

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

**SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS AZÓIS EM
CANDIDA PARAPSILOSIS E *CANDIDA TROPICALIS*: DESAFIOS E
PERSPECTIVAS NO CONTEXTO DA SAÚDE ÚNICA**

Gabriel Henrique Rodrigues da Cruz

Dourados, MS

2024

GABRIEL HENRIQUE RODRIGUES DA CRUZ

**SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS AZÓIS EM
CANDIDA PARAPSILOSIS E *CANDIDA TROPICALIS*: DESAFIOS E
PERSPECTIVAS NO CONTEXTO DA SAÚDE ÚNICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do
título de graduado em Ciências Biológicas -
Bacharelado pela Universidade Federal da
Grande Dourados.

Orientador (a): Prof^a Dra. Luana Rossato

Coorientador (a): Dra. Fabíola Lucini

Dourados, MS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C957s Cruz, Gabriel Henrique Rodrigues Da
SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS AZÓIS EM CANDIDA
PARAPSILOSIS E CANDIDA TROPICALIS: DESAFIOS E PERSPECTIVAS NO CONTEXTO
DA SAÚDE ÚNICA [recurso eletrônico] / Gabriel Henrique Rodrigues Da Cruz. -- 2024.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Luana Rossato.
Coorientadora: Fabíola Lucini.
TCC (Graduação em Ciências Biológicas)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Saúde Única. 2. Infecções fúngicas. 3. Resistência. 4. Fluconazol. 5. Tebuconazol. I. Rossato,
Luana. II. Lucini, Fabíola. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Susceptibilidade e Resistência aos Antifúngicos Azóis em *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*: Desafios e Perspectivas no Contexto da Saúde Única

Gabriel Henrique Rodrigues da Cruz

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de graduado em Ciências Biológicas - Bacharelado pela Universidade Federal da Grande Dourados.

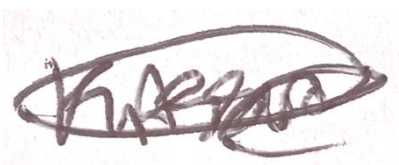
Aprovado em: 15/06/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br LUANA ROSSATO
Data: 16/07/2024 17:35:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

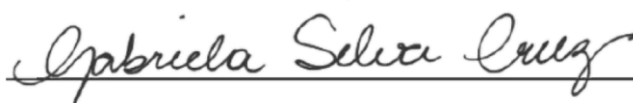
Orientador(a)

Prof^a Dra. Luana Rossato
Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)



Membro da banca

Prof^a Dra. Kássia Jéssica Galdino da Silva Schinaider
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)



Membro da banca

Prof^a Dra. Gabriela Silva Cruz
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas e instituições que contribuíram para a realização deste trabalho:

A minha orientadora, Professora Dra. Luana Rossato, pela orientação, paciência, e valiosas contribuições ao longo deste processo.

A minha coorientadora, Dra. Fabíola Lucini, pela dedicação, suporte e colaboração durante todo esse trajeto.

À minha família, pelo apoio, compreensão e incentivo ao longo dessa jornada acadêmica.

Aos meus colegas de curso, laboratório e Iniciação Científica, pela colaboração, troca de ideias, e momentos compartilhados que tornaram essa jornada mais leve e enriquecedora.

A meus amigos dentro e fora da Universidade que me acompanharam e incentivaram ao longo de todo esse processo.

Aos profissionais e participantes que dedicaram seu tempo para contribuir com informações e dados relevantes para este trabalho.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, pela bolsa que foi disponibilizada para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pelos recursos disponibilizados, ambiente de aprendizado e oportunidades oferecidas ao longo do curso.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste estudo, o meu sincero obrigado.

RESUMO

Fungos são agentes oportunistas presentes nos mais diversos ambientes, incluindo hospitais, ambientes domésticos, solo, água e animais. O crescente número de relatos de resistência a antifúngicos, particularmente às espécies de *Candida* não-*albicans*, representa um problema alarmante que exige novas abordagens clínicas. Buscando investigar a resistência de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* dentro do contexto da Saúde Única no País, diversas amostras dessas espécies, das mais diversas origens (isolados de pacientes humanos, suínos, aves e superfícies de ambientes hospitalares) foram coletadas em quatro estados brasileiros: Mato Grosso do Sul, Ceará, Rio Grande do Norte e Minas Gerais. Feita a identificação dos isolados, foram realizados testes de susceptibilidade pelo método de Microdiluição em caldo para fluconazol e tebuconazol, conforme descrito pelo CLSI, tanto a 30°C e 37°C. Ao total foram identificados e testados 99 isolados, sendo 27 de *C. parapsilosis* e 72 de *C. tropicalis*. Os resultados revelaram a presença de alguns isolados de *C. tropicalis* com elevados CIMs para fluconazol, outros para tebuconazol, muitas vezes com o perfil de suscetibilidade variando conforme a temperatura; além destes, um restrito número de cepas demonstrou resistência para ambos os compostos, o que indica o desenvolvimento de mecanismos de resistência-cruzada. A pesquisa enfatiza a necessidade contínua de vigilância da resistência antifúngica e o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos ou combinações terapêuticas para superar os mecanismos de resistência emergentes e garantir melhores resultados clínicos para os pacientes.

Palavras-chave: Saúde Única, Infecções fúngicas, Resistência; Fluconazol, Tebuconazol.

ABSTRACT

Fungi are opportunistic agents present in diverse environments, including hospitals, domestic settings, soil, water, and animals. The increasing number of reports of antifungal resistance, particularly in non-albicans *Candida* species, represents an alarming problem that demands new clinical approaches. Aiming to investigate the resistance of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* within the context of One Health in the country, various samples of these species from diverse origins (isolates from human patients, pigs, birds, and hospital environment surfaces) were collected in four Brazilian states: Mato Grosso do Sul, Ceará, Rio Grande do Norte, and Minas Gerais. After identifying the isolates, susceptibility tests were performed using the Broth Microdilution method for fluconazole and tebuconazole, as described by the CLSI, at both 30°C and 37°C. A total of 99 isolates were identified and tested, including 27 *C. parapsilosis* and 72 *C. tropicalis*. The results revealed the presence of some *C. tropicalis* isolates with high MICs for fluconazole and others for tebuconazole, often with susceptibility profiles varying with temperature. Additionally, a limited number of strains showed resistance to both compounds, indicating the development of cross-resistance mechanisms. The research emphasizes the ongoing need for antifungal resistance surveillance and the development of new antifungal agents or therapeutic combinations to overcome emerging resistance mechanisms and ensure better clinical outcomes for patients.

Keywords: One Health, Fungal infections, Resistance; Fluconazole, Tebuconazole.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 <i>Candida</i> spp.	12
2.1.1 <i>Candida tropicalis</i>	13
2.1.2 <i>Candida parapsilosis</i>	14
2.2 Azóis e Resistência fúngica	15
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. METODOLOGIA	20
4.1. Amostras de Aves e Suínos.....	20
4.2 Amostras de Superfícies Hospitalares	21
4.3 Amostras de Pacientes	22
4.4 Manuseio e Identificação Das Amostras	23
4.4.1 ISOLAMENTO DE COLÔNIAS	23
4.4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES.....	24
4.5 Teste de Susceptibilidade	24
4.5.1 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO E PLACAS DE TESTE	24
4.5.2 PREPARO DOS INÓCULOS.....	25
4.5.3 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS	25
4.6 Análise e Representação Dos Resultados	26
5. RESULTADOS	27
5.2 CIMs de <i>C. parapsilosis</i> à 30° e 37°C.....	28
5.3 CIMs de <i>C. tropicalis</i> à 30° e 37°	30
5.4 Ocorrência de cepas multirresistentes.....	32
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos amplamente distribuídos, encontrados em todo o mundo e notáveis como agentes oportunistas, apresentando uma extensa presença na natureza. Eles podem ser detectados no ar, em superfícies hospitalares e domésticas, bem como em plantas, solo, água e alimentos. Além disso, encontram abrigo nos corpos de animais domésticos e selvagens (Fisher et al., 2012; Mayer et al., 2013). Muitos desses fungos têm a capacidade de colonizar temporária ou permanentemente a pele e as mucosas dos seres humanos. A transição de colonizador para agente infeccioso depende de mudanças no perfil imunológico do hospedeiro, bem como da exposição a antibióticos, imunossupressores ou procedimentos médicos invasivos (Brandt, 2002; Lionakis & Netea, 2013).

Globalmente, estima-se que mais de 6,55 milhões de pessoas são afetadas anualmente por doenças fúngicas que ameaçam a vida imediatamente, resultando em mais de 3,75 milhões de mortes. Aproximadamente 2,55 milhões dessas mortes são diretamente atribuíveis à infecção, conforme demonstrado em um artigo publicado pela revista *The Lancet* (Rajasingham et al., 2022). Os setores de financiamento para ciência e tecnologia, assim como os serviços de saúde, mobilizam poucos recursos para essa área. Uma evidência dessa negligência é o limitado arsenal de antifúngicos disponíveis para uso clínico, que inclui azóis, equinocandinas, polienos, alilaminas e derivados de pirimidina (Gow et al., 2022a). Além disso, a ausência de vacinas terapêuticas ou imunoterapias disponíveis, juntamente com o lento ritmo de inovação no desenvolvimento de antifúngicos, contrasta fortemente com outros setores da indústria farmacêutica. Isso se reflete no número significativamente menor de publicações sobre o desenvolvimento de antifúngicos em comparação com o desenvolvimento de antibióticos (Perfect, 2017a).

Os fungos apresentam um ciclo de vida curto, plasticidade genômica e uma notável capacidade de adaptação a ambientes naturais que contêm compostos potencialmente tóxicos, o que gera uma intensa pressão seletiva (Gow et al., 2022a). Devido à sua bioquímica, os fungos podem se tornar patogênicos de maneira especialmente prejudicial, pois possuem um número limitado de alvos seletivos para fármacos. Esses desafios são exacerbados pela emergência de organismos que são resistentes, tolerantes ou insensíveis aos medicamentos, especialmente em um contexto de aumento no número de pacientes imunocomprometidos (Gow et al., 2022a).

Linhagens resistentes têm sido detectadas pouco tempo após a introdução de novos antifúngicos no mercado (Denning & Bromley, 2015). É crucial antecipar que a resistência emergirá assim que esses antifúngicos forem utilizados em contexto clínico. A resistência aos antifúngicos pode desenvolver-se rapidamente, frequentemente através da ativação de vias de resposta ao estresse, e ocasionalmente envolvendo alterações cromossômicas. A negligência deste tópico tem um impacto negativo na saúde pública, considerando que a resistência é um dos fatores que contribuem para a alta mortalidade em infecções fúngicas invasivas, às vezes excedendo 80% (Rajasingham et al., 2022; Singulani et al., 2022).

É de especial atenção o fato de que a resistência a antifúngicos tem aumentado significativamente em leveduras, o que coloca em risco milhões de pessoas afetadas anualmente por infecções fúngicas. Especialmente as espécies do gênero *Candida* são preocupantes, pois quadros de candidemia representam a infecção fúngica invasiva mais prevalente em todo o mundo (Folha, 2023). Além disso, é alarmante que linhagens resistentes sejam frequentemente isoladas de pacientes sem histórico de tratamento com antifúngicos (Bastos et al., 2021a). Estima-se que cerca de 75% das linhagens resistentes sejam isoladas de pacientes que não foram previamente submetidos a tratamento. Isso sugere que esses pacientes foram infectados por linhagens já resistentes, possivelmente originárias do ambiente, de animais e/ou de outros pacientes (Bongomin et al., 2017). Portanto, é crucial considerar o ambiente como uma possível fonte de resistência aos antifúngicos.

Para uma compreensão mais clara da gravidade da situação, considere o seguinte exemplo comparativo: dentro da cadeia de produção animal, suínos e aves são reconhecidos como reservatórios de bactérias que carregam genes de resistência aos antibacterianos (Arora et al., 2021; Wang et al., 2019). Desde 2016, o uso de antibacterianos como promotores de crescimento na exportação de carne suína para a União Europeia foi proibido, após o isolamento de bactérias resistentes às polimixinas em porcos (Rhouma et al., 2016). Apesar dessa medida, a ligação desses animais com leveduras resistentes, especialmente com espécies do gênero *Candida*, tem sido negligenciada. Além disso, não podemos descartar a possibilidade de que os desinfetantes utilizados na suinocultura e avicultura também possam favorecer a seleção de clones resistentes (Bastos et al., 2018). Especialmente considerando que as principais espécies patogênicas de *Candida*, como *Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923), *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice (1932), *Candida glabrata* Anderson (1917) e *C. tropicalis* (Castellani) Berkhout

(1923), são frequentemente encontradas em ambientes como solos agrícolas, água, frutos, entre outros (Castelo-Branco et al., 2022).

Nesse contexto, a abordagem de Saúde Única (ou *One Health*), promovida pela aliança FAO/OIE/OMS, reconhece que a saúde humana, animal e ambiental estão interconectadas. A resistência antimicrobiana é uma das três prioridades desta aliança, especialmente considerando que, no país, o uso de agrotóxicos aumentou 190% entre 2000 e 2012, sendo 14% deste mercado correspondente a fungicidas (Rigotto et al., 2014). No que diz respeito à *Candida*, estudos sobre a resistência cruzada com agroquímicos mostraram que as leveduras têm a capacidade de se multiplicar na presença de concentrações crescentes desses aditivos agrícolas, resultando em resistência cruzada com antifúngicos tanto *in vitro* quanto em modelos animais (Carneiro et al., 2020; Sidrim et al., 2021). Além disso, ambientes como hospitais (tanto humanos quanto veterinários) estão constantemente expostos a uma grande pressão seletiva por desinfetantes. Portanto, são urgentemente necessários investimentos para adotar uma abordagem integrada de Saúde Única no contexto das micoses, com o objetivo de atenuar, ou quem sabe até reverter, os números catastróficos associados a essas infecções (Gow et al., 2022b).

Este projeto visa responder à questão central: a resistência aos antifúngicos azólicos pode ter sua origem em animais de produção ou no contato prévio do microrganismo com agroquímicos e desinfetantes?

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *CANDIDA* SPP.

Candida é um gênero de fungos de importância médica, contando com mais de 300 espécies, das quais cerca de 20 são potencialmente patogênicas para humanos e outros mamíferos (Shan et al., 2014; Theill et al., 2016). Embora muitas dessas espécies sejam comensais ou endossimbiontes, elas podem se tornar invasivas e causar danos significativos ao hospedeiro em situações de ruptura das barreiras mucosas ou de comprometimento do sistema imunológico. *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada em infecções fúngicas em humanos e é comumente encontrada nas superfícies mucosas, especialmente no trato gastrointestinal e na pele (Colombo & Guimarães, 2003).

Outras espécies, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, também são parte da microbiota humana e, juntamente com *C. albicans*, são responsáveis pela maioria das infecções do gênero. Estas infecções, coletivamente chamadas de candidíase, podem variar de micoses superficiais e profundas, como abscessos intra-abdominais, peritonite e osteomielite, até infecções invasivas, como candidemia (Brown et al., 2012; Neufeld et al., 2015; Pappas et al., 2018; Pristov & Ghannoum, 2019; Ulu Kilic et al., 2017). A candidíase é geralmente tratada com polienos, equinocandinas e, especialmente, azóis. No entanto, o uso de azóis tem se mostrado limitado devido ao crescente número de cepas clínicas resistentes a esses compostos, especialmente entre as espécies de *Candida* não-*albicans* (Pfaller et al., 2010, 2011, 2012; Pristov & Ghannoum, 2019). Isso pode estar relacionado ao amplo uso de fluconazol como profilaxia em pacientes considerados em risco de infecção, o que poderia estar selecionando resistência secundária (Autmizguine et al., 2018; Bennett et al., 2004; Goldman et al., 2000; Wingard et al., 1991).

É notável que, embora a principal rota de desenvolvimento de resistência aos azóis em *Candida* spp. seja no hospedeiro, o isolamento de cepas resistentes em pacientes sem histórico prévio de tratamento antifúngico tem se tornado frequente (Arastehfar et al., 2020; Chen et al., 2019; Chong et al., 2012a; Pfaller & Diekema, 2004b, 2004a; Thomaz et al., 2018). Uma das explicações propostas para esse fenômeno é a aquisição dessa resistência no ambiente, uma vez que *Candida* spp. também é encontrada em solos, árvores, frutas e água, e sua exposição a agroquímicos fungicidas poderia estar desencadeando um efeito de resistência cruzada, gerando no organismo a capacidade de desenvolver resistência a um determinado

antifúngico e, subsequentemente, manifestar resistência a outros antifúngicos da mesma classe ou com mecanismos de ação similares (Bastos et al., 2021d).

2.1.1 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis é frequentemente isolada de pacientes com candidíase e atualmente está entre as primeiras ou segundas espécies de *Candida* não-*albicans* (NCAC) mais prevalentes envolvidas em candidemia, principalmente na Ásia e na América Latina (Furlaneto et al., 2011; Motoa et al., 2017; Xiao et al., 2015). Esta espécie é um agente comum de infecções em pacientes em unidades de terapia intensiva e em indivíduos com neutropenia (Turner & Butler, 2014). Acredita-se que *C. tropicalis* cause infecções sistêmicas mais persistentes do que *C. albicans*, além de apresentar uma taxa de mortalidade mais elevada em comparação com outras NCACs (Zuza-Alves et al., 2017).

Recentemente, diversos estudos têm observado um aumento na incidência de isolados de *C. tropicalis* resistentes a azóis, tanto dentro quanto fora do ambiente hospitalar (Fan et al., 2017; Santos et al., 2014). A susceptibilidade reduzida a antifúngicos também foi relatada em *C. tropicalis* recuperadas de várias espécies de animais (Álvarez-Pérez et al., 2016; Cordeiro et al., 2015; Lord et al., 2010; Subramanya et al., 2017). Em Taiwan, isolados da espécie resistentes a azóis foram identificados na superfície de frutas, todos compartilhando o mesmo genótipo predominante de *C. tropicalis* resistente ao fluconazol, responsável por quadros de candidemia em pacientes taiwaneses (Figura 1) (Oliveira et al., 2020ab). Além disso, isolados da espécie coletados no solo do país demonstraram redução na susceptibilidade ao fluconazol, exibindo parentesco genético com cepas clínicas menos suscetíveis a azóis. Adicionalmente, esses isolados foram mais resistentes aos azóis agrícolas, sugerindo uma resistência cruzada entre azóis ambientais e clínicos (Yang et al., 2012).

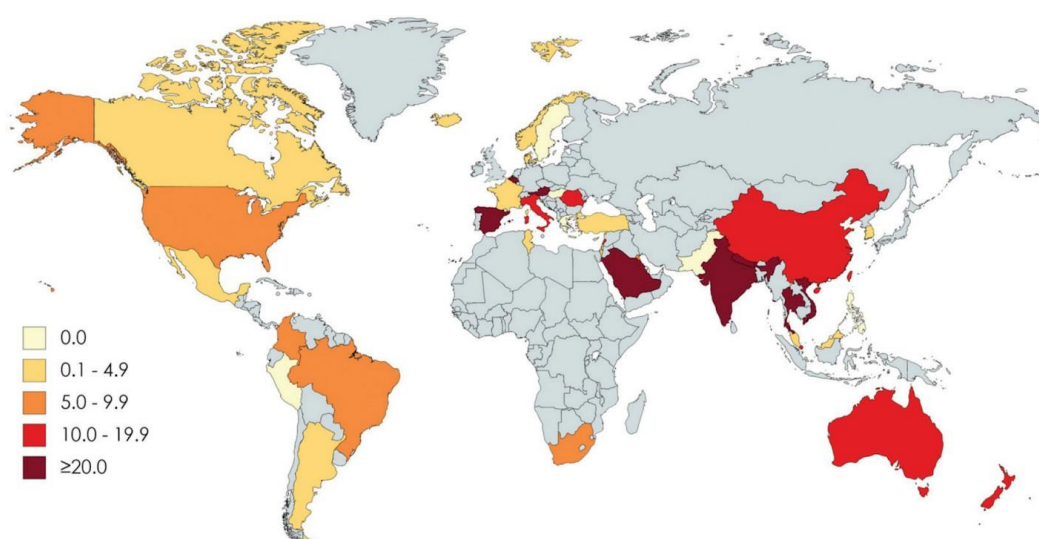


Figura 1. Taxas de resistência ao fluconazol (%) em isolados clínicos de *C. tropicalis* em todo o mundo, de 2008 a 2019. Os dados são de estudos que realizaram testes de susceptibilidade com *C. tropicalis* isolados de sangue e outros locais estéreis. Fonte: Oliveira et al., 2020b.

2.1.2 *Candida parapsilosis*

Candida parapsilosis é uma das principais causadoras de candidemia, representando mais de 20% dos isolados de *Candida* em hemoculturas em diversos países, como Brasil, Argentina, Peru, Espanha, Rússia e China, e mais de 30% em outros, incluindo Turquia, Grécia, Croácia, Romênia, África do Sul, Nigéria e Paraguai. Embora anteriormente fosse considerada suscetível ao fluconazol, tem-se observado um crescente número de relatos de resistência dessa espécie em várias regiões, o que é alarmante devido à alta mortalidade associada à infecção invasiva por essa espécie (Figura 2) (Daneshnia et al., 2023a).

Antes de 2019, estudos já relataram uma prevalência de mais de 10% de *C. parapsilosis* resistentes a fluconazol em diversas partes do mundo. Nos três anos subsequentes, houve uma expansão dessas cepas resistentes, que agora predominam sobre os isolados suscetíveis em ambientes hospitalares, persistindo em diferentes áreas e desencadeando surtos esporádicos entre pacientes que não haviam sido previamente expostos a azóis, apesar das medidas rigorosas de controle de infecção (Figura 2) (Daneshnia et al., 2023b; Thomaz et al., 2021).

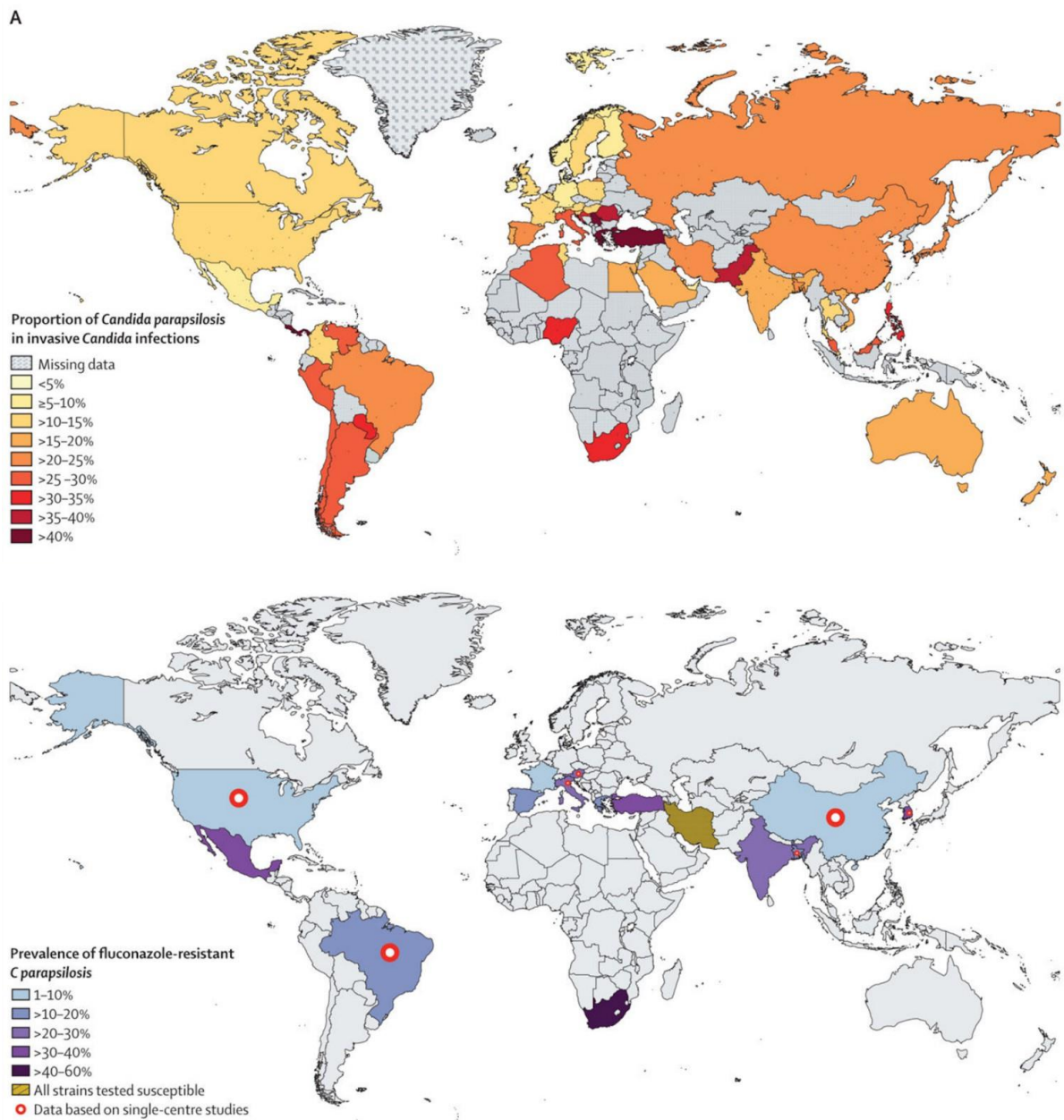


Figura 2. Epidemiologia de *C. parapsilosis* em todo o mundo. **A** Epidemiologia mundial de *C. parapsilosis*. **B** Carga de isolados resistentes ao fluconazol. Fonte: Daneshnia et al., 2023b.

2.2 AZÓIS E RESISTÊNCIA FÚNGICA

Os azóis constituem a classe de antifúngicos mais amplamente utilizada (Guo et al., 2021) e são divididos em imidazóis e triazóis, de acordo com o número de átomos de nitrogênio presentes no anel azólico (2 e 3, respectivamente). Dentro dessa categoria, os triazóis, como fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol, são os mais

empregados no tratamento de infecções fúngicas invasivas devido ao seu amplo espectro de atividade e perfil de segurança (Castro et al., 2016). Os azóis atuam interrompendo a produção de ergosterol, um componente estrutural das membranas celulares fúngicas, por meio da inibição da enzima lanosterol-14 α -D-demetilase, codificada pelos ortólogos ERG11 em leveduras. Este mecanismo bloqueia a remoção de um grupo metila C-14 α do lanosterol, impedindo várias reações necessárias para sua conversão em ergosterol e reduzindo os níveis deste na membrana celular. Isso resulta no acúmulo de esteróis tóxicos, como o 14 α -metilfecosterol, comprometendo a integridade e permeabilidade da membrana e, em última análise, inibindo o crescimento fúngico (Ben-Ami & Kontoyiannis, 2021; Nett & Andes, 2016; Perfect, 2017b).

A falha no tratamento e o elevado índice de óbitos causados por micoses sistêmicas frequentemente ocorrem devido ao desenvolvimento de resistência por parte do patógeno (Bastos et al., 2021b). A resistência microbiológica é definida como a incapacidade de um antifúngico matar ou inibir o crescimento fúngico *in vitro*, podendo ser primária ou intrínseca quando um microrganismo é naturalmente resistente ao medicamento sem exposição prévia, ou secundária, quando mutações de resistência surgem na população e são selecionadas após a exposição ao antifúngico (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014; Ben-Ami & Kontoyiannis, 2021; Fisher et al., 2018).

Os mecanismos primários e secundários de resistência aos azóis são bem estudados e compreendidos em *Candida* spp. Dentre os mecanismos identificados, destacam-se dois principais: a mutação do gene responsável pela produção da enzima ERG11, alterando seu sítio de ligação e impedindo a interação deste com o azol (Figura 3); e a formação de bombas de efluxo, proteínas codificadas pelos genes MDR1, CDR1 e CDR2. Estas atuam como transportadoras de membrana, expelindo a droga do meio intracelular para o extracelular (Pristov & Ghannoum, 2019). Curiosamente, os azóis agrícolas selecionam resistência cruzada utilizando exatamente os mesmos mecanismos subjacentes à resistência ao fluconazol (Brilhante et al., 2019; Rocha et al., 2016). A análise de isolados sequenciais de pacientes individuais revelou que a resistência adquirida aos azóis frequentemente depende de múltiplos mecanismos moleculares, muitas vezes combinados.

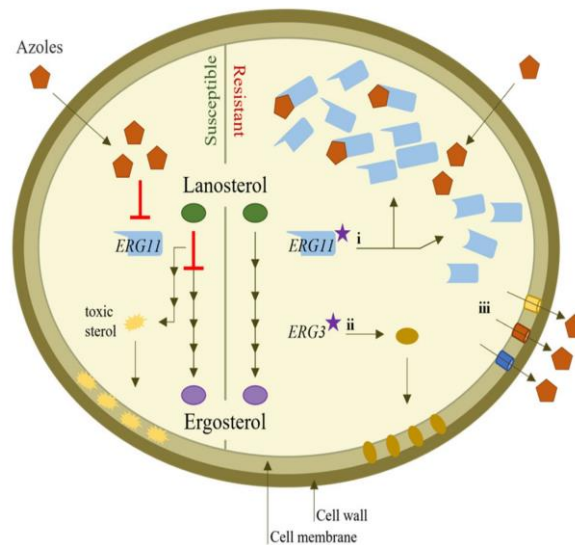


Figura 3. Os azóis se ligam e inibem a atividade da enzima lanosterol 14 α -desmetilase, codificada pelo gene ERG11, o que leva ao acúmulo de esteroide tóxico. A resistência aos azóis envolve: (i) mutações pontuais no gene ERG11, que podem ser responsáveis pela superexpressão e/ou inibição da enzima lanosterol 14 α -desmetilase devido à diminuição da afinidade de ligação entre o azol e seu alvo; (ii) mutações nos genes ERG envolvidos na via de biossíntese do ergosterol, particularmente no ERG3; e (iii) aumento do efluxo dos medicamentos azólicos da célula fúngica através da superexpressão de bombas de efluxo multidrogas. Barras vermelhas em forma de T indicam inibição. O ícone de estrela indica mutação genética. Fonte: Branco et al., 2023.

Vários casos de isolamento de cepas resistentes a azóis em pacientes sem terapia antifúngica prévia foram relatados, sugerindo que outras vias podem estar contribuindo para a resistência antifúngica (Chowdhary et al., 2012, 2017; Mellado et al., 2007; Snelders et al., 2008; van der Linden et al., 2011). Essa resistência também ocorre no ambiente, uma vez que cepas resistentes foram isoladas de materiais vegetais, solo, matéria em decomposição e compostos orgânicos (Bastos et al., 2021c). Isso levanta uma questão importante: como surge a resistência aos azóis em isolados ambientais?

Uma resposta para essa pergunta está no uso massivo de fungicidas durante e após a colheita em ambientes de cultivo de grãos e gramíneas, assim como na conservação de tintas, revestimentos e pastas para papel de parede, para prevenir a deterioração e o crescimento fúngico. Triazóis ambientais, que compartilham o mesmo mecanismo de ação que os de uso clínico, são amplamente utilizados no controle de fitopatógenos fúngicos (Cui et al., 2019; Snelders et al., 2012). Por essa razão, considerando a frequência com que patógenos potenciais humanos são encontrados no solo e em matéria vegetal, a hipótese

predominante é que os agroquímicos, especialmente os inibidores de 14 α -desmetilase (DMIs), exercem uma pressão seletiva para o surgimento de cepas resistentes no ambiente (Figura 4) (Bastos et al., 2018; Snelders et al., 2009).

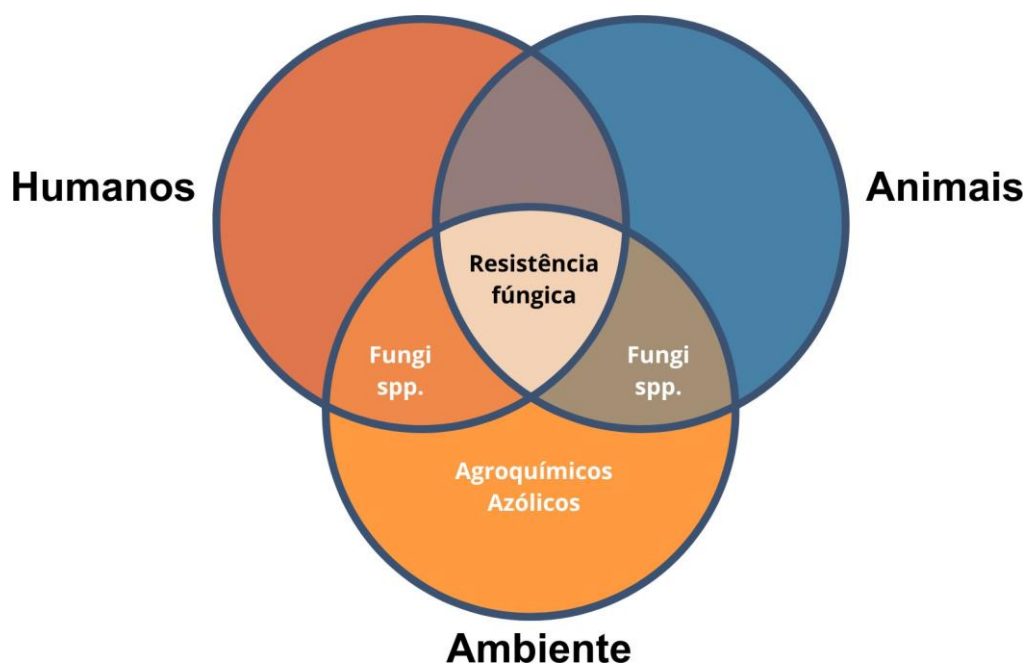


Figura 4. Resumo gráfico da relação entre a contaminação de humanos e animais por parte de cepas resistentes e a utilização de fungicidas no ambiente. Autoria própria.

Os azóis são utilizados na agricultura desde a década de 1970, compondo a classe de antifúngicos mais utilizados devido a dois fatores: alta eficiência e amplo espectro de atividade (Price et al., 2015). Seu uso para fins não médicos abrange desde a agricultura e horticultura até a prevenção de perdas pós-colheita, tendo como alvo uma grande variedade de patógenos fúngicos em várias culturas. Diversos azóis, como tebuconazol (1992), difenoconazol (1994), epoxiconazol (1994) e bromuconazol (2000), são amplamente utilizados no controle de doenças foliares na produção de cereais e frutas (Russell, 2005), bem como no controle de doenças de sementes, folhas e espigas.

No entanto, além das ameaças ecotoxicológicas decorrentes do acúmulo desses compostos no solo e em corpos d'água, com o tempo, o desenvolvimento de resistência fúngica têm sido a grande preocupação para doenças fitopatológicas de grande impacto econômico nas quais os azóis têm sido amplamente utilizados: Em vários casos, tem sido desafiador substituir os azóis por outros fungicidas de eficácia semelhante. Os problemas crescentes com resistência têm exigido a recomendação de estratégias anti-resistência, como a alternância ou

mistura de compostos ativos com diferentes modos de ação, a aplicação de menos tratamentos e a redução da dose para minimizar a pressão de seleção (van den Bosch et al., 2014)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a resistência de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* dentro do contexto da Saúde Única, analisando isolados provenientes de aves, suínos, e do ambiente em que esses animais residem, bem como de pacientes humanos e ambientes hospitalares.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer uma rede para determinar a susceptibilidade de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* isoladas de animais em criadouros e pacientes internados em diferentes hospitais do Brasil.
- Avaliar a susceptibilidade ao fluconazol (antifúngico clínico) e tebuconazol (agroquímico) das cepas *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* coletadas.
- Traçar o perfil geoepidemiológico das leveduras utilizando amostras de diversas regiões do país.

4. METODOLOGIA

Primeiramente, uma equipe de profissionais foi constituída, associando-se às equipes multidisciplinares em três regiões do país, organizadas em três núcleos: **Núcleo Sudeste** - inclui a Universidade Federal de Minas Gerais com o Laboratório de Micologia e o Hospital Veterinário da UFMG; Granja de Suínos e Granja de Aves da Fazenda Experimental em Igarapé (MG); e a Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais – FHEMIG (Hospital Eduardo de Menezes). **Núcleo Nordeste** - abrange a Universidade Federal do Rio Grande do Norte com o Hospital Giselda Trigueiro e a Escola Agrícola de Jundiaí; Universidade Federal do Ceará com o Hospital Universitário Walter Cantídio e a Fazenda Experimental; e a Universidade Estadual do Ceará com o Hospital Veterinário Prof. Sylvio Barbosa Cardoso. **Núcleo Centro-Oeste** - composto pela Universidade Federal da Grande Dourados e pelo Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados. Além disso, há colaboração internacional com a Nantes Université, na França.

Para determinar o perfil de susceptibilidade de leveduras dos gêneros *Candida* em diferentes regiões do país, foram obtidas diversas amostras de cada estado. As amostras incluem isolados de pacientes humanos e veterinários, suínos e aves de criadouros, bem como de ambientes hospitalares e veterinários, abrangendo as instituições listadas em cada núcleo.

4.1. AMOSTRAS DE AVES E SUÍNOS

Para a coleta de amostras dos suínos, foram utilizadas luvas de couro e cachimbo de corda para a contenção dos animais, buscando ajustar a posição mais tranquila do animal para a coleta. Nos animais das fases de maternidade e creche, foi utilizada a contenção física manual. Com o animal devidamente contido por um auxiliar, o swab estéril foi introduzido cuidadosamente na cavidade retal do suíno. Para as aves, durante a coleta, um membro da equipe utilizou luvas para segurar e conter a ave de maneira tranquila, visando minimizar o estresse e os riscos durante o procedimento. Enquanto isso, um segundo membro realizou a coleta, efetuando movimentos circulares delicados com um swab estéril no orifício da cloaca. Em ambos os casos, a haste do swab foi removida após a coleta e a porção que entrou em contato com o reto e cloaca dos animais foi armazenada em microtubos preenchidos com solução salina a 0,9% (Figura 5).



Figura 5. Origem das amostras ambientais (aves). **A-B** Região DA CLOACA. **C** Bebedouro pendular. **D** Galinheiro.

4.2 AMOSTRAS DE SUPERFÍCIES HOSPITALARES

Para as amostras provenientes do ambiente hospitalar, maçanetas, mouses, teclados, bancadas, alças de torneira, telefones, dispositivos médicos e superfícies de objetos rotineiramente manuseados foram selecionados como pontos de coleta (Figura 6). Durante o processo, cada swab foi comprimido contra as paredes do frasco de diluente para remover o excesso de líquido e friccionado com pressão, em movimento diagonal e em zigue-zague, sobre a superfície teste. Este procedimento foi mantido continuamente sobre a área selecionada por aproximadamente um minuto. Após a fricção, a haste do swab foi removida e

a extremidade usada foi mergulhada em um microtubo contendo solução salina a 0,9%. Um total de 50 amostras foram coletadas.



Figura 6. Pontos de coleta em ambiente hospitalar (Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados). **A** Torneira. **B** Bomba de Infusão. **C** Bancada. **D** Dispositivo digital para retirada de medicamentos.

4.3 AMOSTRAS DE PACIENTES

Amostras de pacientes incluem aquelas coletadas durante a internação para fins diagnósticos, como de sangue, urina, pele, amostras respiratórias e do sistema nervoso central.

4.4 MANUSEIO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os *microtubos* contendo as amostras, devidamente identificados durante o procedimento conforme a origem da coleta, foram mantidos refrigerados em um recipiente isotérmico acompanhado de gelo, acondicionado dentro de sacos plásticos. Posteriormente, todo o conteúdo dos *microtubos* foi transferido, em ambiente estéril, para tubos Falcon contendo meio caldo Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com antimicrobiano (cloranfenicol) e, então, armazenados em uma incubadora shaker a 37°C por 72 horas.

4.4.1 ISOLAMENTO DE COLÔNIAS

Após 72 horas, período no qual o meio de cultivo nos tubos apresentava turbidez devido ao crescimento fúngico, o líquido foi suspenso e espalhado, com o auxílio da Alça de Drigalski, sobre placas de Petri contendo meio sólido Chromagar *Candida*. As placas com a suspensão fúngica foram então armazenadas em estufa a 37°C por 24 horas.

Após esse período, observou-se a formação de uma camada de células na superfície das placas. Chromagar *Candida* é um meio de cultura seletivo que, devido à inclusão de substratos cromogênicos, permite a detecção qualitativa direta, a diferenciação e a identificação presuntiva de espécies de *Candida* que produzem cores distintas, facilitando a detecção direta dessas espécies de leveduras na placa de isolamento (Figura 7). A partir da discriminação de cores e características morfológicas, procedeu-se ao isolamento de colônias presentes através da técnica de Semeadura por Esgotamento: utilizando uma alça de repicagem, a extremidade de colônias individualizadas foi tocada, aderindo parte de seu conteúdo à extremidade da alça, que foi então transferida para uma nova placa, sendo estriada pela metade desta com movimento de zig-zag. Após esse processo, a placa foi girada 90° e estriada até metade da superfície restante ($\frac{1}{4}$ da placa total), e por fim, a placa foi girada mais uma vez em 90°, tendo o último quarto estriado. Esse procedimento é realizado para assegurar a máxima separação das colônias.

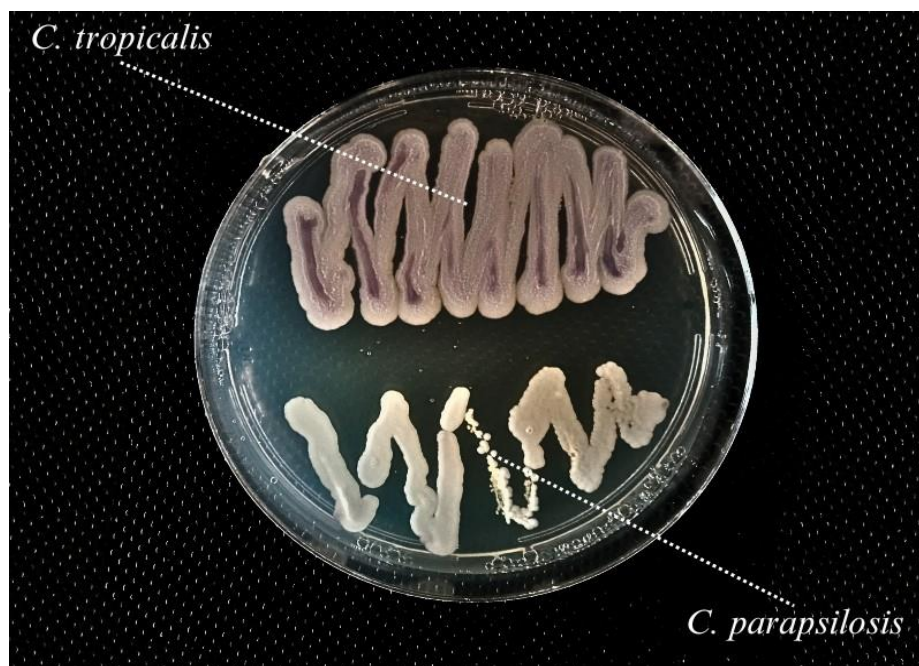


Figura 7. Comparação de coloração de *C. tropicalis* (lilás) e *C. parapsilosis* (branco) em placa de Chromagar *Candida*. Autoria própria.

4.4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Após a obtenção de colônias puras, uma amostra de cada uma foi preparada para ser enviada para identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS).

4.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE

A susceptibilidade foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) para o antifúngico fluconazol utilizando a metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (M27-A3, 2017). A partir dos dados de CIM, foi possível classificar os isolados em sensíveis, sensíveis dose-dependentes e resistentes ao fluconazol, bem como em alto ou baixo CIM para o tebuconazol.

4.5.1 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO E PLACAS DE TESTE

Inicialmente, as substâncias em pó foram pesadas em uma balança analítica. As soluções padrão estoque foram preparadas de acordo com a solubilidade de cada

substância e, em seguida, armazenadas conforme as orientações do CLSI (2017) ou do fabricante.

Os testes de sensibilidade foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços com fundo chato, utilizando o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) como diluente. A partir de uma solução inicial contendo o dobro da concentração máxima prevista para o teste, foram realizadas diluições seriadas em base 2 para obter diferentes concentrações das drogas a serem testadas. Alíquotas de 100 µL de cada concentração foram então distribuídas nos poços das placas de microdiluição.

4.5.2 PREPARO DOS INÓCULOS

As amostras fúngicas foram cultivadas em meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubadas por 24 horas a 37°C. Após a incubação, as colônias foram suspensas em solução salina estéril. A seguir, os inóculos foram ajustados usando um espectrofotômetro (530 nm) para alcançar uma transmitância de 75-77%, correspondente a 1×10^6 a 5×10^6 UFC/mL. Foram realizadas diluições de 1:100 e subsequentemente de 1:20 do inóculo inicial em RPMI-1640, para obter uma suspensão final de 1×10^3 UFC/mL. Alíquotas de 100 µL dessa suspensão foram distribuídas em cada poço da placa de microdiluição, com todo o teste sendo realizado em duplicata (CLSI, 2017). Finalmente, as placas foram incubadas a 30°C e 37°C por 24 horas, para posterior leitura e análise.

A realização dos testes em duas temperaturas teve como objetivo observar a resposta dos isolados a diferentes condições ambientais: Os testes performados à 30°C buscaram simular as condições ambientais onde essas espécies são encontradas, como no solo, em plantas, frutos e superfícies de objetos, enquanto que os testes realizados à 37°C foram avaliados sob uma perspectiva clínica, pois visavam replicar as condições enfrentadas pelos isolados quando presentes em um hospedeiro humano.

4.5.3 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS

A leitura das placas foi realizada visualmente, comparando-se a quantidade de crescimento nos poços que continham as drogas com o poço de controle de crescimento (controle positivo). Neste contexto, a CIM foi determinada como a menor concentração do

composto testado que inibiu 100% e 50% do crescimento do microrganismo, respectivamente, tanto para o fluconazol quanto para o tebuconazol (CLSI, 2017).

4.6 ANÁLISE E REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Após a conclusão dos testes de suscetibilidade para os isolados, os dados foram analisados e representados graficamente utilizando o software GraphPad Prism, versão 9.00 para Windows. Na avaliação dos resultados, foram consideradas a CIM ou MIC50, que corresponde à concentração do fármaco onde houve inibição de 50% do crescimento fúngico. Este parâmetro é utilizado para avaliar a relevância clínica de um fármaco e auxiliar na definição das concentrações terapêuticas do antifúngico testado. Também foi analisado o CIM ou MIC90, que representa a menor concentração do fármaco necessária para inibir o crescimento de 90% das cepas testadas de um determinado microrganismo. Este é um parâmetro importante para avaliar a efetividade do fármaco em uma ampla variedade de cepas e, assim como o MIC50, determinar as melhores doses terapêuticas para tratamento.

De acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (M27-A3, 2017), tanto isolados de *C. parapsilosis* quanto de *C. tropicalis* são considerados suscetíveis, para fluconazol, quando sua CIM é igual ou inferior a 2 µg/mL, dose-dependentes quando a CIM é de 4 µg/mL, e resistentes caso a concentração mínima do fármaco para inibição do crescimento do microrganismo seja igual ou superior a 8 µg/mL. Não é estabelecido uma classificação de diferentes perfis de resistência quanto à tebuconazol, entretanto a mesma métrica foi atribuída na avaliação da sensibilidade dos isolados devido a ausência de parâmetros específicos para agroquímicos e similaridade de mecanismos de ação.

5. RESULTADOS

A seguir, apresentamos os resultados obtidos ao longo deste estudo, os quais fornecem uma análise sobre a resistência cruzada a azóis em *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Os dados foram coletados e analisados a partir de amostras provenientes de pacientes humanos, suínos, aves e ambientes hospitalares e veterinários em diferentes regiões do Brasil. Destacamos aqui as principais descobertas, incluindo a distribuição dos isolados, as CIMs para fluconazol e tebuconazol, e a ocorrência de cepas multirresistentes. Esses resultados são fundamentais para compreender os padrões de resistência e suas implicações clínicas, epidemiológicas e para a saúde pública.

5.1 Distribuição dos Isolados coletados e testados

No total, foram coletados, identificados e testados 99 isolados, sendo 27 de *C. parapsilosis* e 72 de *C. tropicalis* (Figura 8).

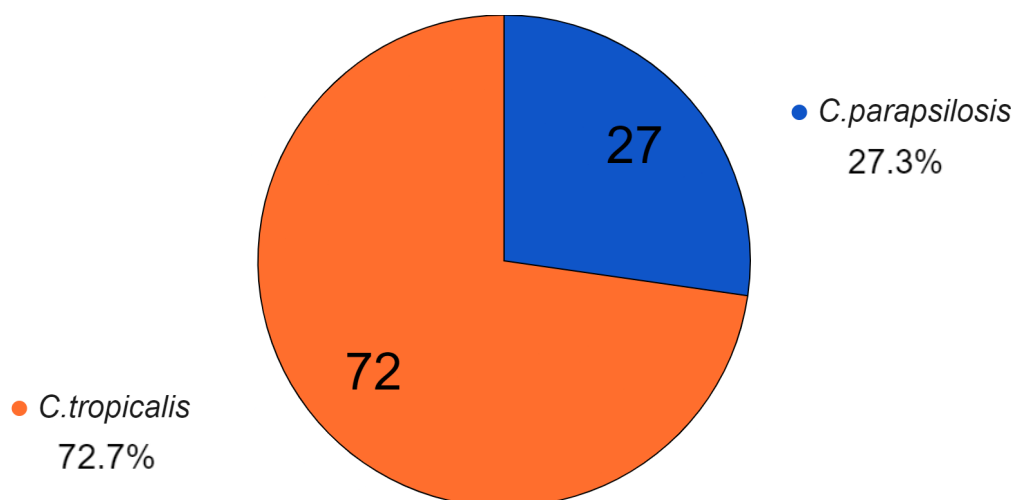


Figura 8. Número e proporção de isolados coletados de cada espécie.

Das 27 amostras de *C. parapsilosis*, 15 foram obtidas na Universidade Federal da Grande Dourados, 9 na Universidade Federal do Rio Grande do Norte e três na Universidade do Ceará (Figura 9). Quanto às amostras de *C. tropicalis*, um total de 72 amostras foram coletadas, sendo 23 provenientes da Universidade Federal da Grande Dourados, 28 da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 14 da Universidade do Ceará e 7 da Universidade Federal de Minas Gerais (Figura 9).

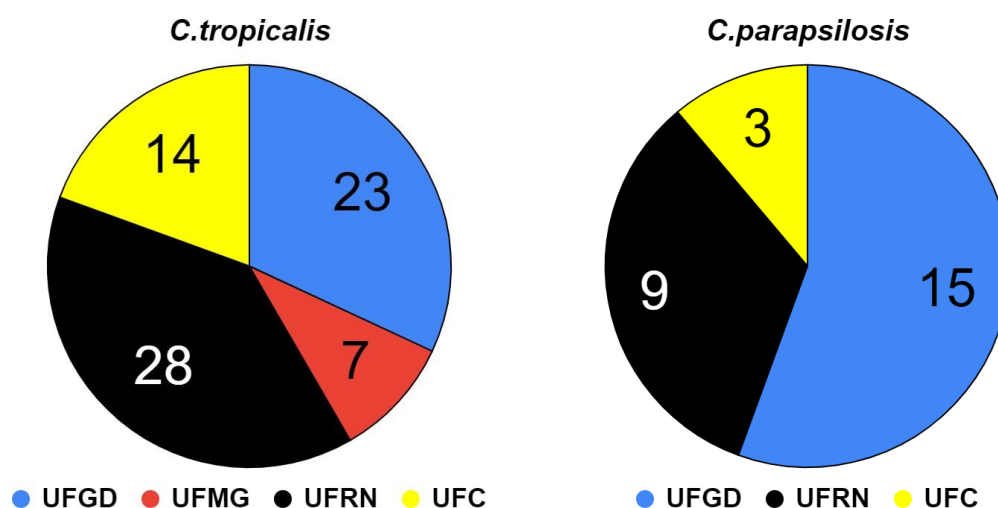


Figura 9. Distribuição do número e proporção de isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* coletados por cada universidade.

5.2 CIMs DE *C. PARAPSILOSIS* À 30° E 37°C

Nos ensaios conduzidos a 30°C com fluconazol e tebuconazol em isolados de *C. parapsilosis*, não foi constatada CIMs elevados em nenhum dos isolados testados. Entretanto, observou-se que duas cepas apresentaram resposta dose-dependente: a cepa 35/22 (UFGD), uma amostra clínica tratada com fluconazol, que exibiu uma CIM de 4 µg/mL (Figura 10A); e a cepa CA 106, proveniente do Núcleo Nordeste (UFRN), testada com tebuconazol, também apresentou resultados similares (Figura 10B).

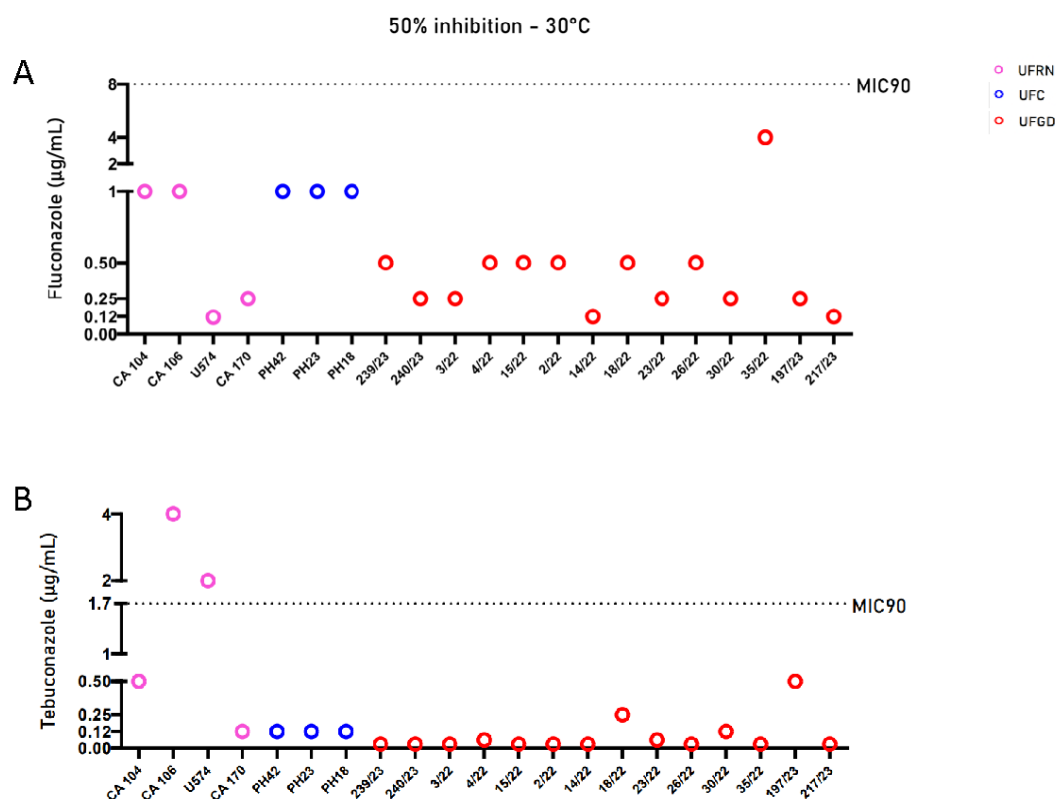


Figura 10. Concentrações mínimas de fármaco para inibição de 50% no crescimento de *C. parapsilosis* a 30°C. **A** CIMs para Fluconazol. **B** CIMs para Tebuconazol. O MIC90 refere-se à concentração mínima na qual houve inibição do crescimento de 90% dos isolados.

Nos ensaios realizados a 37°C, as amostras CA109 e CA117, ambas de origem ambiental hospitalar, exibiram suscetibilidade dose-dependente ao fluconazol, com uma CIM de 4 µg/mL (Figura 11A). A cepa CA106, tanto a 30°C quanto a 37°C, apresentou resistência dose-dependente a tebuconazol, com CIM de 4 µg/mL (Figuras 10B e 11B). Adicionalmente, uma cepa do Núcleo Nordeste, identificada como U574 (amostra clínica), mostrou resistência a tebuconazol com uma CIM de 64 µg/mL para este agroquímico (Figura 11B).

Entre os isolados de *C. parapsilosis* testados, nenhum demonstrou resistência simultânea aos dois azólicos; foi observada resistência em um único isolado sob condições experimentais específicas.

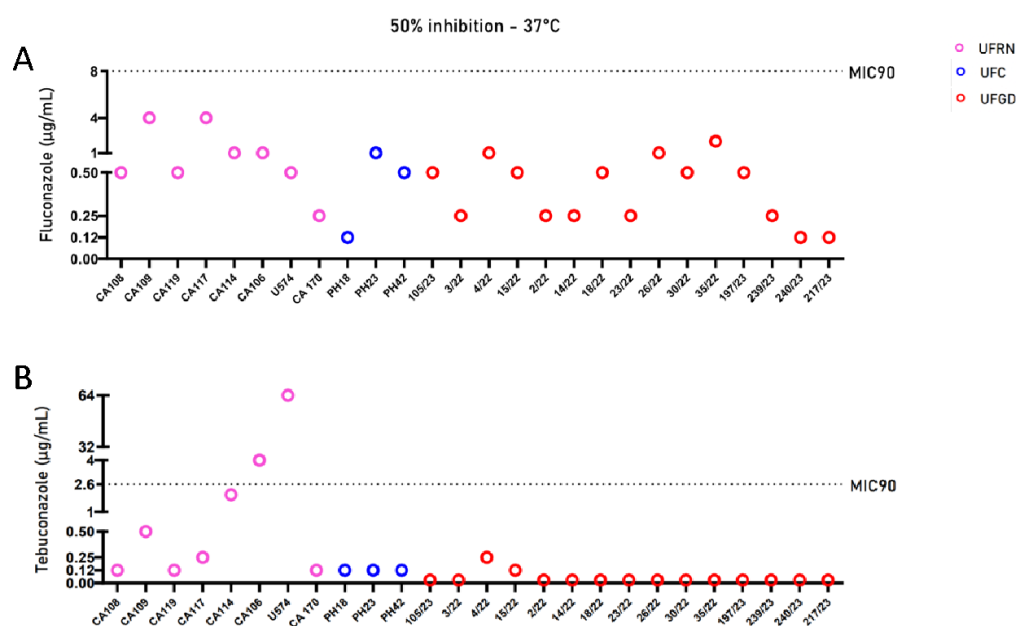


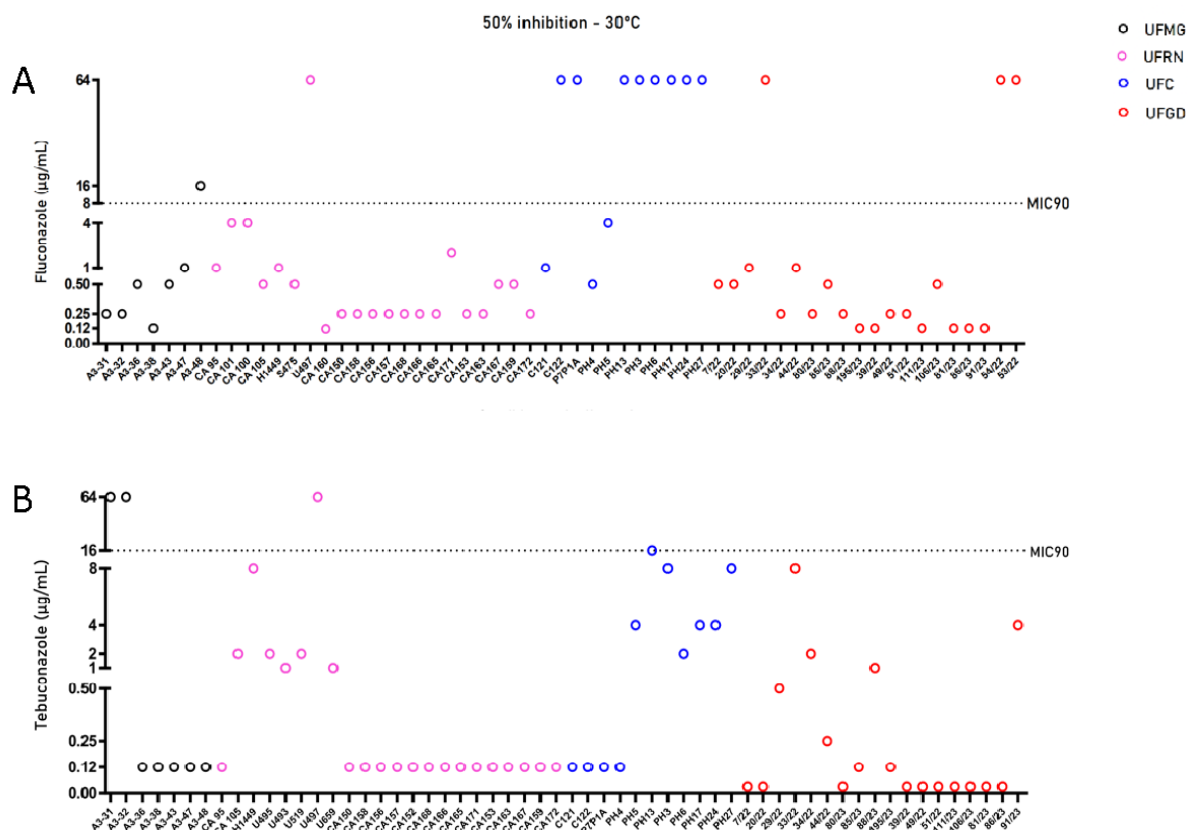
Figura 11. Concentrações mínimas de fármaco para inibição de 50% no crescimento de *C. parapsilosis* a 37°C. **A** CIMs para Fluconazol. **B** CIMs para Tebuconazol. O MIC90 refere-se à concentração mínima na qual houve inibição do crescimento de 90% dos isolados.

5.3 CIMs DE *C. TROPICALIS* À 30° E 37°

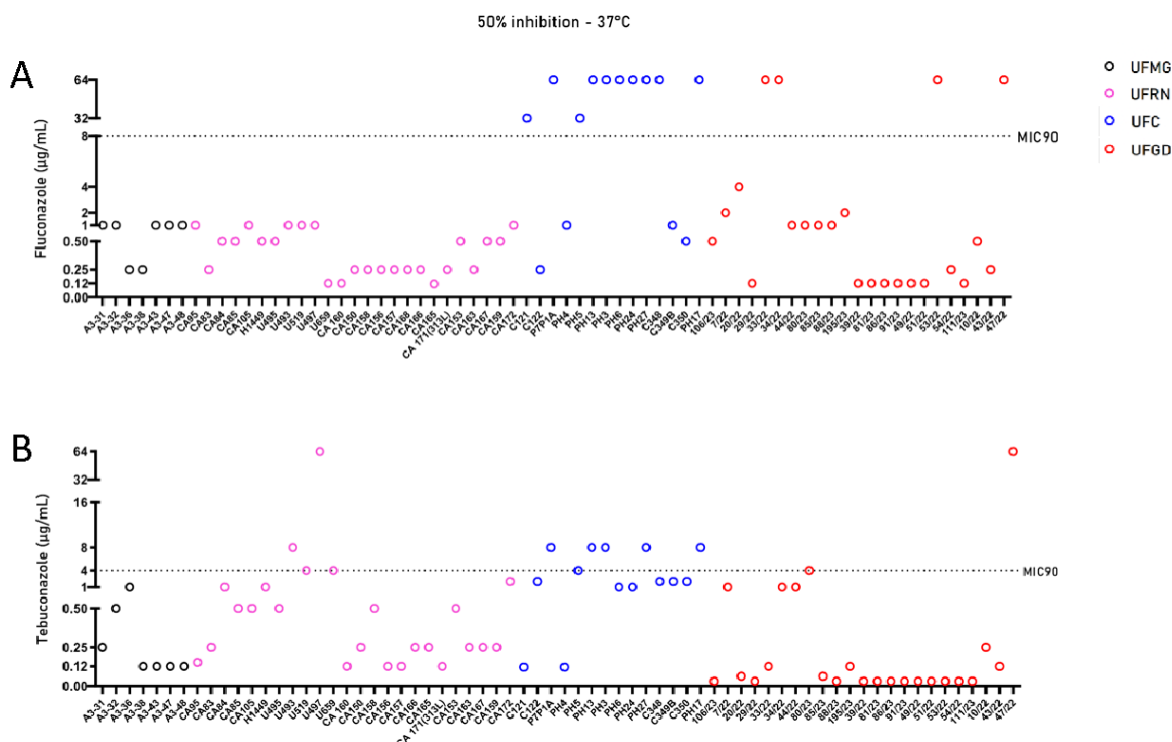
Nos ensaios realizados a 30°C com fluconazol em isolados de *C. tropicalis*, observou-se uma maior ocorrência de isolados resistentes. No Núcleo Sudeste, o isolado de origem suína A3-48, coletado pela UFMG, apresentou uma CIM para inibir 50% das células (MIC50) de 16 µg/mL, sendo o único classificado como resistente dentre os coletados na região. No Núcleo Nordeste, os isolados CA100 e CA101, ambos de pacientes e coletados pela UFRN, exibiram resistência dose-dependente. O isolado U497, também de paciente, foi caracterizado como resistente com uma CIM de 64 µg/mL. Na UFC, foram identificados oito isolados resistentes, incluindo as cepas suínas C122 e P7P1A com CIM de 64 µg/mL, além das cepas PH13, PH3, PH6, PH17, PH24 e PH27, todas de amostras clínicas e com resistência elevada (64 µg/mL). No Núcleo Centro-Oeste, as cepas 33/22, 53/22 e 54/22, de pacientes, mostraram alta resistência com uma MIC50 de 64 µg/mL (Figura 12A).

Para tebuconazol, testado a 30°C, no Núcleo Sudeste as cepas suínas A3-31 e A3-32 apresentaram uma CIM de 64 µg/mL. No Núcleo Nordeste, oito cepas não sensíveis foram identificadas, todas de pacientes: na UFRN, as cepas H1449 e U497 com CIMs de 8 µg/mL e 64 µg/mL, respectivamente, e na UFC, três cepas mostraram resistência

dose-dependente (PH5, PH17 e PH24), enquanto PH13, PH3 e PH27 apresentaram elevadas CIMs de 16 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$ e 8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. No Núcleo Centro-Oeste, o isolado 33/22 mostrou resistência ao agroquímico com uma CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$, enquanto 91/23 foi caracterizado como dose-dependente (Figura 12B).



azol clínico, enquanto PH5 foi caracterizado como resistente dose-dependente ao azol agroquímico. No Núcleo Centro-Oeste, os isolados 47/22 e 80/23, ambos coletados de pacientes, foram classificados respectivamente como resistentes (64 µg/mL) e com resistência dose-dependente (4 µg/mL) (Figura 13B).



Como pode ser constatado, dentre os 72 isolados coletados de *C. parapsilosis*, oito apresentaram perfil multirresistente, o que representa uma incidência de 11,11% de cepas multirresistentes da espécie no presente estudo. A resistência tanto a um azól clínico quanto a um agroquímico por essas cepas indica o desenvolvimento de mecanismos de resistência cruzada.

6. DISCUSSÃO

De acordo com Hof (2001), existem três formas principais pelas quais um paciente pode se contaminar por fungos resistentes: (1) inicialmente, a cepa infectante é sensível ao antifúngico, mas à medida que sofre mutações, desenvolve resistência; (2) o indivíduo pode abrigar uma população heterogênea da cepa infectante, o que faz com que a cepa resistente seja selecionada durante o tratamento antifúngico ao longo do tempo; ou (3) o indivíduo pode adquirir cepas resistentes do ambiente externo. A terceira via corresponde a uma problemática cada vez mais frequente e com implicações perigosas, uma vez que a população mundial segue em crescimento, sujeitando-a cada vez mais à agricultura, que se tornou uma origem comum para a proliferação de patógenos que representam grande ameaça à saúde humana.

A agricultura moderna tem sido cada vez mais dependente da aplicação de fungicidas para mitigar as perdas de culturas relacionadas a fungos e garantir alimentos suficientes e de alta qualidade. Inibidores da biossíntese de esteroides têm sido a classe predominante de fungicidas no controle de doenças fúngicas e na garantia de rendimento por muitas décadas (Jørgensen & Lise Nistrup, 2021a). Dentro deste grupo, inibidores de 14 α -demetilase mostraram-se particularmente eficazes contra uma ampla gama de patógenos fúngicos. No entanto, com o crescimento da resistência fúngica decorrente do uso extensivo destes mesmos agroquímicos, enfrentamos uma problemática multifacetada que abrange desafios clínicos, econômicos e sociais significativos (Jørgensen & Lise Nistrup, 2021b). A resistência fúngica é um fenômeno complexo, e a seleção de cepas fúngicas resistentes a azóis, classe de antifúngicos de primeira linha no combate a espécies do gênero *Candida*, é um indicador preocupante de um problema que carece de atenção adequada em âmbito global e nacional.

Considerando o aspecto geoepidemiológico deste trabalho, nota-se uma maior incidência de isolados resistentes no Núcleo Nordeste, com destaque para isolados da Universidade Federal do Ceará: para fluconazol, mais da metade dos isolados de *C. tropicalis* da UFC apresentaram resistência em ambas as temperaturas; houve uma alternância entre os perfis de suscetibilidade dos isolados suínos, com as cepas C121 e C122 apresentando CIMs elevadas em temperaturas distintas, enquanto que dentre as cepas clínicas do estado, exceto PH4 e PH5, todas apresentaram perfil de resistência para o fármaco nas duas temperaturas. Ainda considerando essas mesmas cepas clínicas, quatro delas (PH3, PH13, PH17 e PH27) também apresentaram elevadas CIMs para tebuconazol, o que abre uma discussão sobre a origem dessa resistência, tornando possível o cenário em que esses isolados, apresentando

mutações de resistência, tenham sido selecionados no ambiente devido à exposição a agroquímicos azólicos, tendo posteriormente se proliferado e infectado hospedeiros humanos. Essa presença de cepas multirresistentes levanta preocupações sobre os mecanismos genéticos subjacentes e a possível transferência horizontal de genes de resistência nesse processo.

Para tebuconazol, houve uma menor incidência de isolados resistentes comparando-se com fluconazol, novamente com a maioria deles se concentrando no Núcleo Nordeste, especialmente isolados da UFC. Também deve ser observada a mudança no perfil de suscetibilidade de acordo com a temperatura, havendo uma maior incidência de CIM $\geq 8\mu\text{g/mL}$ dentre os isolados da UFC em testes realizados a 37°C, enquanto que com os isolados A3-31 e A3-32, ambos da UFMG, CIMs extremamente elevados foram observados em testes conduzidos a 30°C, o que não se repetiu a 37°C. Esses resultados podem indicar mutações genéticas do microrganismo relacionadas à sua capacidade de induzir resistência em resposta à temperatura, sendo esta uma característica já observada em espécies de *Cryptococcus* (Bastos et al., 2019).

Quanto aos resultados dos testes com *C. parapsilosis*, é de se notar que para o agroquímico testado, somente no Núcleo Nordeste, mais especificamente na região do Rio Grande do Norte, foram observados isolados com perfil não sensível (CIM $\geq 4\mu\text{g/mL}$), o que levanta questões importantes sobre a possível origem e disseminação dessa resistência na região: existe alguma diferença na aplicação de protocolos de controle para fitopatógenos na região que estariam gerando uma pressão seletiva para agroquímicos azólicos. Ou talvez, de que forma as características ambientais do estado estariam influenciando no desenvolvimento de mecanismos de resistência a agroquímicos azólicos.

Essa maior incidência de perfis não sensíveis também se refletiu, em menor medida, para testes realizados com fluconazol, principalmente considerando que o número de isolados do Rio Grande do Norte correspondia a pouco mais da metade dos isolados do Mato Grosso do Sul, mas apresentaram o dobro de isolados com perfil de suscetibilidade dose-dependente. Outra questão a ser debatida a partir desses dados é como as práticas de controle de infecção nos hospitais do Núcleo Nordeste estariam influenciando esse índice, visto que todas as cepas de *C. parapsilosis* fora do perfil suscetível são clínicas ou ambientais hospitalares; fatores como a higienização das mãos, o uso de EPIs, a limpeza e desinfecção dos ambientes hospitalares e a gestão de antimicrobianos podem estar influenciando a disseminação de microrganismos resistentes.

Dentro do gênero *Candida*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* se destacam como espécies não-*albicans* de maior relevância clínica e epidemiológica. Ambas são frequentemente

classificadas como o segundo e terceiros agentes etiológicos mais comuns de candidemia, alternando-se nessas posições de frequência conforme a região geográfica e a faixa etária dos pacientes (Zuza-Alves et al., 2017b; Daneshnia et al., 2023c). *C. tropicalis*, além da sua presença no organismo de diversos animais, também é prevalente em solos enriquecidos organicamente e em ambientes aquáticos (Vogel et al., 2007). Apresenta como fatores de virulência a forte produção de biofilme, a mais eficiente dentre os isolados sanguíneos de espécies não-*albicans* (Pannanusorn et al., 2013), extrema aderência a células epiteliais e endoteliais (Marcos-Zambrano et al., 2014) e a capacidade de formação de hifas verdadeiras e pseudohifas. *C. parapsilosis*, por sua vez, é um tipo de fungo comumente encontrado na pele, mucosas e trato gastrointestinal, além de uma variedade de locais no ambiente externo, seja no ar ou em superfícies (Sabino et al., 2011). A espécie apresenta uma alta capacidade de proliferação, especialmente em ambientes hospitalares. Os surtos causados pela espécie, cada vez mais frequentes desde 2018, são causados principalmente por soluções intravenosas contaminadas ou pela transmissão horizontal do ambiente para as mãos dos profissionais de saúde e, em seguida, para os pacientes (Qi et al., 2018).

Embora o desenvolvimento de resistência seja um processo intrincado que demanda tempo para se concretizar, dados extensivos revelaram que os azóis exercem uma forte pressão seletiva sobre a população fúngica na seleção de cepas resistentes. De acordo com dados do Programa de Vigilância Antifúngica SENTRY, a resistência de *C. tropicalis* ao fluconazol varia de 2,5% a 4,9% em todo o mundo, com taxas mais altas relatadas na região Ásia-Pacífico (9,2%), enquanto a ocorrência de isolados resistentes de *C. parapsilosis* se deu com maior frequência no continente europeu (4,9%) (Pfaller et al., 2019). Considerando a relação entre o uso de azóis clínicos e agroquímicos na resistência fúngica, essas regiões, de modo não surpreendente, também lideram o consumo de fungicidas azólicos no mundo, adquirindo 71% de todo o volume global de azóis utilizados na agricultura (Jørgensen & Lise Nistrup, 2021c). Similarmente aos dados do SENTRY, os resultados deste estudo atual corroboram a expectativa de maior incidência de perfis de resistência em *C. tropicalis*, já relatada em estudos anteriores, como o de Pfaller et al. (2010b), que confirmaram uma maior tendência ao desenvolvimento dessa característica quando comparada a outras espécies de *Candida*.

Além dos crescentes registros de infecção, a resistência em *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* tem ganhado cada vez mais relevância, uma vez que cepas resistentes dessas espécies têm sido implicadas em infecções persistentes ou recorrentes (Álvarez-Pérez et al., 2016b; Shin et al., 2001), assim como em infecções avançadas (Chong et al., 2012b; Kabbara

et al., 2008). As infecções causadas por ambas as espécies ocorrem principalmente em pacientes internados em unidades de terapia intensiva e em populações específicas, como neonatos, indivíduos transplantados, pacientes HIV positivo, imunocomprometidos e pessoas com COVID-19 (Pienthong et al., 2023).

Embora os patógenos resistentes a medicamentos geralmente apresentem mutações em genes envolvidos em processos celulares essenciais, isolados resistentes nem sempre incorrem em um custo de adaptação. Em outras palavras, as transformações fisio-metabólicas decorrentes do desenvolvimento de mecanismos de resistência não comprometem necessariamente a capacidade de proliferação do fungo. Por vezes, isolados resistentes ao fluconazol podem ter uma aptidão similar ou até superior à de seus equivalentes suscetíveis (Daneshnia et al., 2023d).

Vandeputte et al. (2005) investigaram os mecanismos envolvidos na resistência aos azóis em uma cepa clínica de *C. tropicalis* (CIM para fluconazol >256 µg/mL) e relataram que a resistência estava associada à superexpressão e mutação do gene ERG11, gerando a substituição de tirosina por fenilalanina (Y132F) na enzima lanosterol 14α-demetilase, o que reduz a afinidade entre azóis e seu alvo. Cepas de *C. parapsilosis* portadoras da mutação ERG11Y132F, além da prevista resistência aos azóis já relatada em *C. tropicalis*, também apresentam taxas de mortalidade de seus hospedeiros significativamente mais altas do que as de indivíduos infectados por outras cepas (Choi et al., 2018; Arastehfar et al., 2020a; Arastehfar et al., 2021a). Também cabe mencionar que a maioria dos isolados de *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol são recuperados de pacientes não expostos a azóis (Arastehfar et al., 2020b; Arastehfar et al., 2021b). Essas observações sugerem que cepas resistentes ao fluconazol podem prosperar na ausência de exposição a azóis. Portanto, a restrição do uso de azóis pode não ser suficiente para minimizar a disseminação de cepas resistentes ao fluconazol em ambientes de saúde. Isso eleva a necessidade de compreensão do desenvolvimento dos mecanismos de resistência em fungos e a determinação da reversibilidade das mutações associadas a essa resistência, principalmente levando em conta que a resistência a uma variedade de antifúngicos depende de múltiplos fatores, como as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do composto, área de atividade e seu modo de ação no organismo (Kaur et al., 2021).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo identificou isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* com perfis de resistência tanto ao fluconazol (um azól de uso clínico) quanto ao tebuconazol (um defensivo agrícola), sendo ambas consideradas duas das espécies de *Candida* não-*albicans* mais frequentes em quadros de infecção fúngica pelo gênero. O tema abordado ganha relevância devido à ampla utilização desses agentes, considerados eficazes contra espécies de *Candida* e tidos como primeira linha de defesa contra tais agentes oportunistas.

A análise das amostras evidenciou que algumas cepas das espécies abordadas apresentaram resistência ao fluconazol, outras ao tebuconazol, e, no caso de algumas cepas de *C. tropicalis*, a ambas os antifúngicos, o que sugere resistência-cruzada, um dado preocupante visto ser um elemento comprometedor para eficácia dos tratamentos e opções terapêuticas disponíveis.

Os resultados deste estudo enfatizam a necessidade contínua de vigilância da resistência antifúngica, bem como a importância da pesquisa e do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos ou combinações terapêuticas que possam superar os mecanismos de resistência emergentes, garantindo assim melhores resultados clínicos para os pacientes.

REFERÊNCIAS

- ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. **British Journal of Haematology**, v. 166, n. 4, p. 471–484, 18 ago. 2014.
- CASTRO, I. et al. Comparação da atividade de antifúngicos imidazólicos e triazólicos frente a *Candida albicans* Activity comparison of imidazole and triazole antifungals against *Candida albicans*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 48. 216-238. out. 2016.
- ÁLVAREZ-PÉREZ, S. et al. Acquired multi-azole resistance in *Candida tropicalis* during persistent urinary tract infection in a dog. **Medical Mycology Case Reports**, v. 11, p. 9–12, mar. 2016.
- ARASTEHFAR, A. et al. Antifungal susceptibility, genotyping, resistance mechanism, and clinical profile of *Candida tropicalis* blood isolates. **Medical Mycology**, v. 58, n. 6, p. 766–773, 1 ago. 2020.
- ARORA, P. et al. Environmental Isolation of *Candida auris* from the Coastal Wetlands of Andaman Islands, India. **mBio**, v. 12, n. 2, 27 abr. 2021.
- AUTMIZGUINE, J. et al. Effect of fluconazole prophylaxis on *Candida fluconazole* susceptibility in premature infants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 12, p. 3482–3487, 1 dez. 2018.
- ARASTEHFAR, Amir; DANESHNIA, Farnaz; HILMIOĞLU-POLAT, Suleyha; *et al.* First Report of Candidemia Clonal Outbreak Caused by Emerging Fluconazole-Resistant *Candida parapsilosis* Isolates Harboring Y132F and/or Y132F+K143R in Turkey. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 10, 2020.
- ARASTEHFAR, Amir; HILMIOĞLU-POLAT, Suleyha; DANESHNIA, Farnaz; *et al.* Clonal Candidemia Outbreak by *Candida parapsilosis* Carrying Y132F in Turkey: Evolution of a Persisting Challenge. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021.
- BRANDT, M. E. *Candida* and Candidiasis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 8, p. 876a–8876, ago. 2002.
- BASTOS, R. W. et al. Environmental Triazole Induces Cross-Resistance to Clinical Drugs and Affects Morphophysiology and Virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 1, jan. 2018.
- BASTOS, R. W. et al. Fungicide effects on human fungal pathogens: Cross-resistance to medical drugs and beyond. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 12, p. e1010073, 9 dez. 2021.

- BASTOS, R. W. et al. From the environment to the host: How non-azole agrochemical exposure affects the antifungal susceptibility and virulence of *Cryptococcus gattii*. **Science of The Total Environment**, v. 681, p. 516–523, set. 2019.
- BEN-AMI, R.; KONTOYIANNIS, D. P. Resistance to Antifungal Drugs. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 279–311, jun. 2021.
- BENNETT, J. E.; IZUMIKAWA, K.; MARR, K. A. Mechanism of Increased Fluconazole Resistance in *Candida glabrata* during Prophylaxis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1773–1777, maio 2004.
- BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 312, 9 jun. 2020.
- BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 18 out. 2017.
- BRANCO, J.; MIRANDA, I. M.; RODRIGUES, A. G. *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 1, p. 80, 5 jan. 2023.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. Exposure of *Candida parapsilosis* complex to agricultural azoles: An overview of the role of environmental determinants for the development of resistance. **Science of The Total Environment**, v. 650, p. 1231–1238, fev. 2019.
- BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; LEVITZ, S. M. Tackling Human Fungal Infections. **Science**, v. 336, n. 6082, p. 647–647, 11 maio 2012.
- BOSCH, F. VAN DEN et al. Governing Principles Can Guide Fungicide-Resistance Management Tactics. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 175–195, 4 ago. 2014.
- CARNEIRO, H. C. S. et al. Hypervirulence and cross-resistance to a clinical antifungal are induced by an environmental fungicide in *Cryptococcus gattii*. **Science of The Total Environment**, v. 740, p. 140135, out. 2020.
- CASTELO-BRANCO, D. et al. Collateral consequences of agricultural fungicides on pathogenic yeasts: A One Health perspective to tackle azole resistance. **Mycoses**, v. 65, n. 3, p. 303–311, 3 mar. 2022.
- CHEN, P.-Y. et al. Clonality of Fluconazole-Nonsusceptible *Candida tropicalis* in Bloodstream Infections, Taiwan, 2011–2017. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 9, p. 1660–1667, set. 2019.

- CHEN, Y.-Z. et al. Fruits are vehicles of drug-resistant pathogenic *Candida tropicalis*. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 6, 12 dez. 2023.
- CHONG, Y. et al. Fatal candidemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematological malignancies. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 18, n. 5, p. 741–746, 2012.
- CHOWDHARY, A. et al. Clonal Expansion and Emergence of Environmental Multiple-Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains Carrying the TR34/L98H Mutations in the cyp51A Gene in India. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e52871, 28 dez. 2012.
- CHOWDHARY, A. et al. Multidrug-resistant endemic clonal strain of *Candida auris* in India. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 6, p. 919–926, 20 jun. 2014.
- CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_3, p. S436–S444, 15 ago. 2017.
- 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. D. A. et al. *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 145–152, 1 fev. 2015.
- CUI, N. et al. Tebuconazole induces triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* in liquid medium and soil. **Science of The Total Environment**, v. 648, p. 1237–1243, jan. 2019.
- CHOI, Yong Jun; KIM, Yae-Jean; YONG, Dongeun; et al. Fluconazole-Resistant *Candida parapsilosis* Bloodstream Isolates with Y132F Mutation in ERG11 Gene, South Korea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 9, p. 1768–1770, 2018.
- DANESHNIA, F. et al. Worldwide emergence of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*: current framework and future research roadmap. **The Lancet Microbe**, v. 4, n. 6, p. e470–e480, jun. 2023.
- DE OLIVEIRA, H. C. et al. Identification of four compounds from the Pharmakon library with antifungal activity against *Candida auris* and species of *Cryptococcus*. **Medical Mycology**, v. 60, n. 6, 30 jun. 2022.
- DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, jan. 2024.

DENNING, D. W.; BROMLEY, M. J. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1414–1416, 27 mar. 2015.

FAN, X. et al. Notable Increasing Trend in Azole Non-susceptible *Candida tropicalis* Causing Invasive Candidiasis in China (August 2009 to July 2014): Molecular Epidemiology and Clinical Azole Consumption. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 22 mar. 2017.

FISHER, M. C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186–194, 11 abr. 2012.

FISHER, M. C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 18 maio 2018.

FURLANETO, M. C. et al. Species distribution and in vitro fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 595–599, out. 2011.

FOLHA. *Candida*: Infecção têm alta taxa de mortalidade no Brasil. **Folha de S.Paulo**, 7 set. 2023. Disponível: <https://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2023/07/infeccoes-por-candida-ainda-tem-alt-a-taxa-de-mortalidade-no-brasil-apesar-de-avanco-terapeutico.shtml>

GOLDMAN, M. et al. Does Long-Term Itraconazole Prophylaxis Result in In Vitro Azole Resistance in Mucosal *Candida albicans* Isolates from Persons with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1585–1587, jun. 2000.

GOW, N. A. R. et al. The importance of antimicrobial resistance in medical mycology. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 5352, 12 set. 2022.

GUO, X. et al. Sterol Sponge Mechanism Is Conserved for Glycosylated Polyene Macrolides. **ACS Central Science**, v. 7, n. 5, p. 781–791, 26 maio 2021.

HOLLOMON, D. Does agricultural use of azole fungicides contribute to resistance in the human pathogen *Aspergillus fumigatus* ? **Pest Management Science**, v. 73, n. 10, p. 1987–1993, 24 out. 2017.

HOF, Herbert. Critical Annotations to the Use of Azole Antifungals for Plant Protection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 11, p. 2987–2990, 2001.

KABBARA, N.; LACROIX, C.; PEFFAULT DE LATOUR, R.; et al. Breakthrough *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* blood stream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving long-term caspofungin therapy. **Haematologica**, v. 93, n. 4, p. 639–640, 2008.

KAUR, Hardeep; YADAV, Anamika; WADHWA, Khushbu; *et al.* Azoles Used in Agriculture as Possible Cause of Azole-Resistance in Clinical *Candida* Isolates. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 17, n. 4, p. 789–799, 2021.

LIONAKIS, M. S.; NETEA, M. G. *Candida* and Host Determinants of Susceptibility to Invasive Candidiasis. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003079, 3 jan. 2013.

LORD, A. T. *et al.* Multidrug resistant yeasts in synanthropic wild birds. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 9, n. 1, p. 11, 23 dez. 2010.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 15 fev. 2013.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103–124, mar. 2016.

MELLADO, E. *et al.* A New *Aspergillus fumigatus* Resistance Mechanism Conferring In Vitro Cross-Resistance to Azole Antifungals Involves a Combination of cyp51A Alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 1897–1904, jun. 2007.

MOTOA, G. *et al.* Epidemiology of *Candida* isolates from Intensive Care Units in Colombia from 2010 to 2013. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 1, p. 17–22, jan. 2017.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 51–83, mar. 2016.

NEUFELD, P. M. *et al.* Nosocomial candidiasis in Rio de Janeiro State: Distribution and fluconazole susceptibility profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 477–484, jun. 2015.

OLIVEIRA, J. S. DE *et al.* The yeast, the antifungal, and the wardrobe: a journey into antifungal resistance mechanisms of *Candida tropicalis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 377–388, jun. 2020.

OPULENTE, D. A. *et al.* Pathogenic budding yeasts isolated outside of clinical settings. **FEMS Yeast Research**, v. 19, n. 3, 1 maio 2019.

PAPPAS, P. G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18026, 11 maio 2018.

PANNANUSORN, Srisuda; FERNANDEZ, Victor; RÖMLING, Ute. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 264–272, 2012.

JØRGENSEN, Lise Nistrup; HEICK, Thies Marten. Azole Use in Agriculture, Horticulture, and Wood Preservation – Is It Indispensable? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021.

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, 12 set. 2017.

PFALLER, M. A. et al. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 180–195, dez. 2010.

PFALLER, M. A. et al. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Posaconazole and Voriconazole and *Candida* spp. as Determined by 24-Hour CLSI Broth Microdilution. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 630–637, fev. 2011.

PFALLER, M. A. et al. 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. 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 11–23, 2004a.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4419–4431, out. 2004b.

PFALLER, Michael A; DIEKEMA, Daniel J; TURNIDGE, John D; *et al.* Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997–2016. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Supplement_1, p. S79–S94, 2019.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; *et al.* Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1366–1377, 2010b.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, jul. 2019.

PIENTHONG, Thanus; VISUTTICHAIKIT, Suttichai; APISARNTHANARAK, Piyaporn; *et al.* Increase in the incidence of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* bloodstream infections during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. **Antimicrobial Stewardship & Healthcare Epidemiology**, v. 3, n. 1, 2023.

PRICE, C. L. et al. Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. **Pest Management Science**, v. 71, n. 8, p. 1054–1058, 20 maio 2015.

QI, L.; FAN, W.; XIA, X.; *et al.* Nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* sensu stricto fungaemia in a neonatal intensive care unit in China. **Journal of Hospital Infection**, v. 100, n. 4, p. e246–e252, 2018.

RAJASINGHAM, R. *et al.* The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, p. 1748–1755, dez. 2022.

RHOUMA, M. *et al.* Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 11 nov. 2016.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P. E; ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1360–1362, jul. 2014.

ROCHA, M. F. G. *et al.* Cross-resistance to fluconazole induced by exposure to the agricultural azole tetraconazole: an environmental resistance school? **Mycoses**, v. 59, n. 5, p. 281–290, 11 maio 2016.

RUSSELL, P. E. A century of fungicide evolution. **The Journal of Agricultural Science**, v. 143, n. 1, p. 11–25, fev. 2005.

SANTOS, E. R. DOS *et al.* Susceptibility of *Candida* spp. isolated from blood cultures as evaluated using the m27-a3 and new m27-s4 approved breakpoints. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 6, p. 477–482, dez. 2014.

SHAN, Y. *et al.* Prevalence of *Candida albicans*-closely related yeasts, *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 52, n. 6, p. 636–640, 1 ago. 2014.

SIDRIM, J. J. C. *et al.* Azole-Resilient Biofilms and Non-wild Type *C. albicans* Among *Candida* Species Isolated from Agricultural Soils Cultivated with Azole Fungicides: an Environmental Issue? **Microbial Ecology**, v. 82, n. 4, p. 1080–1083, 16 nov. 2021.

SINGULANI, J. L. *et al.* The impact of COVID-19 on antimicrobial prescription and drug resistance in fungi and bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1925–1935, 10 dez. 2022.

SNELDERS, E. *et al.* Emergence of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* and Spread of a Single Resistance Mechanism. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 11, p. e219, 11 nov. 2008.

SNELDERS, E. *et al.* Possible Environmental Origin of Resistance of *Aspergillus fumigatus* to Medical Triazoles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4053–4057, 15 jun. 2009.

SNELDERS, E. et al. Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e31801, 1 mar. 2012.

SUBRAMANYA, S. H. et al. Diversity, in-vitro virulence traits and antifungal susceptibility pattern of gastrointestinal yeast flora of healthy poultry, *Gallus gallus domesticus*. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 113, 15 dez. 2017.

SHIN, Jong Hee; SHIN, Dong Hyeon; SONG, Jeong Won; *et al.* Electrophoretic Karyotype Analysis of Sequential *Candida parapsilosis* Isolates from Patients with Persistent or Recurrent Fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1258–1263, 2001.

SABINO, Raquel; SAMPAIO, Paula; CARNEIRO, Catarina; *et al.* Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, 2011.

THEILL, L. et al. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n. 1, p. 43–49, jan. 2016.

THOMAZ, D. Y. et al. An Azole-Resistant *Candida parapsilosis* Outbreak: Clonal Persistence in the Intensive Care Unit of a Brazilian Teaching Hospital. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 5 dez. 2018.

THOMAZ, D. Y. et al. Environmental Clonal Spread of Azole-Resistant *Candida parapsilosis* with Erg11-Y132F Mutation Causing a Large Candidemia Outbreak in a Brazilian Cancer Referral Center. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 259, 30 mar. 2021.

TURNER, S. A.; BUTLER, G. The *Candida* Pathogenic Species Complex. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 9, p. a019778–a019778, 1 set. 2014.

ULU KILIC, A. et al. Epidemiology and cost implications of candidemia, a 6-year analysis from a developing country. **Mycoses**, v. 60, n. 3, p. 198–203, 9 mar. 2017.

VAN DER LINDEN, J. W. M. et al. Clinical Implications of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands, 2007–2009. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1846–1854, out. 2011.

VOGEL, C. et al. Prevalence of yeasts in beach sand at three bathing beaches in South Florida. **Water Research**, v. 41, n. 9, p. 1915–1920, maio 2007.

VANDEPUTTE, Patrick; LARCHER, Gérald; BERGÈS, Thierry; *et al.* Mechanisms of Azole Resistance in a Clinical Isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4608–4615, 2005.

- WANG, Y. et al. Antibiotic resistance gene reservoir in live poultry markets. **Journal of Infection**, v. 78, n. 6, p. 445–453, jun. 2019.
- WINGARD, J. R. et al. Increase in *Candida krusei* Infection among Patients with Bone Marrow Transplantation and Neutropenia Treated Prophylactically with Fluconazole. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 18, p. 1274–1277, 31 out. 1991.
- XIAO, M. et al. 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. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 3, p. 802–810, mar. 2015.
- YANG, Y.-L. et al. Comparison of Human and Soil *Candida tropicalis* Isolates with Reduced Susceptibility to Fluconazole. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34609, 5 abr. 2012a.
- YANG, Y.-L. et al. Comparison of Human and Soil *Candida tropicalis* Isolates with Reduced Susceptibility to Fluconazole. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34609, 5 abr. 2012b.
- ZUZA-ALVES, D. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 13 out. 2017.