M.; CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R.; ESTRADA-BARCENAS, D.; CASSAGNE, C.; MARY, C.; DUAN, S. Y.; KONG, F.; SUN, A. Y.; ZENG, X.; ZHAO, Z.; GANTOIS, N.; BOTTEREL, F.; ROBBERTSE, B.; SCHOCH, C.; GAMS, W.; ELLIS, D.; HALLIDAY, C.; CHEN, S.; SORRELL, T. C.; PIARROUX, R.; COLOMBO, A. L.; PAIS, C.; DE HOOG, S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; TAYLOR, M. L.; TORIELLO, C.; DE ALMEIDA SOARES, C. M.; DELHAES, L.; STUBBE, D.; DROMER, F.; RANQUE, S.; GUARRO, J.; CANO-LIRA, J. F.; ROBERT, V.; VELEGRAKI, A.; MEYER, W.

International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS Reference DNA Barcoding Database--the Quality Controlled Standard Tool for Routine Identification of Human and Animal Pathogenic Fungi. **Medical Mycology**, v. 53, n. 4, p. 313–337, maio 2015.

KANTARCIOGLU, A. S.; YÜCEL, A. Phospholipase and Protease Activities in Clinical *Candida* Isolates with Reference to the Sources of Strains. **Mycoses**, v. 45, n. 5–6, p. 160–165, jun. 2002.

KATRAGKOU, A.; MCCARTHY, M.; ALEXANDER, E. L.; ANTACHOPOULOS, C.; MELETIADIS, J.; JABRA-RIZK, M. A.; PETRAITIS, V.; ROILIDES, E.; WALSH, T. J. In Vitro Interactions between Farnesol and Fluconazole, Amphotericin B or Micafungin against *Candida albicans* Biofilms. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 470–478, fev. 2015.

KAUR, R.; MA, B.; CORMACK, B. P. A Family of Glycosylphosphatidylinositol-Linked Aspartyl Proteases Is Required for Virulence of *Candida glabrata*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 18, p. 7628–7633, 1 maio 2007.

KAWAI, A.; YAMAGISHI, Y.; MIKAMO, H. *Candida tropicalis* Biofilm Formation and Efficacy of Liposomal Amphotericin B Using Time-Lapse Images. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 1 jul. 2017.

KEÇELI, S. A.; DÜNDAR, D.; TAMER, G. S. Comparison of Vitek Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Versus Conventional Methods in *Candida* Identification. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1–2, p. 67–73, fev. 2016.

KERRIDGE, D.; NICHOLAS, R. O. Drug Resistance in the Opportunistic Pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 18 Suppl B, p. 39–49, out. 1986.

KIM, J.; CHO, Y.-J.; DO, E.; CHOI, J.; HU, G.; CADIEUX, B.; CHUN, J.; LEE, Y.; KRONSTAD, J. W.; JUNG, W. H. A Defect in Iron Uptake Enhances the Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to Azole Antifungal Drugs. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 49, n. 11, p. 955–966, nov. 2012.

KOBAYASHI, T.; KAKEYA, H.; MIYAZAKI, T.; IZUMIKAWA, K.; YANAGIHARA, K.; OHNO, H.; YAMAMOTO, Y.; TASHIRO, T.; KOHNO, S. Synergistic Antifungal Effect of Lactoferrin with Azole Antifungals against *Candida albicans* and a Proposal for a New Treatment Method for Invasive Candidiasis. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 64, n. 4, p. 292–296, 2011.

KOSMAN, D. J. Molecular Mechanisms of Iron Uptake in Fungi. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1185–1197, mar. 2003.

KOVÁCS, R.; TÓTH, Z.; NAGY, F.; DARÓCZI, L.; BOZÓ, A.; MAJOROS, L. Activity of Exogenous Tyrosol in Combination with Caspofungin and Micafungin against *Candida parapsilosis* Sessile Cells. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 6, p. 1529–1536, jun. 2017.

KREUSCH, A.; KARSTAEDT, A. S. Candidemia among Adults in Soweto, South Africa, 1990-2007. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. e621-623, ago. 2013.

KRYSAN, D. J.; TING, E. L.; ABEIJON, C.; KROOS, L.; FULLER, R. S. Yapsins Are a Family of Aspartyl Proteases Required for Cell Wall Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 8, p. 1364–1374, ago. 2005.

LACAZ, C.; PORTO, E.; MARTINS, J.; HEINS-VACCARI, E.; MELO, N. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAN, L.; XU, J. Multiple Gene Genealogical Analyses Suggest Divergence and Recent Clonal Dispersal in the Opportunistic Human Pathogen *Candida guilliermondii*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 152, n. Pt 5, p. 1539–1549, maio 2006.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, mar. 1977.

LARONE, D. **Medically Important Fungi: A Guide to Identification**. 4. ed. Washington: DC: American Society for Microbiology Press, 2002.

LEI, X. G.; PORRES, J. M. Phytase Enzymology, Applications, and Biotechnology. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 21, p. 1787–1794, nov. 2003.

LEROY, O.; GANGNEUX, J.-P.; MONTRAVERS, P.; MIRA, J.-P.; GOUIN, F.; SOLLET, J.-P.; CARLET, J.; REYNES, J.; ROSENHEIM, M.; REGNIER, B.; LORTHOLARY, O.; AMARCAND STUDY GROUP. Epidemiology, Management, and Risk Factors for Death of Invasive *Candida* Infections in Critical Care: A Multicenter, Prospective, Observational Study in France (2005-2006). **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 5, p. 1612–1618, maio 2009.

LI, D.; XIA, R.; ZHANG, Q.; BAI, C.; LI, Z.; ZHANG, P. Evaluation of Candidemia in Epidemiology and Risk Factors among Cancer Patients in a Cancer Center of China: An 8-Year Case-Control Study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, dez. 2017.

LI, J.; SHAN, Y.; FAN, S.; LIU, X. Prevalence of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in Vulvovaginal Candidiasis. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 279–283, out. 2014.

LI, L.; REDDING, S.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Candida glabrata*: An Emerging Oral Opportunistic Pathogen. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 3, p. 204–215, mar. 2007.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 1 jun. 2009.

LINARES, C. E. B.; GIACOMELLI, S. R.; ALTENHOFEN, D.; ALVES, S. H.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Fluconazole and amphotericin-B resistance are

associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 752–758, dez. 2013.

LINTON, C. J.; BORMAN, A. M.; CHEUNG, G.; HOLMES, A. D.; SZEKELY, A.; PALMER, M. D.; BRIDGE, P. D.; CAMPBELL, C. K.; JOHNSON, E. M. Molecular Identification of Unusual Pathogenic Yeast Isolates by Large Ribosomal Subunit Gene Sequencing: 2 Years of Experience at the United Kingdom Mycology Reference Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1152–1158, abr. 2007.

LIU, W.; TAN, J.; SUN, J.; XU, Z.; LI, M.; YANG, Q.; SHAO, H.; ZHANG, L.; LIU, W.; WAN, Z.; CUI, W.; ZANG, B.; JIANG, D.; FANG, Q.; QIN, B.; QIN, T.; LI, W.; GUO, F.; LIU, D.; GUAN, X.; YU, K.; QIU, H.; LI, R.; CHINA-SCAN TEAM. Invasive Candidiasis in Intensive Care Units in China: In Vitro Antifungal Susceptibility in the China-SCAN Study. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 1, p. 162–167, jan. 2014.

LIU, Y.; FILLER, S. G. *Candida albicans* Als3, a Multifunctional Adhesin and Invasin. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 2, p. 168–173, fev. 2011.

LOCKHART, S. R.; IQBAL, N.; CLEVELAND, A. A.; FARLEY, M. M.; HARRISON, L. H.; BOLDEN, C. B.; BAUGHMAN, W.; STEIN, B.; HOLLICK, R.; PARK, B. J.; CHILLER, T. Species Identification and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Bloodstream Isolates from Population-Based Surveillance Studies in Two U.S. Cities from 2008 to 2011. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3435–3442, nov. 2012.

LOCKHART, S. R.; MESSER, S. A.; GHERNA, M.; BISHOP, J. A.; MERZ, W. G.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a Large Global Collection of *Candida glabrata* Isolates: Comparison to the Literature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1216–1217, abr. 2009.

LÓPEZ-SORIA, L. M.; BERECIARTUA, E.; SANTAMARÍA, M.; SORIA, L. M.; HERNÁNDEZ-ALMARAIZ, J. L.; MULARONI, A.; NIETO, J.; MONTEJO, M. [First case

report of catheter-related fungemia by *Candida nivariensis* in the Iberian Peninsula]. **Revista Iberoamericana De Micologia**, v. 30, n. 1, p. 69–71, 3 jan. 2013.

MAGA, J. A. Phytate: Its Chemistry, Occurrence, Food Interactions, Nutritional Significance, and Methods of Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 1–9, jan. 1982.

MALANI, A. N.; PSARROS, G.; MALANI, P. N.; KAUFFMAN, C. A. Is Age a Risk Factor for *Candida glabrata* Colonisation?: *Candida glabrata* Colonisation. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. 531–537, nov. 2011.

MANNS, J. M.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a Hemolytic Factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, p. 5154–5156, nov. 1994.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Production of Biofilm by *Candida* and Non-*Candida* Spp. Isolates Causing Fungemia: Comparison of Biomass Production and Metabolic Activity and Development of Cut-off Points. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 304, n. 8, p. 1192–1198, nov. 2014.

MCGINNIS, M. R.; AJELLO, L.; BENEKE, E. S.; DROUHET, E.; GOODMAN, N. L.; HALDE, C. J.; HALEY, L. D.; KANE, J.; LAND, G. A.; PADHYE, A. A. Taxonomic and Nomenclatural Evaluation of the Genera *Candida* and *Torulopsis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 813–814, out. 1984.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SOARES, C. P.; DA SILVA, J. L. M.; ANDREOTTI, P. F. Interaction of Pathogenic Fungi with Host Cells: Molecular and Cellular Approaches. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 45, n. 3, p. 383–394, 1 set. 2005.

MENSA, J.; PITART, C.; MARCO, F. Treatment of Critically Ill Patients with Candidemia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32 Suppl 2, p. S93–97, nov. 2008.

METCHOCK, B.; NOLTE, F.; WALLACE JR., R. MYCOBACTERIUM. In: **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. p. 399–437.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **RELAÇÃO NACIONAL DE MEDICAMENTOS: RENAME 2017**. 1. ed. Brasília, DF; 2017.

MIYAZAKI, T.; KOHNO, S. Current Recommendations and Importance of Antifungal Stewardship for the Management of Invasive Candidiasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 13, n. 9, p. 1171–1183, 2015.

MONTAGNA, M. T.; LOVERO, G.; BORGHI, E.; AMATO, G.; ANDREONI, S.; CAMPION, L.; LO CASCIO, G.; LOMBARDI, G.; LUZZARO, F.; MANSO, E.; MUSSAP, M.; PECILE, P.; PERIN, S.; TANGORRA, E.; TRONCI, M.; IATTA, R.; MORACE, G. Candidemia in Intensive Care Unit: A Nationwide Prospective Observational Survey (GISIA-3 Study) and Review of the European Literature from 2000 through 2013. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 5, p. 661–674, 2014.

MONTAGNA, M. T.; LOVERO, G.; CORETTI, C.; MARTINELLI, D.; DE GIGLIO, O.; IATTA, R.; BALBINO, S.; ROSATO, A.; CAGGIANO, G. Susceptibility to Echinocandins of *Candida* Spp. Strains Isolated in Italy Assessed by European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods. **BMC microbiology**, v. 15, p. 106, maio 2015.

MORALES-LÓPEZ, S.; DUDIUK, C.; VIVOT, W.; SZUSZ, W.; CÓRDOBA, S. B.; GARCIA-EFFRON, G. Phenotypic and Molecular Evaluation of Echinocandin Susceptibility of *Candida glabrata*, *Candida bracarensis*, and *Candida nivariensis* Strains Isolated during 30 Years in Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, jul. 2017.

MORALES-LÓPEZ, S. E.; TAVERNA, C. G.; BOSCO-BORGEAT, M. E.; MALDONADO, I.; VIVOT, W.; SZUSZ, W.; GARCIA-EFFRON, G.; CÓRDOBA, S. B. *Candida glabrata* Species Complex Prevalence and Antifungal Susceptibility Testing

in a Culture Collection: First Description of *Candida nivariensis* in Argentina. **Mycopathologia**, v. 181, n. 11–12, p. 871–878, dez. 2016.

MOREIRA, A.; SILVA, S.; BOTELHO, C.; SAMPAIO, P.; PAIS, C.; HENRIQUES, M. *Candida Bracarensis*: Evaluation of Virulence Factors and Its Tolerance to Amphotericin B and Fluconazole. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5–6, p. 305–315, dez. 2015.

MOREIRA-OLIVEIRA, M. S.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M.; IMAI, T.; SCHREIBER, A. Z.; MORETTI, M. L. Diagnosis of Candidemia by Polymerase Chain Reaction and Blood Culture: Prospective Study in a High-Risk Population and Identification of Variables Associated with Development of Candidemia. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 11, p. 721–726, nov. 2005.

MORETTI, M. L.; TRABASSO, P.; LYRA, L.; FAGNANI, R.; RESENDE, M. R.; DE OLIVEIRA CARDOSO, L. G.; SCHREIBER, A. Z. Is the Incidence of Candidemia Caused by *Candida glabrata* Increasing in Brazil? Five-Year Surveillance of *Candida* Bloodstream Infection in a University Reference Hospital in Southeast Brazil. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 225–230, abr. 2013.

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of Multidrug Resistance in Pathogenic Fungi. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 47, n. 2, p. 94–106, fev. 2010.

MOUDGAL, V.; LITTLE, T.; BOIKOV, D.; VAZQUEZ, J. A. Multiechinocandin- and Multiazole-Resistant *Candida parapsilosis* Isolates Serially Obtained during Therapy for Prosthetic Valve Endocarditis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 767–769, fev. 2005.

NAGY, I.; FILKOR, K.; NÉMETH, T.; HAMARI, Z.; VÁGVÖLGYI, C.; GÁCSEK, A. In Vitro Interactions of *Candida parapsilosis* Wild Type and Lipase Deficient Mutants with Human Monocyte Derived Dendritic Cells. **BMC microbiology**, v. 11, p. 122, maio 2011.

NAKAGAWA, Y. Catalase Gene Disruptant of the Human Pathogenic Yeast *Candida albicans* Is Defective in Hyphal Growth, and a Catalase-Specific Inhibitor Can Suppress Hyphal Growth of Wild-Type Cells. **Microbiology and Immunology**, v. 52, n. 1, p. 16–24, jan. 2008.

NAKAGAWA, Y.; KOIDE, K.; WATANABE, K.; MORITA, Y.; MIZUGUCHI, I.; AKASHI, T. The Expression of the Pathogenic Yeast *Candida albicans* Catalase Gene in Response to Hydrogen Peroxide. **Microbiology and Immunology**, v. 43, n. 7, p. 645–651, 1999.

NAKAMURA, K.; KANNO, T.; MOKUDAI, T.; IWASAWA, A.; NIWANO, Y.; KOHNO, M. Microbial Resistance in Relation to Catalase Activity to Oxidative Stress Induced by Photolysis of Hydrogen Peroxide. **Microbiology and Immunology**, v. 56, n. 1, p. 48–55, jan. 2012.

NEVITT, T.; THIELE, D. J. Host Iron Withholding Demands Siderophore Utilization for *Candida glabrata* to Survive Macrophage Killing. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 3, p. e1001322, mar. 2011.

NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 71–92, 2015.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. N.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. L.; LATIN AMERICAN INVASIVE MYCOSIS NETWORK. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e59373, 2013.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51, n. 5, p. 561–570, set. 2010.

ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; COOPER, C. R.; FOTHERGILL, A.; PASARELL, L.; MCGINNIS, M. R. *Candida* and *Torulopsis*: A Blinded Evaluation of Use of Pseudohypha Formation as Basis for Identification of Medically Important Yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 313–316, jan. 1997.

PAKSHIR, K.; ZOMORODIAN, K.; KARAMITALAB, M.; JAFARI, M.; TARAZ, H.; EBRAHIMI, H. Phospholipase, Esterase and Hemolytic Activities of *Candida* Spp. Isolated from Onychomycosis and Oral Lichen Planus Lesions. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 23, n. 2, p. 113–118, jun. 2013.

PANDA, A.; GHOSH, A. K.; MIRDHA, B. R.; XESS, I.; PAUL, S.; SAMANTARAY, J. C.; SRINIVASAN, A.; KHALIL, S.; RASTOGI, N.; DABAS, Y. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Rapid Identification of Clinical Fungal Isolates Based on Ribosomal Protein Biomarkers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 109, p. 93–105, fev. 2015.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; SCHUSTER, M. G.; VAZQUEZ, J. A.; WALSH, T. J.; ZAOUTIS, T. E.; SOBEL, J. D. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 62, n. 4, p. e1-50, 15 fev. 2016.

PAREDES, K.; SUTTON, D. A.; CANO, J.; FOTHERGILL, A. W.; LAWHON, S. D.; ZHANG, S.; WATKINS, J. P.; GUARRO, J. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Testing of Clinical Isolates of the *Candida rugosa* Species Complex and Proposal of the New Species *Candida neorugosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2397–2403, jul. 2012.

PARK, M.; DO, E.; JUNG, W. H. Lipolytic Enzymes Involved in the Virulence of Human Pathogenic Fungi. **Mycobiology**, v. 41, n. 2, p. 67–72, jun. 2013.

PARMELAND, L.; GAZON, M.; GUERIN, C.; ARGAUD, L.; LEHOT, J.-J.; BASTIEN, O.; ALLAOUCHICHE, B.; MICHALLET, M.; PICOT, S.; BIENVENU, A.-L.; STUDY

GROUP. *Candida albicans* and Non-*Candida albicans* Fungemia in an Institutional Hospital during a Decade. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 33–37, jan. 2013.

PÄRNÄNEN, P.; MEURMAN, J. H.; NIKULA-IJÄS, P. A Novel *Candida glabrata* Cell Wall Associated Serine Protease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 457, n. 4, p. 676–680, 20 fev. 2015.

PARRA-ORTEGA, B.; CRUZ-TORRES, H.; VILLA-TANACA, L.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Phylogeny and Evolution of the Aspartyl Protease Family from Clinically Relevant *Candida* Species. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 505–512, maio 2009.

PAUL, S.; MOYE-ROWLEY, W. S. Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. **Frontiers in Physiology**, v. 5, 16 abr. 2014.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of Multiple Methods for Quantification of Microbial Biofilms Grown in Microtiter Plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p. 157–165, fev. 2008.

PERLIN, D. S. Echinocandin Resistance, Susceptibility Testing and Prophylaxis: Implications for Patient Management. **Drugs**, v. 74, n. 14, p. 1573–1585, set. 2014.

PFALLER, M. A.; ANDES, D. R.; DIEKEMA, D. J.; HORN, D. L.; REBOLI, A. C.; ROTSTEIN, C.; FRANKS, B.; AZIE, N. E. Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-*albicans* Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004-2008. **PloS One**, v. 9, n. 7, p. e101510, 2014.

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; MOET, G. J.; JONES, R. N. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest Methods with the CLSI Broth Microdilution Method for Echinocandin Susceptibility Testing of *Candida* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1592–1599, maio 2010.

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M.; LOCKHART, S. R.; AHLQUIST, A. M.; MESSER, S. A.; JONES, R. N. Frequency of Decreased Susceptibility and Resistance to Echinocandins among Fluconazole-Resistant Bloodstream Isolates of *Candida glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1199–1203, abr. 2012a.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: A Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, jan. 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Progress in Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Spp. by Use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods, 2010 to 2012. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2846–2856, set. 2012.

PFALLER, M. A.; ESPINEL-INGROFF, A.; CANTON, E.; CASTANHEIRA, M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DIEKEMA, D. J.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GHANNOUM, M.; JONES, R. N.; LOCKHART, S. R.; MARTIN-MAZUELOS, E.; MELHEM, M. S. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, P.; PELAEZ, T.; PEMAN, J.; REX, J.; SZESZS, M. W. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B, Flucytosine, and Itraconazole and *Candida* Spp. as Determined by CLSI Broth Microdilution. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2040–2046, jun. 2012b.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; RHOMBERG, P. R.; CASTANHEIRA, M. Activity of a Long-Acting Echinocandin (CD101) and Seven Comparator Antifungal Agents Tested against a Global Collection of Contemporary Invasive Fungal Isolates in the SENTRY 2014 Antifungal Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, mar. 2017.

PFALLER, M. A.; MOET, G. J.; MESSER, S. A.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. Geographic Variations in Species Distribution and Echinocandin and Azole Antifungal Resistance Rates among *Candida* Bloodstream Infection Isolates: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 396–399, jan. 2011.

PFALLER, M. A.; RHOMBERG, P. R.; MESSER, S. A.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. Isavuconazole, Micafungin, and 8 Comparator Antifungal Agents' Susceptibility Profiles for Common and Uncommon Opportunistic Fungi Collected in 2013: Temporal Analysis of Antifungal Drug Resistance Using CLSI Species-Specific Clinical Breakpoints and Proposed Epidemiological Cutoff Values. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 4, p. 303–313, ago. 2015.

PFALLER, M.; NEOFYTOS, D.; DIEKEMA, D.; AZIE, N.; MEIER-KRIESCHE, H.-U.; QUAN, S.-P.; HORN, D. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 3648 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) Registry, 2004-2008. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 4, p. 323–331, dez. 2012c.

PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A. R.; WORMLEY, F. L.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A Simple and Reproducible 96-Well Plate-Based Method for the Formation of Fungal Biofilms and Its Application to Antifungal Susceptibility Testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494–1500, 2008.

PIERCE, C. G.; VILA, T.; ROMO, J. A.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; WALL, G.; RAMASUBRAMANIAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J. L. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 1, mar. 2017.

PINTO, A.; HALLIDAY, C.; ZAHRA, M.; VAN HAL, S.; OLMA, T.; MASZEWSKA, K.; IREDELL, J. R.; MEYER, W.; CHEN, S. C.-A. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Identification of Yeasts Is Contingent on Robust Reference Spectra. **PloS One**, v. 6, n. 10, p. e25712, 2011.

PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. In: RAMOS, J.; SYCHROVÁ, H.; KSCHISCHO, M. (Ed.). **Yeast Membrane Transport**. Cham: Springer International Publishing, 2016. 892p. 327–349.

PRASAD, T.; CHANDRA, A.; MUKHOPADHYAY, C. K.; PRASAD, R. Unexpected Link between Iron and Drug Resistance of *Candida* Spp.: Iron Depletion Enhances Membrane Fluidity and Drug Diffusion, Leading to Drug-Susceptible Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3597–3606, nov. 2006.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate Method for Detection of Phospholipase Activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7–14, mar. 1982.

PUTIGNANI, L.; DEL CHIERICO, F.; ONORI, M.; MANCINELLI, L.; ARGENTIERI, M.; BERNASCHI, P.; COLTELLA, L.; LUCIGNANO, B.; PANSANI, L.; RANNO, S.; RUSSO, C.; URBANI, A.; FEDERICI, G.; MENICHELLA, D. MALDI-TOF Mass Spectrometry Proteomic Phenotyping of Clinically Relevant Fungi. **Molecular bioSystems**, v. 7, n. 3, p. 620–629, mar. 2011.

RAJENDRAN, R.; ROBERTSON, D. P.; HODGE, P. J.; LAPPIN, D. F.; RAMAGE, G. Hydrolytic Enzyme Production Is Associated with *Candida albicans* Biofilm Formation from Patients with Type 1 Diabetes. **Mycopathologia**, v. 170, n. 4, p. 229–235, out. 2010.

RAMOS, L. S.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. Different Classes of Hydrolytic Enzymes Produced by Multidrug-Resistant Yeasts Comprising the *Candida haemulonii* Complex. **Medical Mycology**, v. 55, n. 2, p. 228–232, 1 fev. 2017.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 62, n. 3, p. 597–635, set. 1998.

RIERA, F.; MEDEOT, M.; SARTORI, L.; BERGALLO, C.; MINOLI, J.; VILCHEZ, V.; SÁNCHEZ, P.; ABIEGA, C.; PINCHEIRA, C.; CORREA, S.; BARTOLI, C.; FIGUEROA, M.; MONTAMAT, M.; SPITALE, N.; MINGUEZ, A.; CAEIRO, J. P. [Candidemia epidemiology in Córdoba Argentina. Surveillance study of five institutions]. **Revista De La Facultad De Ciencias Medicas (Cordoba, Argentina)**, v. 71, n. 2, p. 89–93, 2014.

RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: A Review of Its Features and Resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. 673–688, maio 2014.

RODRIGUEZ, L.; BUSTAMANTE, B.; HUAROTO, L.; AGURTO, C.; ILLESCAS, R.; RAMIREZ, R.; DIAZ, A.; HIDALGO, J. A Multi-Centric Study of *Candida* Bloodstream Infection in Lima-Callao, Peru: Species Distribution, Antifungal Resistance and Clinical Outcomes. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175172, abr. 2017.

ROMÁN, E.; PRIETO, D.; MARTIN, R.; CORREIA, I.; MESA ARANGO, A. C.; ALONSO-MONGE, R.; ZARAGOZA, O.; PLA, J. Role of Catalase Overproduction in Drug Resistance and Virulence in *Candida albicans*. **Future Microbiology**, out. 2016.

ROMEO, O.; SCORDINO, 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*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, n. 1, p. 117–120, out. 2009.

ROSSONI, R. D.; BARBOSA, J. O.; VILELA, S. F. G.; JORGE, A. O. C.; JUNQUEIRA, J. C. Comparison of the Hemolytic Activity between *C. albicans* and Non-*albicans* *Candida* Species. **Brazilian Oral Research**, v. 27, n. 6, p. 484–489, dez. 2013.

RÜCHEL, R.; DE BERNARDIS, F.; RAY, T. L.; SULLIVAN, P. A.; COLE, G. T. *Candida* Acid Proteinases. **Journal of Medical and Veterinary Mycology: Bi-Monthly Publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 30 Suppl 1, p. 123–132, 1992.

RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A Comparison of Secretory Proteinases from Different Strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 3, p. 233–244, set. 1982.

RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. [Antifungals for systemic use]. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 6, p. 353–362, jun. 2009.

RÜPING, M. J. G. T.; VEHRESCHILD, J. J.; CORNELLY, O. A. Patients at High Risk of Invasive Fungal Infections: When and How to Treat. **Drugs**, v. 68, n. 14, p. 1941–1962, 2008.

SABATELLI, F.; PATEL, R.; MANN, P. A.; MENDRICK, C. A.; NORRIS, C. C.; HARE, R.; LOEBENBERG, D.; BLACK, T. A.; MCNICHOLAS, P. M. In Vitro Activities of Posaconazole, Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against a Large Collection of Clinically Important Molds and Yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2009–2015, jun. 2006.

SAMARANAYAKE, Y. H.; CHEUNG, B. P. K.; YAU, J. Y. Y.; YEUNG, K. W.; SAMARANAYAKE, L. P. Genotypic, Phenotypic, and Proteomic Characterization of *Candida glabrata* during Sequential Fluconazole Exposure. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 2, n. 2, p. 117–127, maio 2011.

SANGLARD, D. Clinical Relevance of Mechanisms of Antifungal Drug Resistance in Yeasts. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 20, n. 9, p. 462- 469; quiz 470, 479, nov. 2002.

SANGLARD, D.; KUCHLER, K.; ISCHER, F.; PAGANI, J. L.; MONOD, M.; BILLE, J. Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Isolates from AIDS Patients Involve Specific Multidrug Transporters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 11, p. 2378–2386, nov. 1995.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* Species to Antifungal Agents: Molecular Mechanisms and Clinical Consequences. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73–85, fev. 2002.

SANTOS, C.; LIMA, N.; SAMPAIO, P.; PAIS, C. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Intact Cell Mass Spectrometry to Detect Emerging Pathogenic *Candida* Species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, n. 3, p. 304–308, nov. 2011.

SANTOS, A. L. S. dos. Aspartic Proteases of Human Pathogenic Fungi Are Prospective Targets for the Generation of Novel and Effective Antifungal Inhibitors. **Current Enzyme Inhibition**, v. 7, n. 2, p. 96–118, jul. 2011.

SANTOS, A. L. S. dos; DE MELLO, T. P.; RAMOS, L. de S.; BRANQUINHA, M. H. Biofilm: A Robust and Efficient Barrier to Antifungal Chemotherapy. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 01, n. 01, 2015.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. *Candida* Species: Current Epidemiology, Pathogenicity, Biofilm Formation, Natural Antifungal Products and New Therapeutic Options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. Pt 1, p. 10–24, jan. 2013.

SASSO, M.; ROGER, C.; LACHAUD, L. Rapid Emergence of *FKS* Mutations in *Candida glabrata* Isolates in a Peritoneal Candidiasis. **Medical Mycology Case Reports**, v. 16, p. 28–30, jun. 2017.

SAVASTANO, C.; DE OLIVEIRA SILVA, E.; GONÇALVES, L. L.; NERY, J. M.; SILVA, N. C.; DIAS, A. L. T. *Candida glabrata* among *Candida* Spp. from Environmental Health Practitioners of a Brazilian Hospital. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 47, n. 2, p. 367–372, jun. 2016.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic Enzymes as Virulence Factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 365–377, nov. 2005.

SENEVIRATNE, C. J.; SILVA, W. J.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Architectural Analysis, Viability Assessment and Growth Kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* Biofilms. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 11, p. 1052–1060, nov. 2009.

SENEVIRATNE, C. J.; WONG, S. S. W.; YUEN, K. Y.; MEURMAN, J. H.; PÄRNÄNEN, P.; VAARA, M.; SAMARANAYAKE, L. P. Antifungal Susceptibility and Virulence Attributes of Bloodstream Isolates of *Candida* from Hong Kong and Finland. **Mycopathologia**, v. 172, n. 5, p. 389–395, nov. 2011.

SERRANO-FUJARTE, I.; LÓPEZ-ROMERO, E.; REYNA-LÓPEZ, G. E.; MARTÍNEZ-GÁMEZ, M. A.; VEGA-GONZÁLEZ, A.; CUÉLLAR-CRUZ, M. Influence of Culture Media on Biofilm Formation by *Candida* Species and Response of Sessile Cells to Antifungals and Oxidative Stress. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–15, 2015.

SHARMA, C.; WANKHEDE, S.; MURALIDHAR, S.; PRAKASH, A.; SINGH, P. K.; KATHURIA, S.; KUMAR, D. A.; KHAN, N.; RANDHAWA, H. S.; MEIS, J. F.; CHOWDHARY, A. *Candida nivariensis* as an Etiologic Agent of Vulvovaginal Candidiasis in a Tertiary Care Hospital of New Delhi, India. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 1, p. 46–50, maio 2013.

SHIELDS, R. K.; NGUYEN, M. H.; PRESS, E. G.; KWA, A. L.; CHENG, S.; DU, C.; CLANCY, C. J. The Presence of an FKS Mutation Rather than MIC Is an Independent Risk Factor for Failure of Echinocandin Therapy among Patients with Invasive Candidiasis Due to *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4862–4869, set. 2012.

SILVA, C. T. da; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38–42, 2014.

SILVA, N. C.; NERY, J. M.; DIAS, A. L. T. Aspartic Proteinases of *Candida* Spp.: Role in Pathogenicity and Antifungal Resistance. **Mycoses**, v. 57, n. 1, p. 1–11, jan. 2014.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Biofilms of Non-*Candida albicans* *Candida* Species: Quantification, Structure and Matrix Composition. **Medical Mycology**, v. 47, n. 7, p. 681–689, 3 nov. 2009.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, Epidemiology, Pathogenicity and Antifungal Resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, mar. 2012.

SILVA-DIAS, A.; MIRANDA, I. M.; BRANCO, J.; MONTEIRO-SOARES, M.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, mar. 2015.

SIRI, L.; LEGARRAGA, P.; GARCÍA, P.; GONZÁLEZ, T.; RABAGLIATI, R. [Clinical and epidemiological changes of candidemia among adult patients from 2000 to 2013]. **Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología**, v. 34, n. 1, p. 19–26, fev. 2017.

SIVAKUMAR, V. G.; SHANKAR, P.; NALINA, K.; MENON, T. Use of CHROMagar in the Differentiation of Common Species of *Candida*. **Mycopathologia**, v. 167, n. 1, p. 47–49, jan. 2009.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M. E. Oxidative Stress and Cancer: An Overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376–390, jan. 2013.

SRIVASTAVA, V. K.; SUNEETHA, K. J.; KAUR, R. A Systematic Analysis Reveals an Essential Role for High-Affinity Iron Uptake System, Haemolysin and CFEM Domain-Containing Protein in Iron Homeostasis and Virulence in *Candida glabrata*. **The Biochemical Journal**, v. 463, n. 1, p. 103–114, out. 2014.

STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; PIŁAT, J.; SIENNICKA, K.; MAGDA, U.; KURZATKOWSKI, W. Virulence factors of *Candida albicans*. **Przegląd Epidemiologiczny**, v. 66, n. 4, p. 629–633, 2012.

STANISZEWSKA, M.; MAŁGORZATA, B.; ZBIGNIEW, O. Contribution of Aspartic Proteases in *Candida* Virulence. Protease Inhibitors against *Candida* Infections. **Current Protein & Peptide Science**, ago. 2016.

STEHR, F.; FELK, A.; GÁCSEK, A.; KRETSCHMAR, M.; MÄHNSS, B.; NEUBER, K.; HUBE, B.; SCHÄFER, W. Expression Analysis of the *Candida albicans* Lipase Gene

Family during Experimental Infections and in Patient Samples. **FEMS yeast research**, v. 4, n. 4–5, p. 401–408, jan. 2004.

STOCKMANN, C.; CONSTANCE, J. E.; ROBERTS, J. K.; OLSON, J.; DOBY, E. H.; AMPOFO, K.; STIERS, J.; SPIGARELLI, M. G.; SHERWIN, C. M. T. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antifungals in Children and Their Clinical Implications. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 53, n. 5, p. 429–454, maio 2014.

STROLLO, S.; LIONAKIS, M. S.; ADJEMIAN, J.; STEINER, C. A.; PREVOTS, D. R. Epidemiology of Hospitalizations Associated with Invasive Candidiasis, United States, 2002-2012(1). **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 7–13, jan. 2017.

SWOBODA-KOPEĆ, E.; SIKORA, M.; GOLAS, M.; PISKORSKA, K.; GOZDOWSKI, D.; NETSVYETAYEVA, I. *Candida nivariensis* in Comparison to Different Phenotypes of *Candida glabrata*. **Mycoses**, v. 57, n. 12, p. 747–753, dez. 2014.

TAIRA, C. L.; OKAY, T. S.; DELGADO, A. F.; CECCON, M. E. J. R.; DE ALMEIDA, M. T. G.; DEL NEGRO, G. M. B. A Multiplex Nested PCR for the Detection and Identification of *Candida* Species in Blood Samples of Critically Ill Paediatric Patients. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 406, jul. 2014.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, dez. 2013.

TAN, B. H.; CHAKRABARTI, A.; LI, R. Y.; PATEL, A. K.; WATCHARANANAN, S. P.; LIU, Z.; CHINDAMPORN, A.; TAN, A. L.; SUN, P.-L.; WU, U.-I.; CHEN, Y.-C.; ASIA FUNGAL WORKING GROUP (AFWG). Incidence and Species Distribution of Candidaemia in Asia: A Laboratory-Based Surveillance Study. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 946–953, out. 2015.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* Spp. Nov. to Replace *Candida*

parapsilosis Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284–292, jan. 2005.

TAY, S. T.; LOTFALIKHANI, A.; SABET, N. S.; PONNAMPALAVANAR, S.; SULAIMAN, S.; NA, S. L.; NG, K. P. Occurrence and Characterization of *Candida nivariensis* from a Culture Collection of *Candida glabrata* Clinical Isolates in Malaysia. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 307–314, out. 2014.

TEIXEIRA, H.; SILVA, L.; MAGALHÃES, J. J. F.; MATIAS, C.; MAGALHÃES, J. F. F.; LYRA, J. M. A.; MAGALHÃES, V.; LUCENA-SILVA, N.; MELO, H. R. L.; JUCÁ, M. B.; BRITO, C. a. A. Evaluation of Multiplex PCR in First Episodes of Febrile Neutropenia as a Tool to Improve Early Yeast Diagnosis in Leukemic/Preleukemic Patients. **Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, v. 22, n. 10, p. 2861–2866, out. 2014.

TELLERIA, O.; EZPELETA, G.; HERRERO, O.; MIRANDA-ZAPICO, I.; QUINDÓS, G.; CISTERNA, R. Validation of the PCR-DHPLC Method for Rapid Identification of *Candida glabrata* Phylogenetically Related Species in Different Biological Matrices. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 893–894, p. 150–156, 15 abr. 2012.

TROUVÉ, C.; BLOT, S.; HAYETTE, M.-P.; JONCKHEERE, S.; PATTEET, S.; RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H.; SYMOENS, F.; VAN WIJNGAERDEN, E.; LAGROU, K. Epidemiology and Reporting of Candidaemia in Belgium: A Multi-Centre Study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 649–655, abr. 2017.

TSANG, P. W.-K. Differential Phytate Utilization in *Candida* Species. **Mycopathologia**, v. 172, n. 6, p. 473–479, dez. 2011.

TUMBARELLO, M.; FIORI, B.; TRECARICHI, E. M.; POSTERARO, P.; LOSITO, A. R.; DE LUCA, A.; SANGUINETTI, M.; FADDA, G.; CAUDA, R.; POSTERARO, B. Risk

Factors and Outcomes of Candidemia Caused by Biofilm-Forming Isolates in a Tertiary Care Hospital. **PloS One**, v. 7, n. 3, p. e33705, 2012.

TUMBARELLO, M.; POSTERARO, B.; TRECARCHI, E. M.; FIORI, B.; ROSSI, M.; PORTA, R.; DE GAETANO DONATI, K.; LA SORDA, M.; SPANU, T.; FADDA, G.; CAUDA, R.; SANGUINETTI, M. Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1843–1850, jun. 2007.

UDAYALAXMI, null; JACOB, S.; D'SOUZA, D. Comparison Between Virulence Factors of *Candida albicans* and Non-*albicans* Species of *Candida* Isolated from Genitourinary Tract. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 8, n. 11, p. DC15-17, nov. 2014.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VERSTREPEN, K. J.; KLIS, F. M. Flocculation, Adhesion and Biofilm Formation in Yeasts. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 5–15, abr. 2006.

WAHYUNINGSIH, R.; SAHBANDAR, I. N.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; POOT, G.; MEIS, J. F.; ROZALYANI, A.; SJAM, R.; WIDODO, D.; DJAUZI, S.; BOEKHOUT, T. *Candida nivariensis* Isolated from an Indonesian Human Immunodeficiency Virus-Infected Patient Suffering from Oropharyngeal Candidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 388–391, jan. 2008.

WALKER, L. A.; GOW, N. A. R.; MUNRO, C. A. Elevated Chitin Content Reduces the Susceptibility of *Candida* Species to Caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 146–154, jan. 2013.

WALSH, T. J.; PAPPAS, P.; WINSTON, D. J.; LAZARUS, H. M.; PETERSEN, F.; RAFFALLI, J.; YANOVICH, S.; STIFF, P.; GREENBERG, R.; DONOWITZ, G.;

SCHUSTER, M.; REBOLI, A.; WINGARD, J.; ARNDT, C.; REINHARDT, J.; HADLEY, S.; FINBERG, R.; LAVERDIÈRE, M.; PERFECT, J.; GARBER, G.; FIORITONI, G.; ANAISSIE, E.; LEE, J.; NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES MYCOSES STUDY GROUP. Voriconazole Compared with Liposomal Amphotericin B for Empirical Antifungal Therapy in Patients with Neutropenia and Persistent Fever. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 4, p. 225–234, jan. 2002.

WANG, H.; XU, Y.-C.; HSUEH, P.-R. Epidemiology of Candidemia and Antifungal Susceptibility in Invasive *Candida* Species in the Asia-Pacific Region. **Future Microbiology**, v. 11, p. 1461–1477, out. 2016.

WHALEY, S. G.; BERKOW, E. L.; RYBAK, J. M.; NISHIMOTO, A. T.; BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 2173, 2016.

WILLE, M. P.; GUIMARAES, T.; FURTADO, G. H. C.; COLOMBO, A. L. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 288–292, maio 2013.

XIAO, M.; FAN, X.; CHEN, S. C.-A.; WANG, H.; SUN, Z.-Y.; LIAO, K.; CHEN, S.-L.; YAN, Y.; KANG, M.; HU, Z.-D.; CHU, Y.-Z.; HU, T.-S.; NI, Y.-X.; ZOU, G.-L.; KONG, F.; XU, Y.-C. Antifungal Susceptibilities of *Candida glabrata* Species Complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* Species Complex and *Candida tropicalis* Causing Invasive Candidiasis in China: 3 Year National Surveillance. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 3, p. 802–810, mar. 2015.

YAPAR, N. Epidemiology and Risk Factors for Invasive Candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95–105, 2014.

YARROW, D.; MEYER, S. Proposal for Amendment of the Diagnosis of the Genus *Candida* Berkhout Nom. Cons. Int. J. Syst. Bacteriol. v. 28, p. 611–615, 1978.

ZANETTE, R. A.; JESUS, F. P. K.; PILOTTO, M. B.; WEIBLEN, C.; PÖTTER, L.; FERREIRO, L.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. Micafungin Alone and in Combination Therapy with Deferasirox against *Pythium Insidiosum*. **Journal De Mycologie Medicale**, v. 25, n. 1, p. 91–94, mar. 2015.

ZHANG, J.; HUNG, G.-C.; NAGAMINE, K.; LI, B.; TSAI, S.; LO, S.-C. Development of *Candida*-Specific Real-Time PCR Assays for the Detection and Identification of Eight Medically Important *Candida* Species. **Microbiology Insights**, v. 9, p. 21–28, 2016.

ZICCARDI, M.; SOUZA, L. O. P.; GANDRA, R. M.; GALDINO, A. C. M.; BAPTISTA, A. R. S.; NUNES, A. P. F.; RIBEIRO, M. A.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. *Candida parapsilosis* (*Sensu Lato*) Isolated from Hospitals Located in the Southeast of Brazil: Species Distribution, Antifungal Susceptibility and Virulence Attributes. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 305, n. 8, p. 848–859, dez. 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo 1. First Description of *Candida nivariensis* in Brazil: Antifungal Susceptibility Profile and Potential Virulence Attributes.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; RAMOS, L. de S.; BARBEDO, L. S.; CHAVES, A. L. da S.; MURAMOTO, I. A.; SANTOS, A. L. S. dos; ALMEIDA-PAES, R.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 111, n. 1, p. 51–58, jan. 2016

First description of *Candida nivariensis* in Brazil: antifungal susceptibility profile and potential virulence attributes

Maria Helena Galdino Figueiredo-Carvalho^{1/+}, Livia de Souza Ramos², Leonardo Silva Barbedo¹,
Alessandra Leal da Silva Chaves³, Ilda Akemi Muramoto³, André Luis Souza dos Santos²,
Rodrigo Almeida-Paes¹, Rosely Maria Zancopé-Oliveira¹

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Laboratório de Micologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Geral, Laboratório de Investigação de Peptidases, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Instituto Nacional de Câncer, Laboratório de Micologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

*This study evaluated the antifungal susceptibility profile and the production of potential virulence attributes in a clinical strain of Candida nivariensis for the first time in Brazil, as identified by sequencing the internal transcribed spacer (ITS)1-5.8S-ITS2 region and D1/D2 domains of the 28S of the rDNA. For comparative purposes, tests were also performed with reference strains. All strains presented low planktonic minimal inhibitory concentrations (PMICs) to amphotericin B (AMB), caspofungin (CAS), and voriconazole. However, our strain showed elevated planktonic MICs to posaconazole (POS) and itraconazole, in addition to fluconazole resistance. Adherence to inert surfaces was conducted onto glass and polystyrene. The biofilm formation and antifungal susceptibility on biofilm-growing cells were evaluated by crystal violet staining and a XTT reduction assay. All fungal strains were able to bind both tested surfaces and form biofilm, with a binding preference to polystyrene ($p < 0.001$). AMB promoted significant reductions ($\approx 50\%$) in biofilm production by our *C. nivariensis* strain using both methodologies. This reduction was also observed for CAS and POS, but only in the XTT assay. All strains were excellent protease producers and moderate phytase producers, but lipases were not detected. This study reinforces the pathogenic potential of *C. nivariensis* and its possible resistance profile to the azolic drugs generally used for candidiasis management.*

Key words: *Candida nivariensis* - Brazil - antifungal resistance - hydrolytic enzymes - adherence - biofilm

Candida glabrata is an emerging pathogen in public and private Brazilian hospitals (Colombo et al. 2013). Moreover, it is the most common species of invasive fungal infections among non-albicans *Candida* species in North America (Lockhart et al. 2012, Pfaller et al. 2014) and Central Europe (De Luca et al. 2012, Milazzo et al. 2014). Based on molecular analysis, two new species that are closely related to and phenotypically resemble *C. glabrata* have been described: *Candida nivariensis* and *Candida bracarenensis* (Alcoba-Flórez et al. 2005b, Correia et al. 2006). *C. nivariensis* was first described in 2005 after it was isolated from clinical samples (bronchoalveolar lavage, blood culture, and urine) from three patients in the Canary Islands, which are African islands under Spanish rule (Alcoba-Flórez et al. 2005b). MALDI-TOF analyses were later demonstrated to be an efficient tool to differentiate these species (Gorton et al. 2013). Since then, other cases have been reported in Europe (Borman et al. 2008, Gorton et al. 2013, López-Soria et al. 2013, Swoboda-Kopeć et al. 2014), Asia (Fujita et al. 2007, Wahyuningsih et al. 2008, Chowdhary et al. 2010, Sharma et al. 2013, Li

et al. 2014, Tay et al. 2014, Feng et al. 2015), and Australia (Lockhart et al. 2009). The total number of *C. nivariensis* isolates described in the literature has been low in these countries. To the best of our knowledge, the isolation of *C. nivariensis* in clinical samples has not been reported to date in countries of North America and South America.

C. nivariensis isolates are less susceptible than *C. glabrata* isolates to the azolic antifungal agents [fluconazole (FLC), itraconazole (ITR), and voriconazole (VRC)] that are commonly used in the treatment of candidiasis (Borman et al. 2008). Thus, a periodic monitoring of this species is necessary to determine its antifungal resistance profile (Fujita et al. 2007, Borman et al. 2008).

Virulence factors play a crucial role in the colonisation, adhesion, invasion, dissemination, and escape from host defences. Compared with *C. albicans*, few studies have addressed the expression of virulence factors in *C. glabrata*, including the adhesion of the organism to host cells and/or tissues as well as medical device surfaces, biofilm formation, and the secretion of hydrolytic enzymes (e.g., proteases, lipases, and haemolysins) (Silva et al. 2012). Furthermore, very little is known about the virulence attributes of *C. nivariensis* (Fujita et al. 2007).

Based on the scarce knowledge of this pathogen, the present study aimed to evaluate the antifungal susceptibility profile and the production of virulence attributes in a clinical strain of *C. nivariensis* isolated from a hospital in Rio de Janeiro (RJ), Brazil. In parallel, two reference strains were included with the aim of comparing the evaluated phenotypic markers.

doi: 10.1590/0074-02760150376

+ Corresponding author: maria.helena@ini.fiocruz.br

Received 2 October 2015

Accepted 16 November 2015

MATERIALS AND METHODS

Fungal strains, growth conditions, and biochemical identification - We analysed a clinical fungal strain obtained from a patient from a public hospital of RJ who was diagnosed with non-Hodgkin's lymphoma with lesions in the nasal cavities. The clinical strain [893391 strain/Brazilian National Cancer Institute (INCA)] was isolated from a nasal secretion in 2004 and was identified by API 20 C AUX (bioMérieux, France) as *C. glabrata*. This strain was sent to the Mycology Laboratory of the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, RJ, for further study. This fungal isolate was grown on Sabouraud dextrose agar and Chromagar *Candida* medium (both at 37°C for 48 h) to evaluate its viability and purity, respectively. The confirmation of species was achieved by biochemical analysis with the Vitek 2 system (bioMérieux) using a YST card according to the manufacturer's guidelines. In addition, two reference strains were included, *C. nivariensis* WM 09.150 and *C. glabrata* ATCC 2001, for comparative purposes.

Molecular identification - Yeast cells were recovered from Sabouraud dextrose agar and used for DNA extraction with the Gentra® Puregene® Yeast and G⁺ Bacteria Kit (Qiagen, Germany). The clinical strain was identified by sequencing the internal transcribed spacer (ITS)1-5.8S-ITS2 region and D1/D2 domains of the 28S of the rDNA as previously described (Alcoba-Flórez et al. 2005b). Sequences were edited using Sequencher™ v.4.9 and compared by BLAST with sequences that were available from the National Center for Biotechnology Information/GenBank database. Phylogenetic analyses were conducted using the MEGA 4.0.2 software (Tamura et al. 2007).

Antifungal susceptibility testing against planktonic cells - In vitro antifungal susceptibility testing against planktonic cells was performed according to the recommendations proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 protocol (CLSI 2008a). Amphotericin B (AMB), posaconazole (POS), caspofungin (CAS), FLC, ITR, and VRC (Sigma-Aldrich Chemical Corporation, USA) were tested. Briefly, RPMI-1640 medium with L-glutamine and without bicarbonate (Gibco BRL, Life Technologies, The Netherlands), buffered with 0.165 M 3-*N*-morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) at pH 7, was used for the broth microdilution test. The inoculum was prepared from a 24-h fresh Sabouraud dextrose agar culture; the cells were harvested in RPMI medium and diluted to approximately $1-5 \times 10^3$ cells mL⁻¹. The plates were incubated at 35°C for 24 h. The minimal inhibitory concentrations of the drugs on planktonic cells (PMICs) were determined according to the CLSI M27-A3/ M27-S3 protocol (CLSI 2008a, b).

Production of hydrolytic enzymes - The in vitro production of extracellular hydrolytic enzymes was measured using plate assays (Price et al. 1982). Briefly, protease activity was evaluated using yeast carbon base supplemented with bovine serum albumin (Rüchel et al. 1982), phytase activity was evaluated using the calcium phytate agar plate (Tsang 2011), phospholipase activity

was assessed using egg yolk agar plate (Price et al. 1982), esterase activity was determined using the Tween agar plate (Aktas et al. 2002), and haemolytic activity was assayed using the blood agar plate (Luo et al. 2001). In this set of experiments, aliquots (10 µL) of 48-h-old cultured fungal cells (1×10^7 cells mL⁻¹) were spotted on the surface of the agar medium and incubated at 37°C for up to seven days. The diameter of the colony (*a*) and the diameter of the colony plus the precipitation zone (*b*) were measured using a digital paquimeter, and the enzymatic activities were expressed as the *Pz* value (*a/b*), as previously described (Price et al. 1982). According to this definition, low *Pz* values indicate high enzymatic production and, conversely, high *Pz* values indicate low enzymatic production. The enzymatic activity was scored into four categories: a *Pz* of 1.0 indicated no enzymatic activity, a *Pz* between 0.999-0.700 indicated low enzymatic activity, a *Pz* between 0.699-0.400 indicated moderate enzymatic activity, and a *Pz* between 0.399-0.100 indicated high enzymatic activity (Price et al. 1982).

Adhesion to abiotic substrates - The adherent ability to abiotic substrates was tested using glass and polystyrene. The glass slide were first washed with Extran for 2 h and 70% ethanol for 30 min and were then sterilised at 180°C for 2 h. Fungal cells (1×10^6 cells mL⁻¹) were placed on glass slides and on 24-well polystyrene plates and incubated at 37°C for 1 h. Subsequently, the abiotic substrates were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) to remove nonadherent cells. Five different microscopic fields were counted in each system to express the number of total fungi adhering to these substrates (Reinhart et al. 1985).

Production and antifungal susceptibility of biofilm-forming cells - Fungal cell suspensions were adjusted to 1×10^3 cells mL⁻¹ in yeast nitrogen base (YNB) medium supplemented with 0.5% glucose and transferred to 96-well polystyrene microtitre plates. The plates were incubated at 37°C for 48 h to allow biofilm formation. The biomass formation was assessed using crystal violet (CV) staining and the viable cells in biofilm were measured using a colorimetric assay that investigates the metabolic reduction of 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) (Sigma-Aldrich) to a water-soluble brown formazan product (Peeters et al. 2008). Briefly, the wells were washed three times in PBS to remove nonadherent cells. An aliquot of 100 µL of 99% methanol was added to each well for 15 min to fix the biofilm, and then the supernatant was discarded. Microplates were air-dried and 200 µL of 0.4% CV solution was added to each well and incubated at room temperature for 20 min. The dye solution was discarded and the wells were washed with 200 µL of sterile distilled water. Finally, 150 µL of 33% acetic acid was added to the stained wells and the absorbance was measured at 590 nm. For the XTT reduction assay, a solution containing 200 µL PBS with 1 mg mL⁻¹ XTT (Sigma-Aldrich) and 0.4 mM menadione (Sigma-Aldrich) was used. The plate was incubated in the dark at 37°C for 3 h. Thereafter, 100 µL of this solution was transferred to another microplate and the colorimetric change was mea-

sured at 492 nm using a microplate reader. After biofilm formation, the YNB medium was discarded and the wells were washed with 200 μ L of PBS. Then, an aliquot of 100 μ L of RPMI-1640 that was buffered with MOPS and supplemented with the antifungals prepared according to the CLSI M27-A3 protocol (CLSI 2008a) was added. The plates were incubated at 37°C for 24 h. After this last incubation, the CV staining and XTT reduction assay were performed, as described above, to detect cell biomass and viability, respectively. The minimum biofilm eradication concentrations (MBECs) were determined as the lowest concentrations of the antifungal drug that were able to reduce at least 50% of cell biomass or viability compared with the drug free growth control well (Melo et al. 2011).

Statistical analysis - All experiments were performed at least twice. The data were analysed statistically in different experimental groups using the Kruskal-Wallis test. To compare data between groups, the Mann-Whitney *U* test was used. *p*-values < 0.05 were considered to be statistically significant. The statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences v.17.0, for Windows® (SPSS Inc, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

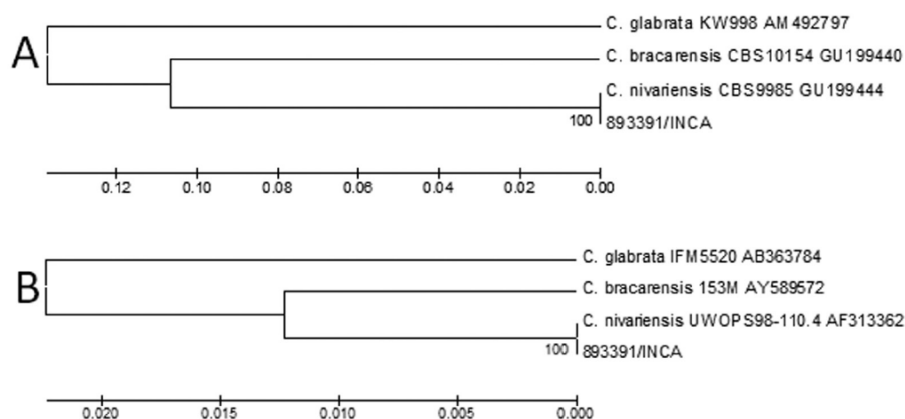
Initially, the identification of the clinical strain 893391/INCA was reconfirmed to certify its authenticity by mycology methodologies. The cultivation in chromogenic CHROMagar *Candida* medium generated white colonies with a smooth texture. Subsequently, both the carbohydrate assimilation and the metabolic enzymatic profiles were evaluated using the Vitek 2 system, which identified the clinical strain 893391/INCA as *C. glabrata* (98% probability). However, phenotypic tests were not able to discriminate among the three species of the *C. glabrata* complex; therefore, molecular methods were applied to confirm the identification of this clinical

strain (Alcoba-Flórez et al. 2005b, Wahyuningsih et al. 2008, Romeo et al. 2009, Enache-Angoulvant et al. 2011, López-Soria et al. 2013).

Genomic sequences obtained from our clinical strain showed 100% similarity with the GU199444 (ITS region) and AF313362 (D1/D2 domains) sequences found in the GenBank database, thus confirming its identity as *C. nivariensis* rather than *C. glabrata* (Figure). The obtained sequences with respect to the ITS1-5.8S-ITS2 region and D1/D2 domains of the 28S of the rDNA of the 893391/INCA strain were deposited in GenBank under the accessions KJ957824 and KJ957825, respectively.

According to a simple review of the current published literature (Alcoba-Flórez et al. 2005a, Fujita et al. 2007, Borman et al. 2008, Wahyuningsih et al. 2008, Lockhart et al. 2009, Chowdhary et al. 2010, Gorton et al. 2013, López-Soria et al. 2013, Sharma et al. 2013, Li et al. 2014, Swoboda-Kopeć et al. 2014, Tay et al. 2014, Feng et al. 2015), 55 isolates of *C. nivariensis* have been described in 35 cases in European countries, 19 cases in Asia, and one case report in Australia (Table I). Therefore, there are no cases of *C. nivariensis* in the American continent. Hence, to the best of our knowledge, this is the first report of *C. nivariensis* in South America, specifically in Brazil. *C. nivariensis* has been found in different clinical samples, including bronchoalveolar lavage, blood, urine, catheter, sputum, lung biopsy, pleural fluid, vaginal swab, toenail, and other clinical specimens, but until now, it has not been isolated from a nasal secretion as the 893391/INCA strain (Table I).

Concerning the antifungal susceptibility profile (Table II), both the *C. nivariensis* 893391/INCA strain and the reference strains presented low PMICs to AMB, CAS, and VRC. The low MICs to AMB, CAS, and VRC reported herein corroborate the results of previous studies (Chowdhary et al. 2010, Sharma et al. 2013,



Dendrograms based on analysis of internal transcribed spacer (ITS) (A) and D1/D2 (B) regions of the 893391 strain and sequences from GenBank. The evolutionary histories of both trees were inferred using the UPGMA method. The percentage of replicate trees in which the associated taxon clustered in the bootstrap test (1,000 replicates) is shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the maximum composite likelihood method and were expressed as the number of base substitutions per site. There were 700 ITS and 580 D1/D2 positions in the final dataset.

TABLE I
Candida nivariensis isolates described in the literature

Reference	Country	Total of isolates (n)	Source of isolates (n)	Clinical details	Susceptibility antifungal profile		
					S/low MIC	SDD/I	R/high MIC
Alcoba-Flórez et al. (2005b)	Spain	3	Broncho-alveolar lavage (1), blood culture (1), urine (1)	Multiple pulmonary abscesses, pancreatic abscess, lumbar pain	Not stated	-	-
Fujita et al. (2007)	Japan	1	Catheter (1)	Rheumatoid arthritis	-	-	FLC
Wahyuningsih et al. (2008)	Indonesia	1	Oral rinse (1)	HIV infection	FLC, ITC, VRC and CAS/AMB, 5FC, POS, and ISA	-	-
Borman et al. (2008)	UK	16	Blood (3), oral cavity (3), pelvic abscess (2), ascetic fluid (1), peritoneal fluid (1), lung biopsy (1), not stated (5)	Oral candidosis, neutropenia, pneumonia, malignancy, peritonitis, and others	-	-	FLC and ITC/5FC and VRC
Lockhart et al. (2009)	Australia	1	Pleural fluid (1)	Not stated	FLC	-	-
Chowdhary et al. (2010)	India	2	Sputum (1), blood (1)	HIV infection, diabetes	FLC, ITC, VRC and CAS/AMB, 5FC, and POS	-	-
López-Soria et al. (2013)	Spain	2	Blood (1), catheter (1)	Intestinal fistula associated to a severe malnutrition	Echinocandins, FLC, and VRC/AMB	ITC	-
Sharma et al. (2013)	India	5	High vaginal swab (4), bronchoalveolar lavage (1)	Vulvovaginal candidiasis, not stated	VRC, ITC and echinocandins/AMB, POS, and ISA	-	FLC
Gorton et al. (2013)	UK	1	Urine (1)	Renal transplant	-	-	FLC
Li et al. (2014)	China	7	Vaginal swab (7)	Vulvovaginal candidiasis	NYT	FLC, ITC, MCN, and CLT	-
Tay et al. (2014)	Malaysia	2	Blood culture (1), vaginal swab (1)	Not stated, vulvovaginal candidiasis	FLC, VRC, and CAS/AMB and POS	-	CLT
Swoboda-Kopec et al. (2014)	Poland	13	Urine (8), lower respiratory tract (3), surgical specimens (1), body fluids (1)	Not stated	Not stated	Not stated	-
Feng et al. (2015)	China	1	Toenail (1)	Not stated	FLC, VRC, and POS	-	ITC
Present paper (2015)	Brazil	1	Nasal secretion (1)	Non-Hodgkin lymphoma	VRC and CAS/AMB	ITC	FLC/POS

AMB: anfetoterin B; CAS: caspofungin; CLT: clotrimazole; FLC: fluconazole; HIV: human immunodeficiency virus; I: intermediate; ISA: isaconazole; ITC: itraconazole; MCN: iconazole; MIC: minimal inhibitory concentration; NYT: nistatina; POS: posaconazole; R: resistant; S: susceptible; SDD: susceptible-dose dependent; VRC: voriconazole; 5FC: flucytosine.

TABLE II
Antifungal susceptibility of *Candida nivariensis* and *Candida glabrata* planktonic and sessile cells

Antifungals	PMIC (mg L ⁻¹)/susceptibility profile ^a			CV MBEC (mg L ⁻¹)/% reduction of biomass			XTT MBEC (mg L ⁻¹)/% reduction of viability		
	<i>C. glabrata</i>			<i>C. glabrata</i>			<i>C. glabrata</i>		
	WM 09.150	ATCC 2001	893391/INCA	WM 09.150	ATCC 2001	893391/INCA	WM 09.150	ATCC 2001	893391/INCA
AMB	0.25/NA ^b	0.12/NA ^b	≥ 16/54.2	≥ 16/30.7	≥ 16/28.4	≥ 16/54	≥ 16/73.1	≥ 16/72.8	≥ 16/13.8
CAS	0.03/S	0.12/S	≥ 8/31.6	≥ 8/22.8	≥ 8/40.4	≥ 8/63.7	≥ 8/0	≥ 8/79.8	≥ 8/79.8
FLC	≥ 64/R	8/SDD	≥ 64/6.7	≥ 64/23.7	≥ 64/13.7	≥ 64/1.5	≥ 64/15	≥ 64/0	≥ 64/0
ITC	0.25/SDD	0.06/S	≥ 16/19.1	≥ 16/31.1	≥ 16/1.7	≥ 16/16	≥ 16/0	≥ 16/10.7	≥ 16/10.7
VRC	0.25/S	0.03/S	≥ 16/13.1	≥ 16/41.7	≥ 16/20.5	≥ 16/20	≥ 16/7	≥ 16/22	≥ 16/22
POS	2/NA ^c	0.03/NA ^c	≥ 16/21.5	≥ 16/24.3	≥ 16/6.9	≥ 16/54.5	≥ 16/29.3	≥ 16/13.8	≥ 16/13.8

a: determined according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-S3 (CLSI 2008b); b: the CLSI has not defined interpretative cut-offs for amphotericin B (AMB). In general, isolates with AMB minimal inhibitory concentration (MIC) > 1 mg L⁻¹ are likely to be resistant to this drug (CLSI 2008a); c: breakpoints not established by CLSI (CLSI 2008b, 2012); CAS: caspofungin; CLT: clotrimazole; CV: crystal violet; FLC: fluconazole; ITC: itraconazole; MBEC: minimum biofilm eradication concentration; NA: not applicable; PMIC: MIC of the drugs on planktonic cells; POS: posaconazole; R: resistant; S: susceptible; SDD: susceptible-dose dependent; VRC: voriconazole; XTT: 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide.

Gil-Alonso et al. 2015). However, only our strain showed elevated PMICs for POS and ITC as well as FLC resistance. In a study conducted by Borman et al. (2008), 16 isolates of *C. nivariensis* were tested for seven antifungals, including POS and ITC. These isolates showed high PMIC values (2 and > 16 mg L⁻¹, respectively) to these drugs. Similar results were found in the present study. Other studies also revealed high FLC PMICs (Fujita et al. 2007, Borman et al. 2008, Sharma et al. 2013) (64, 128, 16 mg L⁻¹, respectively). Despite the lack of clinical breakpoints (CBP) and defined epidemiological cut-off values (ECV) for this species, *C. nivariensis* has been described in the literature as an emerging pathogenic fungus with a varying susceptibility to azoles (Borman et al. 2008). According to the CBP and ECV of its sibling species *C. glabrata* (Pfalter & Diekema 2012, Espinel-Ingroff et al. 2014), our strain would be resistant to FLC (PMIC ≥ 64 mg L⁻¹) and non-wild type to FLC (ECV > 8 mg L⁻¹) and POS (ECV > 1 mg L⁻¹) (Table II).

The pathogenicity of *Candida* species is associated with a multitude of virulence factors, including the ability to evade host defences, adhesion to host tissue and/or medical devices, the ability to form biofilm and the production of tissue-damaging hydrolytic enzymes such as proteases, lipases, and haemolysins (Silva et al. 2012). Along this line of thinking, we demonstrated that the *C. nivariensis* 893391/INCA strain, the *C. nivariensis* WM 09.150 reference strain, and the *C. glabrata* ATCC 2001 type strain were excellent protease producers (Table III), with no significant differences in the *Pz* values of these strains ($p > 0.05$). Jang et al. (2011) also found protease activity in six of 38 *C. glabrata* isolates from fresh feral pigeon faeces, but the production of proteases was moderate (mean *Pz* = 0.65 ± 0.17). Because *C. glabrata* does not possess classical secreted aspartic protease genes in its genome (Parra-Ortega et al. 2009, Silva et al. 2014), we believe that the enzymatic degradation of albumin verified herein may be due the production of yapsins (YPS). YPS are a family of five nonsecreted glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked aspartic proteases in *Saccharomyces cerevisiae* that have homologues in *C. glabrata*, which have a well-known role in cell wall integrity (Krysan et al. 2005) and cell-cell interactions (Silva et al. 2014). The role of YPS-family proteases coded by 11 genes is known among the *C. glabrata* virulence factors that have been described. The expression of YPS genes significantly increases the capacity of the fungus to survive inside human macrophages (Krysan et al. 2005). Swoboda-Kopeć et al. (2014) confirmed the prevalence of three genes (*YPS2*, *YPS4*, and *YPS6*) in the majority of *C. glabrata* strains isolated from clinical specimens. However, the prevalence of these genes in 13 clinical isolates of *C. nivariensis* was low (Swoboda-Kopeć et al. 2014). Regarding the phytase activity, *C. nivariensis* 893391/INCA strain and *C. nivariensis* WM 09.150 reference strain presented a moderate production of phytase, whereas the type strain of *C. glabrata* exhibited a low production of this enzyme (Table III). Phytase is a phosphohydrolase that cleaves phytate and releases inorganic phosphate and inositol, which are both essential nutrients for all living cells (Lei & Porres 2003). In

TABLE III
Production of hydrolytic enzymes, adhesion to abiotic substrates,
and biofilm formation detected in *Candida nivariensis* and *Candida glabrata* strains

Species/code	Hydrolytic activities		Adhesion to abiotic substrates (1 h)		Biofilm	
	Protease (P_z) ^a	Phytase (P_z) ^a	Glass ^b	Polystyrene ^b	Biomass ^c	Viability ^c
<i>C. nivariensis</i>						
893391/INCA	0.347 ± 0.040	0.629 ± 0.025	17.0 ± 4.4	25.4 ± 4.9	0.330 ± 0.045	1.173 ± 0.054
WM 09.150	0.375 ± 0.000	0.634 ± 0.047	14.0 ± 3.0	23.9 ± 2.4	0.440 ± 0.095	0.811 ± 0.080
<i>C. glabrata</i>						
ATCC 2001	0.357 ± 0.034	0.714 ± 0.00	16.0 ± 3.0	24.1 ± 5.3	0.858 ± 0.009	1.084 ± 0.028

a: the protease and phytase activities were measured by the formation of a clear halo around the colony and expressed as P_z value as previously described (Price et al. 1982) (the P_z value was scored into four categories: P_z of 1.0 indicated no enzymatic activity, P_z between 0.999-0.700 indicated low enzymatic activity, P_z between 0.699-0.400 corresponded to moderate enzymatic activity, and P_z between 0.399-0.100 mean high enzymatic activity); *b*: the results were expressed as number of fungal cells per microscopic field; *c*: the biomass and viability of biofilm were measured by crystal violet incorporation at 540 nm and 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide reduction at 492 nm, respectively. All the results were reported as the arithmetic means ± standard deviation.

Candida species, such as the *Candida parapsilosis* complex (Abi-Chacra et al. 2013), maintaining a supply of inositol and phosphate mediated by phytase seems to be especially important for pathogen survival and persistence in the host (Tsang 2011). In this study, the three tested strains were negative for the production of phospholipase, esterase, and haemolysins under the employed experimental conditions. Udayalaxmi et al. (2014) did not find phospholipase activity in 14 *C. glabrata* strains isolated from the genitourinary tract, but all of their *C. glabrata* strains presented haemolytic activity.

C. nivariensis 893391/INCA strain, as well as both reference strains, was able to bind to inert surfaces, with a predilection to polystyrene compared to glass ($p < 0.001$) (Table III). Adhesion is a crucial step for beginning and establishing an infectious process. The adhesive ability of *Candida* species is associated with the presence of specific cell-wall glycoproteins known as adhesins. The ability of *C. glabrata* to adhere to host epithelial tissue is mediated by a number of GPI-linked adhesion genes, including the *EPA* gene family (De Groot et al. 2008). In *C. glabrata*, the deletion of the *EPA1* gene reduces the in vitro adhesion to epithelial cells, thus highlighting the essential role of this gene in adherence to biotic substrates (Cormack et al. 1999, de Las Peñas et al. 2003). In contrast, *EPA6*-mediated adhesion is engaged in strong hydrophobic interactions with abiotic surfaces and is the principal adhesin involved in biofilm formation (El-Kirat-Chatel et al. 2015).

Biofilm formation is considered to be an important virulence attribute of *Candida* species and is associated with recurrent infections and treatment failures by limiting the penetration of drugs through the biofilm matrix (Mukherjee & Chandra 2004). In this study, *C. glabrata* ATCC 2001 type strain produced a significantly greater amount of biofilm biomass ($p < 0.001$) than did both *C. nivariensis*

893391/INCA and *C. nivariensis* WM 09.150 reference strain (Table III). The viability of cells forming biofilm showed a significant difference among *C. nivariensis* WM 09.150 and *C. glabrata* ATCC 2001 type strain ($p < 0.05$) as well as between 893391/INCA strain and WM 09.150 ($p < 0.05$) (Table III). Our strain, however, showed a biofilm profile of viability, as determined by the XTT assay, which was more related to the *C. glabrata* ATCC 2001 type strain ($p > 0.05$) (Table III). According to the literature, *C. glabrata* clinical isolates are capable of forming biofilm and their presence during the infection has been associated with higher morbidity and mortality rates compared with isolates that are unable to form biofilm (Kumamoto 2002).

To determine whether antifungal agents (AMB, CAS, FLC, ITC, VRC, and POS) could disarticulate the biofilms, they were exposed to different concentrations of antifungal agents. No significant reductions in the number of viable cells were observed for the lower concentrations of antifungal agents tested against the three analysed strains (data not shown). In the present study, the highest tested concentration of AMB, CAS, and POS (16, 8, and 16 mg L⁻¹, respectively) was able to inhibit the viability of *C. nivariensis* 893391/INCA strain by more than 50% compared with the nontreated fungal cells. Similar results with these antifungal drugs were found for the *C. nivariensis* WM 09.150 reference strain and *C. glabrata* ATCC 2001 type strain. The reduction in viability for FLC, ITC, and VRC was low, at less than 30% for each of the strains. Concerning the total biomass (Table II), *C. nivariensis* 893391/INCA strain also presented a greater than 50% reduction of biomass at an AMB concentration of 16 mg/L. The highest concentrations of the other antifungal drugs yielded less than a 32% reduction in biomass for our clinical strain. The two reference strains presented less than a 42% reduction in biomass for all of the highest concentrations of the six tested antifungal drugs.

We observed that our MBECs values are much higher than PMICs values for all six tested antifungal drugs. Similar results were found for *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* (Melo et al. 2011). Fonseca et al. (2014) evaluated the effects of FLC on the formation and control of *C. glabrata* biofilm and they did not observe a reduction in the number of viable cells, even when antifungal drugs were applied at high concentrations. Therefore, further studies utilising higher antifungal concentrations are necessary to better determine the MBECs values of *C. glabrata* and *C. nivariensis* strains.

The present study describes, for the first time, the isolation of *C. nivariensis* from an oncologic patient in Brazil and reports its potential antifungal resistance to FLC, which is the most common antifungal drug used for candidiasis treatment. As a warning, other countries in the Americas need to search for *C. nivariensis* by means of molecular methods in their *C. glabrata* culture collections because standard biochemical analytical methods are not sufficient to properly identify *C. nivariensis*. We strongly believe that the real incidence of *C. nivariensis* in our continent may be underestimated due to the lack of adequate molecular surveillance strategies.

In addition, to our knowledge, this is the first study to evaluate the in vitro production of extracellular hydrolytic enzymes and biofilm formation ability in clinical strain of *C. nivariensis*. Further studies are needed to monitor the frequency of this species in clinical isolates, their potential virulence factors, and their susceptibility to antifungals, mainly due to the phenomenon of azolic resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr Joshua Nosanchuk, for editorial assistance and helpful comments, to Wieland Meyer, for providing the *C. nivariensis* WM 09.150 reference strain, to Marcel Treptow Ferreira, for statistical assistance. Automated sequencing was performed using the DNA sequencing platform (ABI-3730) (Applied Biosystems) (PDTIS/Fiocruz).

REFERENCES

- Abi-Chacra ÉA, Souza LO, Cruz LP, Braga-Silva LA, Gonçalves DS, Sodré CL, Ribeiro MD, Seabra SH, Figueiredo-Carvalho MH, Barbedo LS, Zancopé-Oliveira RM, Ziccardi M, Santos AL 2013. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. *FEMS Yeast Res* 13: 831-848.
- Aktas E, Yigit N, Ayyildiz A 2002. Esterase activity in various *Candida* species. *J Int Med Res* 30: 322-324.
- Alcoba-Flórez J, Arévalo MP, González-Paredes FJ, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, Méndez-Álvarez S 2005a. PCR protocol for specific identification of *Candida nivariensis*, a recently described pathogenic yeast. *J Clin Microbiol* 43: 6194-6196.
- Alcoba-Flórez J, Méndez-Álvarez S, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, del Pilar AM 2005b. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J Clin Microbiol* 43: 4107-4111.
- Borman AM, Petch R, Linton CJ, Palmer MD, Bridge PD, Johnson EM 2008. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. *J Clin Microbiol* 46: 933-938.
- Chowdhary A, Randhawa HS, Khan ZU, Ahmad S, Juneja S, Sharma B, Roy P, Sundar G, Joseph L 2010. First isolations in India of *Candida nivariensis*, a globally emerging opportunistic pathogen. *Med Mycol* 48: 416-420.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2008a. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. CLSI document M-27A3*, 3rd ed., CLSI, Wayne, 40 pp.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2008b. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Third informational supplement, CLSI document M27-S3*, CLSI, Wayne, 28 pp.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2012. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Fourth informational supplement, CLSI document M27-S4*, CLSI, Wayne, 32 pp.
- Colombo AL, Garnica M, Camargo LFA, da Cunha CA, Bandeira AC, Borghi D, Campos T, Senna AL, Didier MEV, Dias VC, Nucchi M 2013. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol* 51: 38-44.
- Cormack BP, Ghori N, Falkow S 1999. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* 285: 578-582.
- Correia A, Sampaio P, James S, Pais C 2006. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 313-317.
- De Groot PW, Kraneveld EA, Yin QY, Dekker HL, Gross U, Crielaard W, de Koster CG, Bader O, Klis FM, Weig M 2008. The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesion-like wall proteins. *Eukaryot Cell* 7: 1951-1964.
- de las Peñas A, Pan SJ, Castaño I, Alder J, Creqq R, Comarck BP 2003. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAPI- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* 17: 2245-2258.
- De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Calabr M, Casari E 2012. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiol* 35: 459-468.
- El-Kirat-Chatel S, Beaussart A, Derclaye S, Alsteens D, Kuchariková S, Van Dijck P, Dufrêne YF 2015. Force nanoscopy of hydrophobic interactions in the fungal pathogen *Candida glabrata*. *ACS Nano* 9: 1648-1655.
- Enache-Angoulvant A, Guitard J, Grenouillet F, Martin T, Durrens P, Fairhead C, Hennequin C 2011. Rapid discrimination between *Candida glabrata*, *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* by use of a singleplex PCR. *J Clin Microbiol* 49: 3375-3379.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Bustamante B, Canton E, Fothergill A, Fuller J, González GM, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Martin-Mazuelos E, Meis JF, Melhem MS, Ostrosky-Zeichner L, Pelaez T, Szezs MW, St-Germain G, Bonfietti LX, Guarro J, Turnidge J 2014. Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 2006-2012.
- Feng X, Ling B, Yang X, Liao W, Pan W, Yao Z 2015. Molecular identification of *Candida* species isolated from onychomycosis in Shanghai, China. *Mycopathologia* 180: 365-371.
- Fonseca E, Silva S, Rodrigues CF, Alves CT, Azeredo J, Henriques M 2014. Effects of fluconazole on *Candida glabrata* biofilms and its relationship with ABC transport gene expression. *Biofouling* 30: 447-457.

- Fujita S, Senda Y, Okusi T, Ota Y, Takada H, Yamada K, Kawano M 2007. Catheter-related fungemia due to fluconazole-resistant *Candida nivariensis*. *J Clin Microbiol* 45: 3459-3461.
- Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E, Quindós G 2015. In vitro fungicidal activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata*, *Candida bracarensis*, and *Candida nivariensis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 3615-3618.
- Gorton RL, Jones GL, Kibbler CC, Collier S 2013. *Candida nivariensis* isolated from a renal transplant patient with persistent candiduria - Molecular identification using ITS PCR and MALDI-TOF. *Med Mycol Case Rep* 2: 156-158.
- Jang YH, Lee SJ, Lee JH, Chae HS, Kim SH, Choe NH 2011. Prevalence of yeast-like fungi and evaluation of several virulence factors from feral pigeons in Seoul, Korea. *Lett Appl Microbiol* 52: 367-371.
- Krysan DJ, Ting EL, Abejón C, Kroos L, Fuller RS 2005. Yapins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 4: 1364-1374.
- Kumamoto CA 2002. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 5: 608-611.
- Lei XG, Porres JM 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol Lett* 25: 1787-1794.
- Li J, Shan Y, Fan S, Liu X 2014. Prevalence of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in vulvovaginal candidiasis. *Mycopathologia* 178: 279-283.
- Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, Baughman W, Stein B, Hollick R, Park BJ, Chiller T 2012. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies into two US cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol* 50: 3435-3442.
- Lockhart SR, Messer SA, Gherna M, Bishop JA, Merz WG, Pfaller MA, Diekema DJ 2009. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a large global collection of *Candida glabrata* isolates: comparison to the literature. *J Clin Microbiol* 47: 1216-1217.
- López-Soria LM, Bereciartura E, Santamaría M, Soria LM, Hernández-Almaraz JL, Mularoni A, Nieto J, Montejo M 2013. Primer caso de fungemia asociada a catéter por *Candida nivariensis* en la Península Ibérica. *Rev Iberoam Micol* 30: 69-71.
- Luo G, Samaranyake LP, Yau JY 2001. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 39: 2971-2974.
- Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL 2011. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp isolates including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol* 49: 253-262.
- Milazzo L, Peri AM, Mazzali C, Grande R, Cazzani C, Ricaboni D, Castelli A, Raimondi 2014. Candidaemia observed at a university hospital in Milan (northern Italy) and review of published studies from 2010 to 2014. *Mycopathologia* 78: 227-241.
- Mukherjee PK, Chandra J 2004. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat* 7: 301-309.
- Parra-Ortega B, Cruz-Torres H, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C 2009. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 505-512.
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 72: 157-165.
- Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, Franks B, Azie NE 2014. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the prospective antifungal therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS ONE* 9: e101510.
- Pfaller MA, Diekema DJ 2012. 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* 50: 2846-2856.
- Price MF, Willinson ID, Gentry LO 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 7-14.
- Reinhart H, Muller G, Sobel JD 1985. Specificity and mechanism of in vitro adherence of *Candida albicans*. *Ann Clin Lab Sci* 15: 406-413.
- Romeo O, Scordino F, Pernice I, Lo Passo C, Criseo G 2009. A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. *J Microbiol Methods* 79: 117-120.
- Rüchel R, Tegeler R, Trost M 1982. Comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 233-244.
- Sharma C, Wankhede S, Muralidhar S, Prakash A, Singh PK, Kathuria S, Kumar DA, Khan N, Randhawa HS, Meis JF, Chowdhary A 2013. *Candida nivariensis* as an etiologic agent of vulvovaginal candidiasis in a tertiary care hospital of New Delhi, India. *Diagn Microbiol Infect Dis* 76: 46-50.
- Silva NC, Nery JM, Dias AL 2014. Aspartic proteinases of *Candida* spp: role in pathogenicity and antifungal resistance. *Mycoses* 57: 1-11.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity, and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 36: 288-305.
- Swoboda-Kopeć E, Sikora M, Golas M, Piskorska K, Gozdowski D, Netsvyetayeva I 2014. *Candida nivariensis* in comparison to different phenotypes of *Candida glabrata*. *Mycoses* 57: 747-753.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Tay ST, Lotfalikhani A, Sabet NS, Ponnampalavanar S, Sulaiman S, Na SL, Ng KP 2014. Occurrence and characterization of *Candida nivariensis* from a culture collection of *Candida glabrata* clinical isolates in Malaysia. *Mycopathologia* 178: 307-314.
- Tsang PW 2011. Differential phytate utilization in *Candida* species. *Mycopathologia* 172: 473-479.
- Udayalaxmi J, Jacob S, D'Souza D 2014. Comparison between virulence factors of *Candida albicans* and non-albicans species of *Candida* isolated from genitourinary tract. *J Clin Diagn Res* 8: 15-17.
- Wahyuningsih R, SahBandar IN, Theelen B, Hagen F, Poot G, Meis JF, Rozalyani A, Sjam R, Widodo D, Djauzi S, Boekhout T 2008. *Candida nivariensis* isolated from an Indonesian human immunodeficiency virus-infected patient suffering from oropharyngeal candidiasis. *J Clin Microbiol* 46: 388-391.

APÊNDICE B – Artigo 2. Relationship between the Antifungal Susceptibility Profile and the Production of Virulence-Related Hydrolytic Enzymes in Brazilian Clinical Strains of *Candida glabrata*.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; RAMOS, L. de S.; BARBEDO, L. S.; DE OLIVEIRA, J. C. A.; DOS SANTOS, A. L. S.; ALMEIDA-PAES, R.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.

Mediators of Inflammation, v. 2017, p. 8952878, 2017

Research Article

Relationship between the Antifungal Susceptibility Profile and the Production of Virulence-Related Hydrolytic Enzymes in Brazilian Clinical Strains of *Candida glabrata*

Maria Helena Galdino Figueiredo-Carvalho,¹ Livia de Souza Ramos,²
 Leonardo Silva Barbedo,¹ Jean Carlos Almeida de Oliveira,¹ André Luis Souza dos Santos,²
 Rodrigo Almeida-Paes,¹ and Rosely Maria Zancopé-Oliveira¹

¹Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
²Laboratório de Investigação de Peptidases, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Rosely Maria Zancopé-Oliveira; rosely.zancope@ini.fiocruz.br

Received 16 November 2016; Revised 6 March 2017; Accepted 16 April 2017; Published 26 July 2017

Academic Editor: Ildinete Silva-Pereira

Copyright © 2017 Maria Helena Galdino Figueiredo-Carvalho et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Candida glabrata is a facultative intracellular opportunistic fungal pathogen in human infections. Several virulence-associated attributes are involved in its pathogenesis, host-pathogen interactions, modulation of host immune defenses, and regulation of antifungal drug resistance. This study evaluated the in vitro antifungal susceptibility profile to five antifungal agents, the production of seven hydrolytic enzymes related to virulence, and the relationship between these phenotypes in 91 clinical strains of *C. glabrata*. All *C. glabrata* strains were susceptible to flucytosine. However, some of these strains showed resistance to amphotericin B (9.9%), fluconazole (15.4%), itraconazole (5.5%), or micafungin (15.4%). Overall, *C. glabrata* strains were good producers of catalase, aspartic protease, esterase, phytase, and hemolysin. However, caseinase and phospholipase in vitro activities were not detected. Statistically significant correlations were identified between micafungin minimum inhibitory concentration (MIC) and esterase production, between fluconazole and micafungin MIC and hemolytic activity, and between amphotericin B MIC and phytase production. These results contribute to clarify some of the *C. glabrata* mechanisms of pathogenicity. Moreover, the association between some virulence attributes and the regulation of antifungal resistance encourage the development of new therapeutic strategies involving virulence mechanisms as potential targets for effective antifungal drug development for the treatment of *C. glabrata* infections.

1. Introduction

Candida glabrata is a facultative intracellular opportunistic fungal pathogen, with the ability to survive and replicate in several cell types, such as osteoblasts [1], neutrophils [2], and macrophages [3]. This yeast can be isolated from different areas of the human body such as mouth, gastrointestinal tract, and vaginal mucosa, without causing disease in most individuals [4]. Nevertheless, due to the increased use of immunosuppressive drugs and the advent of AIDS, the frequency of *C. glabrata* infections has significantly increased worldwide in the last years [5–8].

In the last decade, two new species phenotypically related to *C. glabrata* have been described in the literature: *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. These three species are phenotypically indistinguishable, but genetically heterogeneous [9, 10]. It is necessary to periodically monitor the *C. glabrata* species complex in order to determine the frequency of these clinically relevant *Candida* species, their geographical distribution, their virulence attributes, and their propensity to harbor antifungal resistance mechanisms [11, 12].

The therapeutic and prophylactic use of azole antifungals administered for prolonged periods to invasive candidiasis treatment, especially in immunocompromised patients, has

contributed to the increase phenomenon of resistance in *C. glabrata* [5, 7, 13]. The echinocandins have emerged as preferred agents for most episodes of candidemia and invasive candidiasis according to the recent guideline for the management of candidiasis [14]. Nevertheless, echinocandin resistance is increasing in *C. glabrata* [15], including among fluconazole-resistant isolates [5, 15, 16].

The pathogenicity of *Candida* spp. is facilitated by expression on several virulence-associated factors, especially the adherence to host cells, the ability to form biofilms, the resistance to hydrogen peroxide and derivatives, and the capacity to produce and secrete hydrolytic enzymes, particularly proteases, phospholipases, and hemolysins [17, 18]. In comparison with *C. albicans*, there are fewer studies about the potential virulence attributes produced by *C. glabrata*.

The present study aimed to evaluate the in vitro antifungal susceptibility profile, the production of hydrolytic enzymes, and the relationship between these phenotypes in a collection of *C. glabrata* clinical strains isolated from Brazilian hospitals.

2. Materials and Methods

2.1. Fungal Strains. A total of 91 yeast strains, collected between 1998 and 2015 in two tertiary hospitals located in Rio de Janeiro, Brazil, and preliminarily identified by the API 20C AUX (bioMérieux, France) as *C. glabrata*, were included in this study. Strains were isolated from several clinical specimens, such as gastric aspirate ($n = 1$); renal abscess secretion ($n = 1$); pleural fluid ($n = 1$); secretion of surgical drain ($n = 1$); secretion of postoperative wound ($n = 1$); ascitic fluid ($n = 2$); abdominal secretion ($n = 3$); peritoneal fluid ($n = 4$); sputum ($n = 4$); venous catheter ($n = 4$); bronchoalveolar lavage ($n = 5$); vaginal secretion ($n = 7$); feces ($n = 9$); tracheal secretion ($n = 10$); urine ($n = 13$); and blood ($n = 25$). Before the experiments, these clinical strains were recovered from storage (-20°C) and grown on Sabouraud Dextrose Agar and CHROMagar *Candida* medium (both at 37°C for 48 h) in order to evaluate their viability and purity, respectively. The phenotypic confirmation of the species after storage was achieved by a biochemical analysis with the Vitek 2 system (bioMérieux, Marcy-L'Étoile, France) using the YST card according to the manufacturer's guidelines. In addition, *C. glabrata* ATCC 2001 type strain was included as a control strain in all experiments.

2.2. Molecular Identification. Yeast cells obtained from pure colonies were recovered from Sabouraud Dextrose Agar and used for DNA extraction with the Gentra® Puregene® Yeast and G+ Bacteria Kit (Qiagen®). The strains were identified by sequencing the ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA as previously described [9], using the primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3'). Sequences were edited using the Sequencher™ version 4.9 and compared by BLAST with sequences available from the NCBI/GenBank database.

2.3. Antifungal Susceptibility Testing. In vitro antifungal susceptibility testing was performed according to the recommendations proposed by the Clinical and Laboratory Standards

Institute (CLSI) M27-A3 protocol [19]. Amphotericin B (AMB), fluconazole (FLC), itraconazole (ITC), micafungin (MCF), and 5-flucytosine (5-FC) (Sigma-Aldrich Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA) were tested. Briefly, RPMI 1640 medium with L-glutamine and without bicarbonate (Gibco BRL, Life Technologies, Woerden, The Netherlands), buffered with 0.165 M 3-*N*-morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), pH 7.0, was used for the broth microdilution test. Two-fold dilutions of the drugs were performed and distributed in 96-well flat bottom plates in concentrations ranging from 64–0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for FLC and 5-FC, 8–0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for AMB and ITC, or 4–0.008 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for MCF. The fungal inoculum was prepared from a 24 h Sabouraud Dextrose Agar culture incubated at 35°C ; the cells were harvested in RPMI medium and diluted to about $1\text{--}5 \times 10^3$ cells/mL. The plates were incubated at 35°C for 24 h. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of the drugs were determined according to the CLSI M27-A3 recommendations [19]; and the MIC values for AMB, ITC, and 5-FC were interpreted following the CLSI M27-S3 protocol; and the MIC values for FLC and MCF were interpreted according to the CLSI M27-S4 protocol [20, 21]. MICs were validated after a second experiment performed under the same conditions with the same MIC value verified for each strain.

2.4. Production of Hydrolytic Enzymes. The production of hydrolytic enzymes was carried out in agar plate assays as described previously by Price et al. [22]. Briefly, the aspartic protease activity was determined using 1.17% yeast carbon base medium supplemented with 0.2% bovine serum albumin according to Rùchel et al. [23]. Caseinase activity was assessed using Sabouraud Dextrose Agar provided with 1% casein as previously described by Ziccardi et al. [24]. The determination of phospholipase activity was performed using the egg yolk agar plate method (2% glucose, 1% peptone, 0.5% yeast extract, 4% NaCl, 0.074% CaCl_2 , 1.5% agar, then, 2% of fresh egg yolk was added to the medium) as previously described by Price et al. [22]. The esterase production was assayed using the Tween agar plate (0.5% yeast extract, 1% peptone, 0.01% CaCl_2 , 1.5% agar, and 0.1% Tween 80, pH 7.0) according to Aktas et al. [25]. Phytase activity was evaluated using the calcium phytate agar (1% glucose, 0.05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.02% KCl, 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2% calcium phytate, 0.05% yeast extract, 0.0005% MnSO_4 , 0.0005% FeSO_4 , and 1.5% agar, pH 7.0) according to Tsang [26]. The hemolytic activity was evaluated in a commercial blood agar plate assay (Plast Labor, Brazil). To determine enzymatic activities, aliquots (10 μl) of 48 h old cultured fungal cells (10^7 cells) were spotted on the surface of each agar medium and incubated at 37°C for up to 7 days. The colony diameter (a) and the diameter of the colony plus the precipitation zone (b) were measured by a graduated ruler, and the enzymatic activities were expressed as Pz value (a/b) as previously described [22]. The Pz value was scored into four categories: Pz of 1.0 indicated no enzymatic activity; Pz between 0.999 and 0.700 indicated weak producers; Pz between 0.699 and 0.400 corresponded to good producers; and Pz lower than 0.399 meant excellent producers [22].

Determination of catalase activity was performed using a semiquantitative assay with slight modifications according to Metchock et al. [27]. In brief, screw-cap tubes containing Sabouraud Dextrose Agar medium were inoculated with 200 μ L of a suspension of *C. glabrata* cells corresponding to the 0.5 McFarland standard and incubated at 37°C for 48 h. After this incubation, 1 mL of a freshly prepared 1:1 mixture of 10% Tween 80 and 30% hydrogen peroxide was added to the cultures. The column bubble was measured in millimeters after 5 min at room temperature. Uninoculated medium was used as a negative control. A column of bubbles of <45 mm was classified as low catalase producers, while a column bubble of >45 mm was classified as high catalase producers [27].

Since media and conditions may play a key role in the gene expression of the enzymes studied, all enzymatic tests were performed with culture media prepared from a single bottle and tested using the same equipment. Moreover, all the tests for the determination of production of hydrolytic enzymes were performed in duplicate, and results of enzymatic activities are presented as mean \pm standard deviation (SD).

2.5. Statistical Analysis. The statistical analyses were performed with the GraphPad Prism 5 computer software®. The correlation between MIC values and the enzymatic activity was performed using the Spearman's rank correlation, since the variables do not meet the bivariate normal distribution assumption. The strength of the relationship between paired data was interpreted through the Spearman's correlation coefficient (r_s) analysis, where the closer r_s is to ± 1 , the stronger the relationship. Additionally, strains were grouped according to their susceptibility profile (susceptible-dose dependent/resistant for FLC; susceptible/nonsusceptible for other drugs), and the median value of the enzymatic activity of each group was compared using the Mann-Whitney *U* test. *P* values of 0.05 or less were considered to be statistically significant in all tests.

3. Results

3.1. Phenotypic and Molecular Identification of Fungal Strains. All the 91 clinical yeast strains produced colonies with a coppery pigment and smooth texture on chromogenic CHROMagar *Candida* medium, and contamination or mixed colonies were not detected. According to the biochemical analysis by the Vitek 2 system, these strains were identified as *C. glabrata* with an average probability of 98%.

Moreover, all the 91 yeast strains were identified through sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA. These clinical strains showed 99-100% similarity when compared to the *C. glabrata* AY939793 sequence deposited in the GenBank database, thus confirming their identity as *C. glabrata*. No *C. nivariensis* or *C. bracarensis* was found in this study. The obtained sequences to ITS1-5.8S-ITS2 region of the clinical strains were deposited in GenBank under the accession numbers KX450781-KX450814, KX450816-KX450833, KX450835-KX450861, and KX450863-KX450874.

3.2. Susceptibility of *C. glabrata* against Five Antifungal Drugs. Concerning the antifungal susceptibility profile (Table 1), all the 91 clinical strains of *C. glabrata* were susceptible to 5-FC. However, some of these strains showed resistance to AMB, FLC, ITC, or MCF. In brief, nine *C. glabrata* strains (9.9%) were likely to be resistant to AMB as follows: five strains exhibited MIC of 2 μ g/mL, one strain presented MIC of 4 μ g/mL, and three strains exhibited MIC of 8 μ g/mL to this polyene agent. FLC was the azole with the highest number of resistant strains (MIC \geq 64 μ g/mL). A total of 14 strains (15.4%) were resistant to FLC, whereas five (5.5%) presented resistance to ITC. Fourteen strains of *C. glabrata* (15.4%) exhibited MIC > 0.12 μ g/mL to MCF.

The *C. glabrata* ATCC 2001 type strain was classified as susceptible-dose dependent to FLC (MIC of 8 μ g/mL) and susceptible to AMB, ITC, MCF, and 5-FC (MIC of 0.12, 0.06, 0.06, and 0.12 μ g/mL, resp.).

Eleven of the 91 strains tested (12.1%) were classified as resistant to at least two antifungal drugs. Table 2 summarizes the resistance profile of the Brazilian tested clinical strains of *C. glabrata*.

Association between resistance and the clinical origin of strains or year of isolation was not detected for any of the tested antifungal drugs (*P* > 0.05).

3.3. Production of Hydrolytic Enzymes. In this set of experiments, the *in vitro* abilities of the *C. glabrata* to produce proteases (aspartic protease and caseinase), phospholipase, esterase, phytase, hemolysin, and catalase were evaluated. Phospholipase and caseinase activities were not detected under the employed experimental conditions for any of the tested strains. Eighty-seven strains of *C. glabrata* (95.6%) were able to produce aspartic protease (*Pz* ranging from 0.100 to 0.583), while four strains (4.4%) showed no enzymatic activity for this hydrolytic enzyme (*Pz* = 1.0). The clinical strains of *C. glabrata* producing aspartic protease were classified as follows: 30 clinical strains (33.0%) were considered excellent producers (*Pz* ranging from 0.100 to 0.395), and 57 clinical strains (62.6%) were classified as good producers (*Pz* ranging from 0.400 to 0.583).

Esterase was detected in 51 *C. glabrata* strains (56.0%), being one strain (1.1%) classified as excellent esterase producer (*Pz* mean = 0.393 \pm 0.050), 48 strains (52.7%) were considered good producers (*Pz* ranging from 0.414 to 0.667), and two strains (2.2%) were considered weak producers (*Pz* ranging from 0.762 to 0.800).

Regarding the phytase production, all the strains were positive (*Pz* ranging from 0.114 to 0.762), in which 10 strains (11.0%) were considered excellent producers (*Pz* ranging from 0.114 to 0.380), 80 strains (87.9%) were classified as good producers (*Pz* ranging from 0.400 to 0.692), and one strain (1.1%) was considered weak phytase producer (*Pz* mean = 0.762 \pm 0.050).

Hemolytic activity was observed in 90 *C. glabrata* strains (98.9%), being one strain (1.1%) considered excellent producer of hemolysins (*Pz* mean = 0.385 \pm 0.000), 82 strains (90.1%) classified as good producers (*Pz* ranging from 0.409 to 0.688), and seven strains (7.7%) were considered weak producers (*Pz* ranging from 0.722 to 0.795).

TABLE 1: In vitro antifungal susceptibility profile in 91 Brazilian clinical strains of *Candida glabrata*.

Antifungals	Range	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			CLSI interpretation Number of strains (%)		
		MIC ₅₀ /MIC ₉₀	GM	S	SDD or I	R	
Amphotericin B ¹	0.06–8	0.5/2	0.61	82 (90.1)	—	9 (9.9)	
Fluconazole ²	0.5– ≥ 64	16/64	11.23	—	77 (84.6)	14 (15.4)	
Itraconazole ¹	0.016–4	0.25/0.5	0.22	31 (34.1)	55 (60.4)	5 (5.5)	
Micafungin ²	0.016–1	0.06/0.25	0.08	51 (56.0)	26 (28.6)	14 (15.4)	
5-Flucytosine ¹	0.12	0.12/0.12	0.12	91 (100.0)	—	—	

MIC: minimal inhibitory concentration; CLSI: clinical and laboratory standards institute; GM: geometric mean; S: susceptible; SDD: susceptible-dose dependent; I: intermediary; R: resistant. ¹Breakpoints established by M27-S3 protocol [20]. In sum, strains with amphotericin B MIC > 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ are likely to be resistant to this drug; itraconazole MIC $\leq 0.125 \mu\text{g}/\text{mL}$ are likely to be susceptible, $0.25 \leq \text{MIC} \leq 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ are likely to be intermediary, and MIC $\geq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ are likely to be resistant to this drug; 5-flucytosine MIC $\leq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ are likely to be susceptible, $8 \leq \text{MIC} \leq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ are likely to be intermediary, and MIC $\geq 32 \mu\text{g}/\text{mL}$ are likely to be resistant to this drug. ²Breakpoints established by M27-S4 protocol [21]. In sum, *C. glabrata* strains with fluconazole MIC $\leq 32 \mu\text{g}/\text{mL}$ are likely to be susceptible-dose dependent and MIC $\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$ are likely to be resistant to this drug; *C. glabrata* strains with micafungin MIC $\leq 0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ are likely to be susceptible, MIC = 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ are likely to be intermediary, and MIC $\geq 0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ are likely to be resistant to this drug.

TABLE 2: Resistance to at least two antifungal drugs in Brazilian clinical strains of *Candida glabrata*.

Antifungals	Number of strains (%)	Clinical specimen (number of strains)
AMB and FLC	5 (5.5)	Bronchoalveolar lavage (1), pleural fluid (1), blood (2), vaginal secretion (1)
AMB, FLC, and MCF	1 (1.1)	Feces (1)
FLC and ITC	2 (2.2)	Sputum (1), urine (1)
FLC and MCF	2 (2.2)	Blood (1), vaginal secretion (1)
FLC, ITC, and MCF	1 (1.1)	Vaginal secretion (1)

AMB: amphotericin B; FLC: fluconazole; ITC: itraconazole; MCF: micafungin.

The *C. glabrata* ATCC 2001 type strain was considered an excellent aspartic protease producer (P_z mean = 0.357 \pm 0.034) and a weak producer of phytase (P_z mean = 0.714 \pm 0.000). Caseinase, phospholipase, esterase, and hemolytic activities were not detected under the employed experimental conditions for this strain.

The activity of catalase was detected in all *C. glabrata* strains studied, including *C. glabrata* ATCC 2001 type strain. All the strains produced bubbles almost immediately after hydrogen peroxide hydrolysis, and these strains were classified as high catalase producers.

The profile of hydrolytic enzymes related to virulence of the strains was not related to the clinical origin of the strains nor the year of strain isolation ($P > 0.05$).

3.4. Relationship between Antifungal Susceptibility Profile and Virulence Attributes. Spearman's correlation revealed significant associations between phytase production and AMB MIC, hemolysin production and FLC MIC, esterase production and MCF MIC, and hemolysin production and MCF MIC (Table 3). According to the r_s analysis, phytase P_z and AMB MIC, hemolysin P_z and FLC MIC, hemolysin P_z and MCF MIC have a negative monotonic correlation, whereas esterase P_z and MCF MIC are positively monotonically correlated. Moreover, the strength of all negatively correlated variables was classified as weak, and the esterase/MCF correlation was classified as moderate.

Regarding the enzymatic activities of strains grouped according to their susceptibility profile, differences in the

median production value of all studied hydrolytic enzymes were not detected in strains of *C. glabrata* with different susceptibilities to AMB ($P > 0.05$). However, statistically significant differences on the median esterase P_z values were noticed between strains with different MCF susceptibility profiles and also on the median P_z values for hemolytic activity between strains with different FLC, ITC, and MCF susceptibility profiles (Figure 1).

4. Discussion

Phenotypic methods are not able to discriminate among *C. glabrata*, *C. nivariensis*, and *C. bracarensis* [9, 10]. Therefore, as suggested by others authors [9, 28], a molecular method based on sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA was employed to conclude the identification of the clinical strains analyzed in this study. *C. glabrata* was the sole species found. These results are in agreement with the previous studies [12, 29], showing the high prevalence of *C. glabrata* taken into consideration the *C. glabrata* species complex. The correct identification of yeast species causing invasive mycoses is fundamental to ensure proper management of the patient and specific, early, and effective antifungal therapy [9, 30, 31].

Among the antifungal agents used in the management of candidiasis, we can highlight the amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, isavuconazole, echinocandins, and 5-flucytosine [14]. Unfortunately, only FLC and the echinocandins have clinical breakpoints described by the CLSI to *C. glabrata* [21]. Although no

TABLE 3: Correlation between production of five potential fungal virulence-related enzymes and minimum inhibitory concentrations of four different antifungal drugs in 91 Brazilian clinical strains of *Candida glabrata*.

Antifungals	Hydrolytic enzymes, P^* (r_s)				
	Aspartic protease	Esterase	Phytase	Hemolysin	Catalase
Amphotericin B	0.7409 (0.04)	0.3865 (0.09)	0.0353 (-0.22)	0.1771 (-0.14)	0.2567 (0.12)
Fluconazole	0.7230 (-0.04)	0.1493 (0.15)	0.0910 (-0.18)	0.0040 (-0.30)	0.4128 (-0.09)
Itraconazole	0.6495 (0.05)	0.4667 (0.08)	0.3749 (0.09)	0.1418 (-0.16)	0.8592 (-0.02)
Micafungin	0.0559 (-0.20)	<0.0001 (0.40)	0.3768 (-0.09)	0.0034 (-0.30)	0.0922 (-0.18)

* P values of 0.05 or less (in bold) were considered statistically significant.

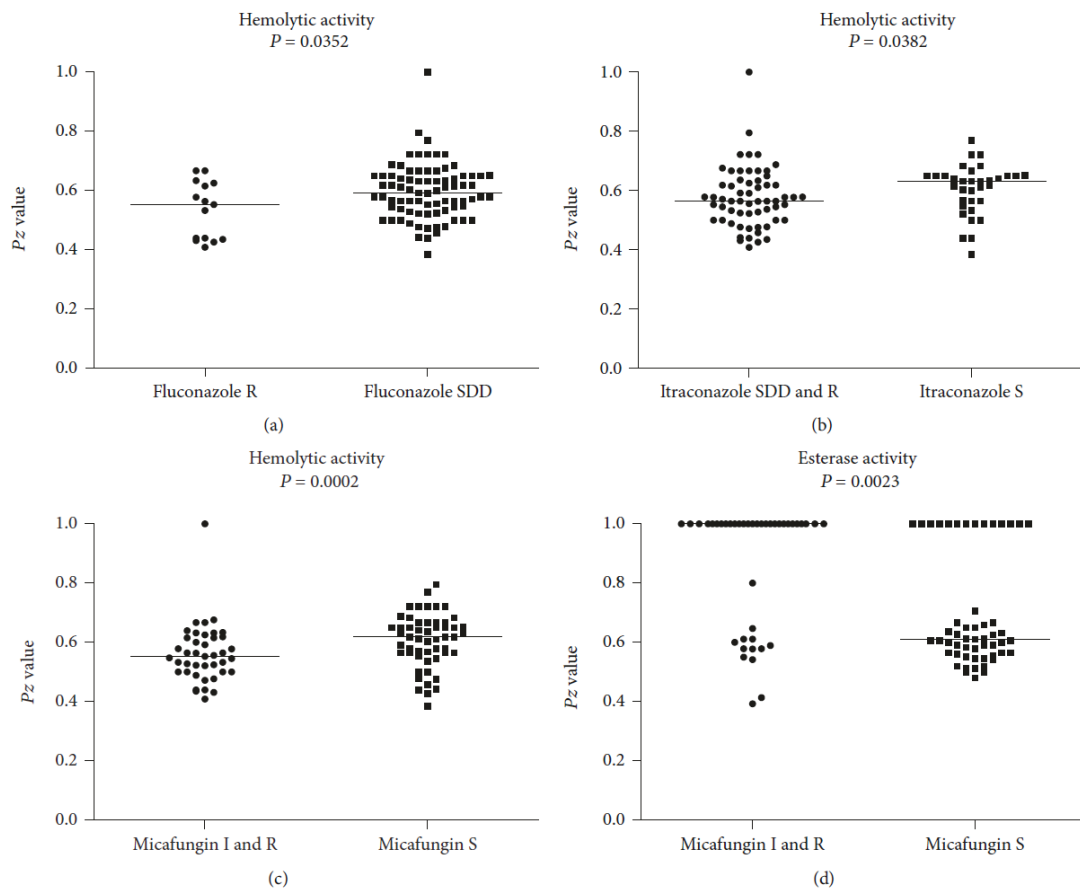


FIGURE 1: Differential expression of hydrolytic enzymes by 91 *Candida glabrata* strains with different susceptibility profiles against antifungal drugs: (a) hemolytic activity of strains regarding fluconazole susceptibility; (b) hemolytic activity of strains regarding itraconazole susceptibility; (c) hemolytic activity of strains regarding micafungin susceptibility; and (d) esterase activity of strains regarding micafungin susceptibility. Straight lines in each group represent the median for that group. In all the cases, differences between medians of groups with different susceptibility profiles were statistically significant ($P < 0.05$).

clinical breakpoints for AMB have been suggested, the CLSI document indicates that MIC values for this antifungal drug higher than $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ are suggestive of resistance [19], the reason for the inclusion of this drug in our analysis. Clinical breakpoints for caspofungin and *C. glabrata* have been described. However, some studies have pointed that the

broth microdilution testing is not suitable for caspofungin MIC determination, since unexplained interlaboratory differences are very common for this drug [32–34], and therefore caspofungin was not included in this study. Instead, MCF was chosen to check whether virulence attributes regulate echinocandins' resistance, since this drug does not raise

the same problems observed during MIC determination of caspofungin [34].

In this study, the majority of *C. glabrata* strains presented a MIC $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ to AMB. Fluconazole and micafungin resistance were noted among some *C. glabrata* strains. Similar results were observed in a Portuguese multicenter survey [35] and in a global study developed during the 2014 SENTRY antifungal surveillance program. [36]. However, previous studies developed in Peru [37] and Brazil [38], with a small number of strains ($N = 8$ and 15 isolates, resp.) did not find *C. glabrata* strains with AMB MIC $> 1 \mu\text{g/mL}$.

According to the clinical breakpoints for *C. glabrata*, it was observed that the frequency of resistant strains was higher to FLC and MCF. Moreover, some *C. glabrata* strains were resistant to both FLC and MCF. Similar results were found in other studies showing that fluconazole-resistant *C. glabrata* isolates were resistant to one or more echinocandins [5, 15]. Echinocandins' resistance appears to be associated with prior exposure to these drugs as well as the presence of FKS mutations [15, 16], while azole's resistance can be the result of an alteration of the lanosterol 14 α -demethylase target enzyme by either overexpression or mutations in its encoding gene *ERG11* [39], or overexpression of efflux pumps mediated by the activation of expression of ATP-binding cassette (ABC) or major facilitator superfamily (MFS) transporters [40–42].

In this study, flucytosine demonstrates the greatest in vitro antifungal activity against *C. glabrata* clinical strains. However, in vivo, this drug is usually given in combination with another antifungal agent due to a high rate emergence of resistance during monotherapy for candidiasis [14].

In addition to the CLSI method employed in this study, the only other international standard method for antifungal susceptibility testing of yeasts is that published by European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [43]. Pfaller et al. [44] compared these two standardized methods for 10 antifungal agents, including amphotericin B, fluconazole, itraconazole, micafungin, and flucytosine against a collection of clinical isolates of *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*. The results indicate that the CLSI and EUCAST methods produce similar results for antifungal susceptibility testing against the five most common species of *Candida*, indicating that their use should not result in resistance profiles different enough to affect direct treatment decisions.

In *Candida* species, extracellular hydrolytic enzymes facilitate the nutrition, adherence, colonization, penetration of tissues or cells, invasion, dissemination, and escape from host immune responses [18, 45]. Moreover, secretion of hydrolytic enzymes has the ability to regulate *Candida* spp. antifungal drug resistance [46].

Aspartic proteases are enzymes with high proteolytic activity and stability at acid pH [47]. These enzymes control several steps in innate immune evasion, and they degrade proteins related to immunological defense such as antibodies, complement, and cytokines, allowing the fungus to escape from the first line of host defenses [48]. Moreover, a study developed by Silva et al. [46] suggests that naturally resistant

Candida spp. or isolates that have developed resistance after prolonged exposure to drugs may present an increase in the secretion pattern and proteolytic activity of secreted aspartic proteases (SAP), but more studies are needed to elucidate its relation. In our study, most strains of *C. glabrata* were classified as good aspartic protease producers. However, *C. glabrata* does not possess classical SAP genes in its genome [46, 49]. Probably the enzymatic degradation of albumin verified herein may be due to the production of yapsins. The yapsins (YPS) are a family of five nonsecreted glycosylphosphatidylinositol-linked aspartic proteases that have a well-known role in cell wall integrity and increase the capacity of the fungus to survive inside human macrophages [50]. A study developed by Swoboda-Kopeć et al. [51] confirmed the prevalence of three genes (*YPS2*, *YPS4*, and *YPS6*) in the majority of *C. glabrata* strains isolated from clinical specimens.

Casein is a mixture of phosphoproteins that can be hydrolyzed by a series of enzymes collectively called caseinases. These enzymes belong most likely to the metallo and serine protease families [52]. Caseinase activity was not detected under the employed experimental conditions for any of the tested *C. glabrata* strains. However, these results were discordant from those found by Abbes et al. [53] who reported caseinase activity in 16 *C. glabrata* isolates. Secretion of caseinase has also been observed in *Candida parapsilosis* sensu stricto [24], *Candida haemulonii* species complex [54], and *Yarrowia lipolytica* [53]. Pärnänen et al. [55] identified a serine protease in *C. glabrata* linked to the fungal cell wall, but its role in virulence of *C. glabrata* remains uncertain.

Phospholipases and esterases are extracellular lipolytic enzymes involved in virulence of *Candida* spp. [24, 54]. Their possible functions include digestion of lipids for nutrient acquisition, adhesion to cells and tissues of the host, synergistic interactions with other enzymes, nonspecific hydrolysis, initiation of inflammatory processes by affecting cells of the immune system, and self-defense [56]. In this work, none of the *C. glabrata* strains had detectable levels of phospholipase. Udayalaxmi et al. [57] also did not find phospholipase activity in 14 *C. glabrata* clinical strains isolated from the genitourinary tract. A study from Brazil detected phospholipase activity by the agar plate methodology only in one *C. glabrata* strain isolated from the nasolacrimal duct outlet of a horse [58], thus confirming the low phospholipase production in *C. glabrata*, especially those isolated from human clinical specimens. In a survey among *Candida* vaginal isolates from Egypt, phospholipase activity was observed in a small number of *C. glabrata* strains. This same study also detected the phospholipase *PB2* gene in a few strains studied. On the other hand, the incidence of the phospholipase *PB1* gene in the *Candida* population studied was high, ranging from 87.5% to 95%, depending on the patient history for diabetes [59].

Esterase production was the virulence-related phenotype with more variation among the strains of this study. In a study from Iran with eight *C. glabrata* strains isolated from the oral mucosa, the esterase production showed less variation than the present work, with most strains classified as

esterase producers [60]. On the other hand, a study from Turkey revealed that only one from 14 *C. glabrata* strains isolated from bloodstream infection was considered positive in the esterase agar assay. These data suggest that esterase production in *C. glabrata* may be highly heterogeneous according to the source of the clinical material or the geographic region from which the strains were isolated. A major production of esterase was observed in MCF susceptible *C. glabrata* strains. Enzymes with the ability to degrade chitin are also classified as esterases [61], and high chitin levels are associated with a resistance to caspofungin in some *Candida* species [62]. We are unaware to what extent the esterase agar plate assay employed in this study can also detect chitin desacetylases or if the expression of genes for all esterase families has the same regulation in *C. glabrata* strains. The Spearman's correlation analysis revealed that as MCF MIC increases, esterase production does not increase, which could be the reflex of a higher chitin content in the cell walls of resistant strains due to a lower chitin degradation. Further studies are under way to check this hypothesis.

Phytase is a phosphohydrolase that cleaves phytate-releasing inorganic phosphate and inositol, two essential nutrients for all living cells [63]. In this study, phytase activity was detected in all *C. glabrata* strains. Similar results have been reported in different *Candida* spp., including *C. glabrata* [26], *Candida parapsilosis* species complex [24, 64], and *Candida haemulonii* species complex [54]. In *Candida* spp., the maintenance of a supply of inositol and phosphate mediated by phytase seems to be especially important for pathogen survival and persistence in the host [26]. It was observed that as AMB MIC increases, phytase production does not decrease in the *C. glabrata* strains of our study. To the best of our knowledge, there are no reports of a correlation between phytase production and AMB MIC. Although we were not able to find differences between median phytase *Pz* values among susceptible and resistant AMB strains, the *P* value obtained by the Mann-Whitney test was low ($P=0.07$), and the difference observed between the two statistic tests may be explained by the low number of AMB-resistant strains in the studied population.

Iron uptake is one of the fundamental requirements for pathogenic fungi to survive and grow into their hosts. Therefore, their survival depends on specialized mechanisms in order to adapt to the restrictions of micronutrients during pathogenesis. In general, fungi have to lyse red blood cells to assimilate the iron associated with hemoglobin [65]. Only one of the *C. glabrata* strains of this study was unable to produce hemolysins, results that agree with previous publications [66–68], reflecting the importance of this virulence factor for this yeast. In fact, iron uptake mechanisms have been demonstrated as necessary for virulence in *C. glabrata* [69]. Iron uptake is also involved in resistance of *Cryptococcus neoformans* [70] and *Candida* species [71] to FLC. During FLC resistance acquisition by a *C. glabrata* strain exposed to crescent concentrations of this azole, an enhancement of hemolytic activity associated with an overexpression of the hemolysin gene was also observed [72]. Therefore, we would expect that azole-resistant strains would express more hemolysins. Since low numbers of FLC and ITC cross-

resistance were observed in our study, we could speculate that the different iron-dependent mechanisms regulate resistance to the different azoles. Surprisingly, it was also noticed that expressions of hemolysins were higher in *C. glabrata* strains resistant to MCF. A synergistic effect between MCF and deferasirox, an iron chelator, has been described for *Pythium insidiosum*, suggesting that iron enhances resistance to this echinocandin [73]. Our results support that a similar mechanism occurs in *C. glabrata*. In sum, iron uptake is associated not only to azole resistance in *C. glabrata*, but also to the resistance to echinocandin drugs, such as MCF. These results encourage the development of new therapeutic strategies involving iron depletion, already described for *C. albicans* [74], for the treatment of invasive *C. glabrata* infections.

Catalase was expressed by all tested strains. However, no correlation was observed between the activity of this enzyme and the antifungal susceptibility of these clinical isolates. *C. glabrata* possesses both enzymatic and glutathione mechanisms to resist to the oxidative stress induced by the host immune defenses [75], and our results reinforce the importance of enzymatic mechanisms to maintain redox homeostasis in clinical *C. glabrata* strains.

5. Conclusions

These findings contribute to a better understanding of the *C. glabrata* pathogenesis, showing that aspartic protease, esterase, phytase, hemolysin, and catalase are present in strains from clinical origin. Moreover, the association between expression of some virulence factors with the antifungal resistance to polyenes, azoles, and echinocandins encourages the development of new therapeutic synergistic strategies involving virulence mechanisms such as hydrolytic enzymes as potential targets against drug resistance in *C. glabrata* infections.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors are thankful to CAPES-PROEX, for funding the publication of this work, to Alessandra Leal da Silva Chaves, for providing some strains included in this study, and to Marília Martins Nishikawa, for providing the *C. glabrata* ATCC 2001 type strain. Automated sequencing was performed using the DNA sequencing platform (ABI-3730; Applied Biosystems) (PDTIS/Fiocruz-Rio de Janeiro, Brazil). Rodrigo Almeida-Paes and Rosely Maria Zancopé-Oliveira are supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant nos. 305487/2015-9 and 304976/2013-0).

References

- [1] A. R. Muñoz-Duarte, N. S. Castrejón-Jiménez, S. L. Baltierra-Uribe et al., “*Candida glabrata* survives and replicates in human osteoblasts,” *Pathogens and Disease*, vol. 74, no. 4, article ftw030, 2016.

- [2] F. Essig, K. Ünninger, S. Dietrich, M. T. Figge, and O. Kurzai, "Human neutrophils dump *Candida glabrata* after intracellular killing," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 84, pp. 37–40, 2015.
- [3] L. Kasper, K. Seider, and B. Hube, "Intracellular survival of *Candida glabrata* in macrophages: immune evasion and persistence," *FEMS Yeast Research*, vol. 15, no. 5, article fov042, 2015.
- [4] P. L. Fidel Jr., J. A. Vazquez, and J. D. Sobel, "*Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *Candida albicans*," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 12, no. 1, pp. 80–96, 1999.
- [5] M. A. Pfaller, G. J. Moet, S. A. Messer, R. N. Jones, and M. Castanheira, "Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2008 to 2009)," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 49, no. 1, pp. 396–399, 2011.
- [6] D. Diekema, S. Arbefeville, L. Boyken, J. Kroeger, and M. Pfaller, "The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 73, no. 1, pp. 45–48, 2012.
- [7] A. L. Colombo, M. Garnica, L. F. Aranha Camargo et al., "*Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals," *Medical Mycology*, vol. 51, no. 1, pp. 38–44, 2013.
- [8] M. T. Montagna, G. Lovero, E. Borghi et al., "Candidemia in intensive care unit: a nationwide prospective observational survey (GISIA-3 study) and review of the European literature from 2000 through 2013," *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol. 18, no. 5, pp. 661–674, 2014.
- [9] J. Alcoba-Flórez, S. Méndez-Alvarez, J. Cano, J. Guarro, E. Pérez-Roth, and M. Pilar Arévalo, "Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, no. 8, pp. 4107–4111, 2005.
- [10] A. Correia, P. Sampaio, S. James, and C. Pais, "*Candida bracarenensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 56, Part 1, pp. 313–317, 2006.
- [11] M. Cuenca-Estrella, A. Gomez-Lopez, G. Isla et al., "Prevalence of *Candida bracarenensis* and *Candida nivariensis* in a Spanish collection of yeasts: comparison of results from a reference centre and from a population-based surveillance study of candidemia," *Medical Mycology*, vol. 49, no. 5, pp. 525–529, 2011.
- [12] M. C. Esposto, A. Prigitano, O. Romeo et al., "Looking for *Candida nivariensis* among a large Italian collection of *C. glabrata* isolates results of the FIMUA working group," *Mycoses*, vol. 56, no. 3, pp. 395–396, 2013.
- [13] M. Nucci, F. Queiroz-Telles, T. Alvarado-Matute et al., "Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey," *PloS One*, vol. 8, no. 1, article e59373, 2013.
- [14] P. G. Pappas, C. A. Kauffman, D. R. Andes et al., "Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 62, no. 4, pp. e1–e50, 2016.
- [15] B. D. Alexander, M. D. Johnson, C. D. Pfeiffer et al., "Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 56, no. 12, pp. 1724–1732, 2013.
- [16] R. K. Shields, M. H. Nguyen, E. G. Press et al., "The presence of an *FKS* mutation rather than MIC is an independent risk factor for failure of echinocandin therapy among patients with invasive candidiasis due to *Candida glabrata*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, no. 9, pp. 4862–4869, 2012.
- [17] S. Silva, M. Negri, M. Henriques, R. Oliveira, D. W. Williams, and J. Azeredo, "*Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 36, no. 2, pp. 288–305, 2012.
- [18] J. C. Sardi, L. Scorzoni, T. Bernardi, A. M. Fusco-Almeida, and M. J. Mendes Giannini, "*Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 62, Part 1, pp. 10–24, 2013.
- [19] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard-Third Edition. CLSI Document M-27A3*, CLSI, Wayne, PA, 2008.
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Third Informational Supplement. CLSI Document M27-S3*, CLSI, Wayne, PA, 2008.
- [21] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Fourth Informational Supplement. CLSI Document M27-S4*, CLSI, Wayne, PA, 2012.
- [22] M. F. Price, I. D. Willinson, and L. O. Gentry, "Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*," *Sabouraudia*, vol. 20, no. 1, pp. 7–14, 1982.
- [23] R. Rüchel, R. Tegeler, and M. Trost, "A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*," *Sabouraudia*, vol. 20, no. 3, pp. 233–244, 1982.
- [24] M. Ziccardi, L. O. Souza, R. M. Gandra et al., "*Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the southeast of Brazil: species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 305, no. 8, pp. 848–859, 2015.
- [25] E. Aktas, N. Yigit, and A. Ayyildiz, "Esterase activity in various *Candida* species," *The Journal of International Medical Research*, vol. 30, no. 3, pp. 322–324, 2002.
- [26] P. W. Tsang, "Differential phytate utilization in *Candida* species," *Mycopathologia*, vol. 172, no. 6, pp. 473–479, 2011.
- [27] B. G. Metchock, F. S. Nolte, and R. J. Wallace Jr., "Mycobacterium," in *Manual of Clinical Microbiology*, P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover and R. H. Tenover, Eds., pp. 399–437, ASM Press, Washington, DC, USA, 1999.
- [28] A. Enache-Angoulvant, J. Guitard, F. Grenouillet et al., "Rapid discrimination between *Candida glabrata*, *Candida nivariensis* and *Candida bracarenensis* by use of a singleplex PCR," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 49, no. 9, pp. 3375–3379, 2011.
- [29] J. Pemán, E. Cantón, G. Quindós et al., "Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 67, pp. 1181–1187, 2012.
- [30] S. A. Meyer and D. Yarrow, "*Candida glabrata*," in *The Yeasts: A Taxonomic Study*, C. P. Kurtzman, J. W. Fell and T. Boekhout, Eds., vol. 2, pp. 1097–1098, Elsevier, Amsterdam, 2011.

- [31] A. Chowdhary, H. S. Randhawa, Z. U. Khan et al., "First isolations in India of *Candida nivariensis*, a globally emerging opportunistic pathogen," *Medical Mycology*, vol. 48, no. 2, pp. 416–420, 2010.
- [32] M. C. Arendrup and D. S. Perlin, "Echinocandin resistance: an emerging clinical problem?" *Current Opinion in Infectious Diseases*, vol. 27, no. 6, pp. 484–492, 2014.
- [33] R. Ben-Ami, Y. Hilerowicz, A. Novikov, and M. Giladi, "The impact of new epidemiological cutoff values on *Candida glabrata* resistance rates and concordance between testing methods," *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 79, no. 2, pp. 209–213, 2014.
- [34] D. S. Perlin, "Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management," *Drugs*, vol. 74, no. 14, pp. 1573–1585, 2014.
- [35] I. Faria-Ramos, J. Neves-Maia, E. Ricardo et al., "Species distribution and in vitro antifungal susceptibility profiles of yeast isolates from invasive infections during a Portuguese multi-center survey," *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 33, pp. 2241–2247, 2014.
- [36] M. A. Pfaller, S. A. Messer, P. R. Rhomberg, and M. Castanheira, "Activity of a long-acting echinocandin (CD101) and seven comparator antifungal agents tested against a global collection of contemporary invasive fungal isolates in the SENTRY 2014 antifungal surveillance program," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 61, no. 3, pp. e02045–e02016, 2017.
- [37] B. Bustamante, M. A. Martins, L. X. Bonfietti et al., "Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* isolates from bloodstream infections in Lima, Peru," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 63, pp. 855–860, 2014.
- [38] E. R. Santos, C. F. Dal Forno, M. G. Hernandez et al., "Susceptibility of *Candida* spp. isolated from blood cultures as evaluated using the M-27*3 and new M-27-S4 approved breakpoints," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 56, no. 6, pp. 477–482, 2014.
- [39] K. W. Henry, J. T. Nickels, and T. D. Edlind, "Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 44, no. 10, pp. 2693–2700, 2000.
- [40] D. Sanglard, K. Kuchler, F. Ischer, J. L. Pagani, M. Monod, and J. Bille, "Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 39, no. 11, pp. 2378–2386, 1995.
- [41] K. H. Chen, T. Miyazaki, H. F. Tsai, and J. E. Bennett, "The bZip transcription factor Cgap1p is involved in multidrug resistance and required for activation of multidrug transporter gene CgFLR1 in *Candida glabrata*," *Gene*, vol. 386, no. 1–2, pp. 63–72, 2007.
- [42] S. Paul and W. S. Moye-Rowley, "Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression," *Frontiers in Physiology*, vol. 5, article 143, 2014.
- [43] M. C. Arendrup, M. Cuenca-Estrella, C. Lass-Florl, W. W. Hope, and EUCAST-AFST, "EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST)," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 18, pp. E246–E247, 2012.
- [44] M. A. Pfaller, M. Castanheira, S. A. Messer, P. R. Rhomberg, and R. N. Jones, "Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp.," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 79, pp. 198–204, 2014.
- [45] R. Eells, W. Kilian, A. Hugo, J. Albertyn, J. L. Kock, and C. H. Pohl, "Virulence of South African *Candida albicans* strains isolated from different clinical samples," *Medical Mycology*, vol. 52, no. 3, pp. 246–253, 2014.
- [46] N. C. Silva, J. M. Nery, and A. L. Dias, "Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance," *Mycoses*, vol. 57, no. 1, pp. 1–11, 2014.
- [47] M. Rao, A. Tanksale, M. Gratge, and V. Deshpande, "Molecular biotechnological aspects of microbial proteases," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 62, no. 3, pp. 597–635, 1998.
- [48] M. Staniszevska, B. Małgorzata, and O. Zbigniew, "Contribution of aspartic proteases in *Candida* virulence. Protease inhibitors against *Candida* infections," *Current Protein & Peptide Science*, vol. 17, 2016.
- [49] B. Parra-Ortega, H. Cruz-Torres, L. Villa-Tanaca, and C. Hernández-Rodríguez, "Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 104, no. 3, pp. 505–512, 2009.
- [50] D. J. Krysan, E. L. Ting, C. Abeijon, L. Kroos, and R. S. Fuller, "Yapins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*," *Eukaryotic Cell*, vol. 4, no. 8, pp. 1364–1374, 2005.
- [51] E. Swoboda-Kopeć, M. Sikora, M. Golas, K. Piskorska, D. Gozdowski, and I. Netsvyetayeva, "*Candida nivariensis* in comparison to different phenotypes of *Candida glabrata*," *Mycoses*, vol. 57, no. 12, pp. 747–753, 2014.
- [52] M. F. Clincke, E. Guedon, F. T. Yens, V. Ogier, and J. L. Goergen, "Characterization of metalloprotease and serine protease activities in batch CHO cell cultures: control of human recombinant IFN- γ proteolysis by addition of iron citrate," *BMC Proceedings*, vol. 5, Supplement 8, p. 115, 2011.
- [53] S. Abbes, I. Amouri, H. Trabelsi et al., "Analysis of virulence factors and in vivo biofilm-forming capacity of *Yarrowia lipolytica* isolated from patients with fungemia," *Medical Mycology*, vol. 55, no. 4, pp. 193–202, 2017.
- [54] L. S. Ramos, M. H. Branquinho, and A. L. Santos, "Different classes of hydrolytic enzymes produced by multidrug-resistant yeasts comprising the *Candida haemulonii* complex," *Medical Mycology*, vol. 55, no. 2, pp. 228–232, 2017.
- [55] P. Pärnänen, J. H. Meurman, and P. Nikula-Ijäs, "A novel *Candida glabrata* cell wall associated serine protease," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 457, no. 4, pp. 676–680, 2015.
- [56] M. Schaller, C. Borelli, H. C. Korting, and B. Hube, "Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*," *Mycoses*, vol. 48, no. 6, pp. 365–377, 2005.
- [57] J. Udayalaxmi, S. Jacob, and D. D'Souza, "Comparison between virulence factors of *Candida albicans* and non-*albicans* species of *Candida* isolated from genitourinary tract," *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, vol. 8, no. 11, pp. 15–17, 2014.
- [58] R. S. Brillhante, P. V. Bittencourt, D. S. Castelo-Branco et al., "Trends in antifungal susceptibility and virulence of *Candida* spp. from the nasolacrimal duct of horses," *Medical Mycology*, vol. 54, no. 2, pp. 147–154, 2016.

- [59] R. H. Bassyouni, A. A. Wegdan, A. Abdelmoneim, W. Said, and F. AboElnaga, "Phospholipase and aspartyl proteinase activities of *Candida* species causing vulvovaginal candidiasis in patients with type 2 diabetes mellitus," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 25, no. 10, pp. 1734–1741, 2015.
- [60] M. Fatahina, F. Poormohamadi, and A. Zarei Mahmoudabadi, "Comparative study of esterase and hemolytic activities in clinically important *Candida* species, isolated from oral cavity of diabetic and non-diabetic individuals," *Jundishapur Journal of Microbiology*, vol. 8, no. 3, article e20893, 2015.
- [61] F. Caufrier, A. Martinou, C. Dupont, and V. Bouriotis, "Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity," *Carbohydrate Research*, vol. 338, no. 7, pp. 687–692, 2003.
- [62] L. A. Walker, N. A. Gow, and C. A. Munro, "Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin," *Antimicrobiol Agents and Chemotherapy*, vol. 57, no. 1, pp. 146–154, 2013.
- [63] X. G. Lei and J. M. Porres, "Phytase enzymology, applications, and biotechnology," *Biotechnology Letters*, vol. 25, no. 21, pp. 1787–1794, 2003.
- [64] É. A. Abi-chacra, L. O. Souza, L. P. Cruz et al., "Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex," *FEMS Yeast Research*, vol. 13, no. 8, pp. 831–848, 2013.
- [65] A. Crawford and D. Wilson, "Essential metals at the host-pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens," *FEMS Yeast Research*, vol. 15, no. 7, 2015.
- [66] V. K. Chin, K. J. Foong, A. Maha et al., "*Candida albicans* Isolates from a Malaysian hospital exhibit more potent phospholipase and haemolysin activities than non-*albicans Candida* isolates," *Tropical Biomedicine*, vol. 30, no. 4, pp. 654–662, 2013.
- [67] R. D. Rossoni, J. O. Barbosa, S. F. Vilela, A. O. Jorge, and J. C. Junqueira, "Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-*albicans Candida* species," *Brazilian Oral Research*, vol. 27, no. 6, pp. 484–489, 2013.
- [68] C. J. Seneviratne, S. S. Wong, K. Y. Yuen et al., "Antifungal susceptibility and virulence attributes of bloodstream isolates of *Candida* from Hong Kong and Finland," *Mycopathologia*, vol. 172, no. 5, pp. 389–395, 2011.
- [69] V. K. Srivastava, K. J. Suneetha, and R. Kaur, "A systematic analysis reveals an essential role for high-affinity iron uptake system, haemolysin and CFEM domain-containing protein in iron homeostasis and virulence in *Candida glabrata*," *The Biochemical Journal*, vol. 463, no. 1, pp. 103–114, 2014.
- [70] J. Kim, Y. J. Cho, E. Do et al., "A defect in iron uptake enhances the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to azole antifungal drugs," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 49, no. 11, pp. 955–966, 2012.
- [71] T. Prasad, A. Chandra, C. K. Mukhopadhyay, and R. Prasad, "Unexpected link between iron and drug resistance of *Candida* spp.: iron depletion enhances membrane fluidity and drug diffusion, leading to drug-susceptible cells," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 50, no. 11, pp. 3597–3606, 2006.
- [72] Y. H. Samaranyake, B. P. Cheung, J. Y. Yau, K. W. Yeung, and L. P. Samaranyake, "Genotypic, phenotypic, and proteomic characterization of *Candida glabrata* during sequential fluconazole exposure," *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, vol. 2, no. 2, pp. 117–127, 2011.
- [73] R. A. Zanette, F. P. Jesus, M. B. Pilotto et al., "Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*," *Journal de Mycologie Medicale*, vol. 25, no. 1, pp. 91–94, 2015.
- [74] T. Kobayashi, H. Kakeya, T. Miyazaki et al., "Synergistic antifungal effect of lactoferrin with azole antifungals against *Candida albicans* and a proposal for a new treatment method for invasive candidiasis," *Japanese Journal of Infectious Diseases*, vol. 64, no. 4, pp. 292–296, 2011.
- [75] M. Briones-Martin-Del-Campo, E. Orta-Zavalza, J. Juarez-Cepeda et al., "The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*," *Revista Iberoamericana de Micologia*, vol. 31, no. 1, pp. 67–71, 2014.

ANEXOS

ANEXO A – Intervalo da concentração inibitória mínima para os diferentes fármacos antifúngicos frente às cepas de referência de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258.

Number 15

M27-S3

Table 6. Recommended 24- and 48-Hour MIC Limits for Two Quality Control Strains for Broth Microdilution. (From Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, et al. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3457-3459; and Krisher K, Brown SD, Traczewski MM. Quality control parameters for broth microdilution tests of anidulafungin. *J Clin Microbiol.* 2004;42:490. Reprinted with permission from the American Society for Microbiology and the authors.)

MIC (µg/mL) Ranges for Microdilution Tests							
Organism	Antifungal Agent	24-Hour			48-Hour		
		Range	Mode	% Within Range	Range	Mode	% Within Range
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC [®] 22019	Amphotericin B	0.25-2.0	0.5	97.1	0.5-4.0	2.0	91.7
	Anidulafungin	0.25-2.0	1.0	95.0	0.5-2.0	1.0	95.0
	Caspofungin	0.25-1.0	0.5	96.7	0.5-4.0	1.0	92.9
	Flucytosine (5-FC)	0.06-0.25	0.12	99.2	0.12-0.5	0.25	97.9
	Fluconazole	0.5-4.0	2.0	98.2	1.0-4.0	2.0	98.1
	Itraconazole	0.12-0.5	0.25	95.8	0.12-0.5	0.25	97.5
	Ketoconazole	0.03-0.25	0.06/0.12	97.5	0.06-0.5	0.12	98.3
	Micafungin	0.5-2	1	100.0	0.5-4	1	100.0
	Posaconazole	0.06-0.25	0.12	96.7	0.06-0.25	0.12	98.8
	Ravuconazole	0.016-0.12	0.06	95.8	0.03-0.25	0.06	98.3
Voriconazole	0.016-0.12	0.06	100.0	0.03-0.25	0.06	100.0	
<i>Candida krusei</i> ATCC [®] 6258	Amphotericin B	0.5-2.0	1.0	100.0	1.0-4.0	2.0	100.0
	Anidulafungin	0.03-0.12	0.06	97.9	0.03-0.12	0.06	97.5
	Caspofungin	0.12-1.0	0.5	98.8	0.25-1.0	0.5	97.5
	Flucytosine (5-FC)	4.0-16	8.0	97.5	8.0-32	16	99.6
	Fluconazole	8.0-64	16	100.0	16-128	32	100.0
	Itraconazole	0.12-1.0	0.5	95.8	0.25-1.0	0.5	100.0
	Ketoconazole	0.12-1.0	0.5	95.4	0.25-1.0	0.5	99.6
	Micafungin	0.12-0.5	0.25	99.6	0.12-0.5	0.25	99.0
	Posaconazole	0.06-0.5	0.25	100.0	0.12-1.0	0.5	99.6
	Ravuconazole	0.06-0.5	0.25	93.3	0.25-1.0	0.5	100.0
Voriconazole	0.06-0.5	0.25	98.3	0.12-1.0	0.5	100.0	

NOTE 1: The MIC QC ranges in boldface type were adopted at a meeting of the subcommittee held on 20 January 2007 in Tampa, FL. These breakpoints are considered tentative for one year and are open for comments.

NOTE 2: ATCC[®] is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

NOTE 3: The MIC for anidulafungin, caspofungin, and micafungin is the lowest concentration at which a score of 2 (prominent decrease in turbidity; see CLSI document M27-A3, Section 7.6.3) is observed after 24 hours incubation.

ANEXO B – Critérios de interpretação para testes de susceptibilidade antifúngica de *Candida* spp para 5-fluorocitosina e itraconazol (Protocolo M27-S3; CLSI, 2008). Para as equinocandinas e para o voriconazol novos pontos de corte clínico foram definidos (Protocolo M27-S4; CLSI 2012).

Volume 28

M27-S3

Table 1. Interpretive Guidelines for *In Vitro* Susceptibility Testing of *Candida* spp.

Antifungal Agent	Susceptible (S)	Susceptible-dose dependent (S-DD) ^a	Intermediate (I) ^b	Resistant (R)	Nonsusceptible (NS)
Anidulafungin ^c	≤2	-	-	-	>2
Caspofungin ^c	≤2	-	-	-	>2
Fluconazole ^d	≤8	16-32	-	≥64	-
Flucytosine ^e	≤4	-	8-16	≥32	-
Itraconazole ^f	≤0.125	0.25-0.5	-	≥1	-
Micafungin ^c	≤2	-	-	-	>2
Voriconazole ^c	≤1	2	-	≥4	-

NOTE 1: Shown are the breakpoints (µg/mL) for *Candida* spp. against the indicated agents. If minimal inhibitory concentrations (MICs) are measured using a scale that yields results falling between categories, the next higher category is implied. Thus, an isolate with a fluconazole MIC of 12.5 µg/mL would be placed in the S-DD category.

NOTE 2: The MIC breakpoints in boldface type were adopted at a meeting of the subcommittee held on 9 June 2007 in Boston, MA. These breakpoints are considered tentative for one year and are open for comments. There is no Resistant category assigned for the echinocandin agents; isolates with higher MICs may be described as nonsusceptible.

Footnotes

- Susceptibility is dependent on achieving the maximal possible blood level. For fluconazole, doses of 400 mg/day or more may be required in adults with normal renal function and body habitus. For itraconazole, measures to assure adequate drug absorption and plasma itraconazole concentrations of >0.5 µg/mL may be required for optimal response.
- The susceptibility of these isolates is not certain, and the available data do not permit them to be clearly categorized as either “susceptible” or “resistant.”
- For these drugs, the data are based substantially on experience with non-neutropenic patients with candidemia, and their clinical relevance in other settings is uncertain.
- For fluconazole, these guidelines are based on extensive experience with mucosal and invasive infections due to *Candida* spp. It is also pertinent that the 8-µg/mL upper boundary for the susceptible range of fluconazole is not known with certainty—the data would permit selection of either 4 or 8 µg/mL for this cutoff. When an isolate is identified as *Candida glabrata* and the MIC is ≤ 32, patients should receive a maximum dosage regimen of fluconazole. Expert consultation on selection of a maximum dosage regimen may be useful. Finally, isolates of *Candida krusei* are assumed to be intrinsically resistant to fluconazole, and their MICs should not be interpreted using this scale.
- Flucytosine MIC breakpoints are based largely on historical data and partially on the drug’s pharmacokinetics.
- For itraconazole, the data are based entirely on experience with mucosal infections, and data supporting breakpoints for invasive infections due to *Candida* spp. are not available.

ANEXO C – Critérios de interpretação para testes de susceptibilidade antifúngica de *Candida* spp para o fluconazol e voriconazol (protocolo M27-S4; CLSI, 2012).

Volume 32

M27-S4

Table 2. Interpretive Guidelines for *In Vitro* Susceptibility Testing of *Candida* spp. and Selected Azoles After 24-hour Incubation

Antifungal Agent	Species	MIC Range (µg/mL)		
		S	SDD ^a	R
Fluconazole ^b	<i>C. albicans</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. glabrata</i>	–	≤32	≥64
	<i>C. krusei</i>	–	–	–
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≤2	4	≥8
Voriconazole ^{c,d}	<i>C. albicans</i>	≤0.12	0.25–0.5	≥1
	<i>C. glabrata</i> ^e	–	–	–
	<i>C. krusei</i>	≤0.5	1	≥2
	<i>C. parapsilosis</i>	≤0.12	0.25–0.5	≥1
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.12	0.25–0.5	≥1

Abbreviations: MIC, minimal inhibitory concentration; R, resistant; S, susceptible; SDD, susceptible-dose dependent.

NOTE 1: All MIC breakpoints in this table were adopted at meetings of the subcommittee held in Atlanta, Georgia, USA on June 12, 2010 and in Orlando, Florida, USA on January 8, 2011 for voriconazole and fluconazole, respectively. These breakpoints are considered tentative for one year from the publication date of M27-S4 and are open for comment.

NOTE 2: The breakpoints (µg/mL) for *Candida* spp. are shown against the indicated agents. If MICs are measured using a scale that yields results that fall between the categories, the next highest category is implied. Thus, an isolate for which the fluconazole MIC equals 3 µg/mL would be placed in the SDD category.

Footnotes

- ^a Susceptibility is dependent on achieving the maximal possible blood level. For fluconazole, doses higher than the standard dosing (6 mg/kg/d) amount may be required in adults with normal renal function and body habitus.
- ^b For fluconazole, these guidelines are based on extensive experience with mucosal and invasive infections due to *Candida* spp. When an isolate is identified as *C. glabrata* and the MIC is ≤32, it should be considered if fluconazole is appropriate in the specific clinical context. If so, patients should receive a maximum dosage regimen of fluconazole. Expert consultation on selection of a maximum dosage regimen may be useful. Finally, isolates of *C. krusei* are assumed to be intrinsically resistant to fluconazole and their MICs should not be interpreted using this scale.
- ^c For voriconazole, the data are based substantially on experience with non-neutropenic patients with candidemia and their clinical relevance in other settings is uncertain.
- ^d Breakpoints may also be used for 48-hour readings if 24-hour growth control shows insufficient growth.
- ^e The current data are insufficient to demonstrate a correlation between *in vitro* susceptibility testing and clinical outcome for *C. glabrata* and voriconazole.

ANEXO D – Critérios de interpretação para testes de susceptibilidade antifúngica de *Candida* spp para as equinocandinas (protocolo M27-S4; CLSI, 2012).

Volume 32

M27-S4

Table 1. Interpretive Guidelines for *In Vitro* Susceptibility Testing of *Candida* spp. and Echinocandins¹

Antifungal Agent	Species	MIC Range (µg/mL)		
		S	I ^a	R
Anidulafungin ^b	<i>C. albicans</i>	≤0.25	0.5	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0.12	0.25	≥0.5
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	0.5	≥1
	<i>C. krusei</i>	≤0.25	0.5	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	≥8
Caspofungin ^{b,c}	<i>C. albicans</i>	≤0.25	0.5	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0.12	0.25	≥0.5
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	0.5	≥1
	<i>C. krusei</i>	≤0.25	0.5	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	≥8
Micafungin ^b	<i>C. albicans</i>	≤0.25	0.5	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0.06	0.12	≥0.25
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	0.5	≥1
	<i>C. krusei</i>	≤0.25	0.5	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	≥8

Abbreviations: I, intermediate; MIC, minimal inhibitory concentration; R, resistant; S, susceptible.

NOTE 1: All MIC breakpoints in this table were adopted at meetings of the subcommittee held on June 12, 2010 in Atlanta, Georgia, USA, and January 8, 2011 in Orlando, Florida, USA. These breakpoints are considered tentative for one year from the publication date of M27-S4 and are open for comment.

NOTE 2: The selected breakpoints have been established to discriminate resistant mutants from susceptible isolates and differences in breakpoints reflect methodological issues. Due to *in vitro* methodological issues, the interpretive breakpoint of micafungin against *C. glabrata* is lower than that of other echinocandins. This does not reflect any inherent clinical differences in efficacy. True differences in antifungal activity amongst the echinocandins are rare.²

Footnotes

- ^a The ability to successfully treat infections with isolates for which the MIC results are in the intermediate category. The available data do not permit the MIC results to be clearly categorized as either “susceptible” or “resistant.”
- ^b For these drugs, the data are based substantially on experience with non-neutropenic patients with candidemia, and their clinical relevance in other settings is uncertain.
- ^c Caspofungin susceptibility testing has been associated with a significant variation due (at least in part) to variability in the potency of different lots of caspofungin pure substance and to a lower stability in water (which was originally recommended as a solvent).