MARCELLO MIHAILENKO CHAVES MAGRI

Caracterização molecular e perfil de sensibilidade de *Candida tropicalis* isoladas em corrente sanguínea e cateter de pacientes internados em hospitais de ensino

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção de título
de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Maria Aparecida Shikanai Yasuda

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Magri, Marcello Mihailenko Chaves

Caracterização molecular e perfil de sensibilidade de *Candida tropicalis*
isoladas em corrente sanguínea de pacientes internados em hospitais de ensino /
Marcello Mihailenko Chaves Magri. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Maria Aparecida Shikanai Yasuda.

Descritores: 1.*Candida tropicalis* 2.Tipagem molecular 3.Farmacorresistência
fúngica 4.Fungemia 5.Tipagem de sequências multilocus

USP/FM/DBD-315/12

Dedico esta tese à minha família.

Aos meus pais, Eduardo e Ludmila pelos exemplos de sabedoria, dedicação e perseverança.

À minha esposa, Adriana, minha eterna companheira

Aos meus filhos, Pedro e Lucas pela alegria e amor incondicional que deram sentido a minha vida.

Aos meus irmãos, Sheila e Alexandre, pela amizade e apoio.

Às minhas sobrinhas, Christine e Camile pela alegria

AGRADECIMENTOS

À Profa. Maria Aparecida Shikanai Yasuda, pelo exemplo, orientação, incentivo, disponibilidade e oportunidade de trabalhar no LIM 48.

Aos Professores Titulares, Antonio Alci Barone e Marcos Boulos, pela confiança e oportunidade de crescimento profissional.

À Profa. Maria Irma Seixas Duarte, pela formação, carinho e exemplo que tornaram possível a conclusão desse trabalho.

À Profa. Sílvia Figueiredo Costa, pelo incentivo e colaboração do Laboratório de Investigação Médica em Bacteriologia.

Às amigas, Vera Lúcia Teixeira de Freitas e Michele Soares Gomes Gouvea pela confiança, apoio técnico e disponibilidade.

Aos amigos, Alexei Bender Haydu, Robson Eduardo Soares e Fernanda Aparecida Reis pelo apoio técnico e disponibilidade.

Aos colegas e amigos do LIM 48, Célia, Claudia, Constância, Erika, Sheila, Paula, Marcia Andréia, Marcia Yoshida, Aya, Carolina, Telma, Priscila, Ingrid, Marjorie, Flávia, Rafael, Izani e Karina, pelos conselhos, estímulo, vontade e comprometimento.

Aos funcionários do Laboratório de Micologia (LIM 53), em especial a Dra. Elizabeth H. Vaccari, pelo ensino, amizade e disponibilidade.

À Profa. Maria Luiza Moretti, pelo fornecimento dos isolados e acolhimento no seu laboratório e na UNICAMP.

Aos Professores, Sergio Russo Matioli pela formação em análise filogenética e Marcia de Souza Carvalho Melhem pela disponibilidade e contribuição, especialmente no perfil de sensibilidade.

Aos amigos, Ana Catharina de Seixas Santos Natri, Ho Yeh Li, Marcelo N. Litvoc, Karim Y. Ibrahim, Max Igor Banks F. Lopes, Olavo Henrique M. Leite e Sigrid De Souza Santos pelo trabalho em conjunto, exemplo profissional e apoio.

Ao Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek, pelo exemplo, dedicação e apoio quando trabalhamos juntos na Enfermaria.

À amiga Ester pela total compreensão, cobertura e apoio.

Às eternas amigas, Helenice, Luzia e Nair que, além de excelentes profissionais, são amigas e companheiras.

À equipe administrativa da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Villene, Rubia, Luiza, Henrique, Marina, Vanessa, Ângelo e Verônica.

À Diretoria do Ambulatório do Centro de Referência e Treinamento em DST/Aids, especialmente a secretária Ivonilda, a Dra. Gabriela Wagabi e a Dra. Milva Fonsi pela confiança.

À Chefia do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Dra. Marta Heloisa Lopes pelo apoio.

Ao Coordenador da pós-graduação, Prof. Aluisio Augusto Cotrim Segurado e às secretárias da pós-graduação, Roseli Antônia Santo e Vania Regina Miguel, por toda ajuda durante o curso.

À Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP pelo fornecimento dos isolados.

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização desse trabalho.

Este estudo foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do
Estado de São Paulo (FAPESP No. 06/61438-0)

Esta tese está de acordo com as normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A L Freddi, Maria F Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena 3ª Ed São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 IMPORTÂNCIA DA INFECÇÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA POR <i>CANDIDA SP.</i>	2
1.2. <i>CANDIDA TROPICALIS</i>	6
1.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	9
1.4. RESISTÊNCIA – PERFIL DE SENSIBILIDADE	12
OBJETIVOS	2
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. OBJETIVOS GERAIS	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. CASUÍSTICA	19
3.2. IDENTIFICAÇÃO.....	20
3.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	20
3.3.1 QUANTIFICAÇÃO.....	20
3.3.2 EXTRAÇÃO DE DNA	21
3.3.3 DOSAGEM DE DNA.....	21
3.3.4 REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO AO ACASO DO DNA POLIMÓRFICO (RAPD).....	23
3.3.5 ELETROFORESE EM CAMPO PULSÁTIL.....	24
3.3.6 MLST	25
3.3.6.1 REAÇÃO DE PCR, PURIFICAÇÃO E DOSAGEM DOS FRAGMENTOS DOS SEIS GENES SELECIONADOS PARA MLST ..	25
3.3.6.2 SEQUENCIAMENTO E AVALIAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS EM BUSCA DE HETEROZIGOSE	27
3.3.6.3 PESQUISA E INSERÇÃO DOS ALELOS E DSTs NO ENDEREÇO OFICIAL MLST <i>C. TROPICALIS</i>	28
3.3.6.4 ANÁLISE HAPLÓTIPO	29
3.3.6.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA	29
3.3.6.6 ANÁLISE DE ANCESTRALIDADE	30
3.4 PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS	30
3.5. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	31
RESULTADOS	2
4. RESULTADOS	33
4.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES	33
4.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	35
4.2.1. ANÁLISE POR RAPD DOS ISOLADOS DE <i>C. TROPICALIS</i>	35
4.2.2. PFGE COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO <i>SfiI</i>, <i>NAeI (PdiI)</i>, <i>NAeI (PdiI)</i> FASTDIGEST, <i>BssHII</i>, <i>SmaI</i> E <i>SmaI</i> FASTDIGEST	43

4.2.3. COMPARAÇÃO ENTRE RAPD COM OS TRÊS INICIADORES (P1, P2, P3) E PFGE (COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Bss</i> HI)	47
4.2.4. RESULTADOS DA REAÇÃO DE MLST	47
4.2.4.1. PCR E SEQUENCIAMENTO DOS SEIS FRAGMENTOS DE GENES <i>ICL1</i> , <i>MDR1</i> , <i>SAPT2</i> , <i>SAPT4</i> , <i>XYR1</i> E <i>ZWF1A</i>	47
4.2.4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS/GENÓTIPOS E DAS DSTs	51
4.2.4.3. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS ENCONTRADOS ENTRE OS ISOLADOS SEQUENCIAIS DE UM MESMO PACIENTE	52
4.2.4.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS SEIS FRAGMENTOS DOS GENES NA FORMA HAPLÓTIPO NÃO CONCATENADOS	56
4.2.4.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS SEIS FRAGMENTOS DE GENES CONCATENADOS COM E SEM HETEROZIGOSE	62
4.2.4.5 ANÁLISE DE ANCESTRALIDADE DAS 267 DSTs DESCRITAS	69
4.3. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS QUANTO À SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	74
4.4. DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DE PACIENTES COM FUNGEMIA HOSPITALAR POR <i>C. TROPICALIS</i> INTERNADOS NA UNICAMP	79
DISCUSSÃO	85
CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

ATCC - “American Type Culture Collection” (Coleção Americana de Tipagem de Culturas)

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CIM/MIC - Concentração Inibitória Mínima.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DST - Diploid Sequence Type

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EUCAST: “European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing”

G - Guanina

ITS - internal transcribed spacer

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

Kb - quilobases

mg - Miligrama.

mg/mL - Miligrama por mililitro

mL - mililitro

MLEE - Multilocus Enzyme Electrophoresis

MLST - Multilocus Sequence Typing

MOPS - Morpholinepropanesulfonic acid

NaOAc - Acetato de sódio

NNISS - National Nosocomial Infections Surveillance System

pb - pares de base

PBS: Tampão salina fosfato

PCR - Polymerase Chain Reaction

PFGE - “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (Eletroforese em Campo Pulsátil)

pH - Potencial hidrogeniônico

PM - Peso Molecular

q.s.p. - Quantidade suficiente para

R - Resistente

RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA

rDNA - Ribossomic DNA (DNA Ribossômico)

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

rpm - rotações por minuto

S - Sensível

SDD - Sensível Dose Dependente

SNP – Single Nucleotide Polymorphism

TE - Tris EDTA

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

YEPD – Yeast Extract, Peptone, Dextrose

µg/mL – Micrograma por mililitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos resultados da extração de DNA dos 61 isolados de *C. tropicalis* obtidos de 43 pacientes com infecção de corrente sanguínea segundo o grau de pureza, razão DNA/proteína e concentração de DNA. **(Página 22)**

Tabela 2 - Características dos fragmentos dos genes utilizados na reação de MLST. **(Página 27)**

Tabela 3 - Distribuição de 61 isolados de *C. tropicalis* a partir de 43 pacientes com diagnóstico de infecção de corrente sanguínea de acordo com a idade, hospital de origem, material biológico, data da hemocultura positiva e local de isolamento. **(Página 34)**

Tabela 4 - Distribuição de 32 isolados de *C. tropicalis* a partir de 14 pacientes com diagnóstico de infecção de corrente sanguínea, quanto à similaridade dos padrões de banda gerados pelo RAPD utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores P1, P2, e P3. **(Página 36)**

Tabela 5 - Distribuição dos resultados dos padrões de agrupamento dos 29 isolados únicos de pacientes do HCFMUSP e UNICAMP com fungemia por *C. tropicalis*, gerados pelo RAPD utilizando-se os iniciadores P1, P2 e P3. **(Página 39)**

Tabela 6 – Distribuição das concentrações de DNA amplificado dos 61 isolados de *C. tropicalis* obtidas após purificação e dosagem dos seis fragmentos de genes *ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*. **(Página 49)**

Tabela 7 - Distribuição de 61 isolados de *C. tropicalis* obtidos de cultura de sangue e/ou cateter de 43 pacientes segundo os alelos/genótipos, DSTs, análise de

ancestralidade e perfil de sensibilidade ao fluconazol encontrados nos seis fragmentos de genes analisados. **(Página 55)**

Tabela 8 - Distribuição dos resultados da análise das diferenças entre as sequências de 32 isolados sequenciais de *C. tropicalis* em 14 pacientes quanto aos alelos/genótipos, diferenças dos nucleotídeos, similaridade e análise de ancestralidade. **(Página 56)**

Tabela 9 - Distribuição de 32 isolados de *C. tropicalis* a partir de fungemia em 14 pacientes com mais de um isolado de sangue e/ou cateter, quanto à similaridade nas sequências dos 06 genes estudados (*ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*). **(Página 58)**

Tabela 10 – Distribuição das 39 DSTs segundo grupos e “singletons” gerados pela análise de ancestralidade em comparação com as 267 DST descritas até 02 de abril de 2012. **(Página 72)**

Tabela 11 - Comparação dos 32 isolados de *C. tropicalis* a partir de 14 pacientes quanto aos padrões de banda idênticos, gerados pelo RAPD (P1, P2, e P3) e PFGE (*Bss*HII) com a análise de ancestralidade por eBURST do MLST. **(Página 73)**

Tabela 12 - Distribuição dos 61 isolados de *C. tropicalis* de 43 pacientes com infecção de corrente sanguínea de 1998 a 2003 nos hospitais de ensino HCFMUSP e UNICAMP, quanto ao perfil de sensibilidade à Anfotericina B pelos métodos CLSI e EUCAST. **(Página 76)**

Tabela 13 – Distribuição das CIMs de fluconazol ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ através de microdiluição em caldo pelos métodos CLSI pH = 7,0 e 5,0 e EUCAST dos 18 isolados de *C. tropicalis* obtidas de 14 pacientes com diagnóstico de infecção de corrente sanguínea nos hospitais de ensino. **(Página 77)**

Tabela 14 - Distribuição dos isolados de *C.tropicalis* quanto às CIMs de itraconazol e voriconazol consideradas R/SDD por, pelo menos, um dos métodos CLSI e EUCAST. **(Página 78)**

Tabela 15 - Distribuição de 44 isolados de *Candida tropicalis* a partir de 26 pacientes da UNICAMP quanto a cultura positiva no sangue ou cateter, data do isolamento, antifúngico utilizado, perfil de sensibilidade ao fluconazol, “Breakthrough fungemia” e óbito. **(Página 84)**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados dos isolados múltiplos/sequenciais de *C. tropicalis* por RAPD com os iniciadores P1, P2 e P3. A coluna “0” corresponde a cepa ATCC de *C. tropicalis*. A coluna PM corresponde ao padrão de peso molecular. As amostras do mesmo paciente estão dispostas lado a lado. O paciente de número 1 apresentou o isolado de número 1b com padrão diferente das demais nos três oligonucleotídeos iniciadores selecionados. O mesmo ocorre para os pacientes 3, 6, 7 e 11. **(Página 37)**

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados dos isolados únicos da UNICAMP (isolados 15 a 26) e do Hospital das Clínicas da FMUSP (isolados 27 a 43) submetidos à reação de RAPD (com os iniciadores P1, P2 e P3). A coluna “0” corresponde a cepa ATCC de *C. tropicalis*. **(Página 38)**

Figura 3: Comparação entre os dendrogramas gerados por UPGMA dos produtos amplificados dos isolados múltiplos de *C. tropicalis* da UNICAMP com marcador molecular RAPD (P1, P2 e P3). Em azul, está representado comparativamente o maior grupo formado pelo P3 com o P1 e P2, evidenciando a menor capacidade de discriminação para o P3. As flechas em vermelho estão destacando os isolados 3b e 7a. **(Página 41)**

Figura 4: Os dendrogramas indicam a similaridade entre os isolados únicos de *C. tropicalis* do HCFMUSP (verde) e da UNICAMP (preto) através da análise por RAPD com os oligonucleotídeos iniciadores P1, P2 e P3. Os grupos foram definidos por UPGMA e as matrizes geradas pelo coeficiente de similaridade de Dice. Em laranja, está representada a cepa de referencia ATCC e destacados em verde, estão os isolados do HCFMUSP. **(Página 42)**

Figura 5: Resultado da corrida eletroforética em campo pulsátil do DNA extraído dos isolados de *C. tropicalis* com a utilização da enzima de restrição *NaeI*. O primeiro gel corresponde aos isolados da UNICAMP e o segundo, aos do HCFMUSP. O padrão de peso molecular *S. cerevisae* está disposto na primeira coluna e a última coluna 0 corresponde à cepa ATCC de *C. tropicalis*. Nas colunas 8b a 9c nota-se uma grande variação na intensidade das bandas e o padrão gerado pelos cortes da enzima de restrição é múltiplo e de difícil comparação. **(Página 44)**

Figura 6: Resultado da corrida eletroforética em campo pulsátil do DNA dos isolados de *C. tropicalis* com a utilização da enzima de restrição *SfiI*. O padrão de peso molecular *S. cerevisae* está disposto na primeira coluna e a última coluna 0 corresponde a cepa ATCC de *C. tropicalis*. As amostras múltiplas de um mesmo paciente estão representadas nas colunas 2 a 13, destacando-se as amostras 5a, 5b e 7a. **(Página 45)**

Figura 7: Resultado da corrida eletroforética em campo pulsátil do DNA dos isolados de *C. tropicalis* com a utilização da enzima de restrição *BssHII*. O padrão de peso molecular *S. cerevisae* está disposto na primeira e a última coluna 0 corresponde a cepa ATCC de *C. tropicalis*. Nas colunas 2 a 10 estão dispostas as amostras dos isolados múltiplos da UNICAMP, destacando-se 11a, 11b e 12a. **(Página 45)**

Figura 8: Resultado da análise filogenética comparativa do marcador molecular PFGE com as enzimas de restrição *SfiI* (esquerda) e *BssHII* (direita) pelo método de agrupamento de vizinhos (“neighbor joining”) e o coeficiente de similaridade de Dice. Os padrões diferentes obtidos pela corrida eletroforética estão representados ao lado de cada árvore filogenética. Em verde, estão destacados os isolados do HCFMUSP e, em preto, os isolados da UNICAMP. **(Página 46)**

Figura 9: Resultado das reações de amplificação dos fragmentos dos 06 genes estudados: *ICLI*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*, evidenciando o tamanho e a presença de banda única. A primeira coluna de cada corrida eletroforética corresponde ao padrão de peso molecular (M) e as demais colunas correspondem a alguns dos isolados sequenciais de um mesmo paciente da UNICAMP. (Página 50)

Figura 10: Resultado da corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, utilizando 2 ul de Low DNA Mass Ladder e 2ul de DNA purificado com o “KIT GFX PCR DNA and GEL BAND PURIFICATION”. A primeira coluna representa o Ladder referente às concentrações de DNA obtidas com as amostras ATCC amplificadas com cada iniciador testado. Os tamanhos de fragmentos gerados são *ICLI*: 737 pb, *MDR1*: 663 pb, *SAPT2*: 652 pb, *SAPT4*: 483 pb, *XYR1*: 483 pb e *ZWF1a*: 647 pb. Os produtos esperados para sequenciamento são de 370 a 520 pb. (Página 51)

Figura 11: A figura editada do programa BIOEDIT mostra os sítios polimórficos dos fragmentos de genes estudados *ICLI*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*. Os sítios heterozigóticos estão representados pelas letras K, M, S, R, Y e W de acordo com as normas IUPAC. (Página 54)

Figura 12a: Representação das diferentes árvores filogenéticas não enraizadas por máxima verossimilhança dos fragmentos dos genes *ICLI*, *MDR1* e *SAPT2*, das 61 sequências de 43 pacientes do HCFMUSP e da UNICAMP. Os números destacados em vermelho representam os valores de “bootstrap” obtidos na construção das árvores. (Página 59)

Figura 12b: Representação das diferentes árvores filogenéticas não enraizadas por máxima verossimilhança dos fragmentos dos genes *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*, das 61 sequências de 43 pacientes do HCFMUSP e da UNICAMP. Os números

destacados em vermelho representam os valores de “bootstrap” obtidos na construção das árvores. (Página 60)

Figura 13: Dendrogramas não enraizados obtidos por máxima verossimilhança com as 90 sequências completas do fragmento de gene *XYRI*. Os dendrogramas incluíram as sequências dos 24 alelos encontrados para esse fragmento de gene dos 61 isolados dos 43 pacientes com infecção de corrente sanguínea nos hospitais de ensino estudados. À direita, destaca-se o dendrograma na forma circular. Em azul, estão representadas as posições dos 24 alelos dos isolados da UNICAMP e HCFMUSP. (Página 61)

Figura 14: Dendrogramas não enraizados obtidos por máxima verossimilhança com as sequências completas dos seis fragmentos dos genes concatenados excluindo-se os sítios heterozigóticos. À esquerda está representado o dendrograma realizado somente com as 39 DSTs dos 61 isolados do estudo, destacando-se os isolados 3b, 7a, 18, 21, da UNICAMP e o isolado 28 do HCFMUSP. À direita, o dendrograma circular representa o agrupamento de todas as sequências das 267 DSTs do banco de dados mundial. As DSTs do estudo estão marcadas com uma cruz azul. (Página 64)

Figura 15a: Dendrograma não enraizado obtido por máxima verossimilhança dos sítios polimórficos das 61 sequências dos fragmentos dos 06 genes(*ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4* e *ZWF1a*) concatenados na forma haplótípica. As sequências foram dispostas em dois Clados I e II e um Clado solitário. O Clado I foi dividido em 3 grupos. Em vermelho estão destacados os isolados do HCFMUSP. O Clado II representa os isolados 7a, 3b e 18. (Página 65)

Figura 15b: Árvores filogenéticas não enraizadas pelo método de agrupamento máxima verossimilhança. A) 32 isolados múltiplos de *C. tropicalis* de 14 pacientes da UNICAMP, submetidos à reação de sequenciamento dos seis genes

concatenados; B) 12 isolados únicos da UNICAMP e C) 17 isolados únicos do HCFMUSP. **(Página 66)**

Figura 16: Comparação das árvores filogenéticas (A) das sequências dos seis genes concatenados (*ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4* e *ZWF1a*) na sua forma haplótipa com (B) as sequências do fragmento de gene *XYR1*. Os dendrogramas foram gerados pelo método de agrupamento máxima verossimilhança evidenciando dois Clados I e II e com grupos não idênticos mas comparáveis. O Clado I foi dividido em 3 grupos. Em vermelho, estão destacados os isolados do HCFMUSP. O Clado II representa os isolados 7a, 3b e 18. **(Página 67)**

Figura 17: Comparação das árvores filogenéticas das sequências dos seis fragmentos de genes concatenados na sua forma haplótipa (A) com as sequências dos seis fragmentos de genes concatenados excluindo-se a heterozigose (B), dos 61 isolados de *C. tropicalis*. Os dendrogramas foram gerados pelo método de agrupamento máxima verossimilhança. Na análise haplótipa houve a divisão em dois Clados I e II. O dendrograma B não foi dividido em clados ou grupos pelos baixos valores de “bootstrap”, embora muitas sequências tenham sido coincidentes. Em vermelho, estão destacados os isolados do HCFMUSP em ambos os dendrogramas. Os isolados 7a, 3b e 18 foram agrupados de forma semelhante nas duas árvores. **(Página 68)**

Figura 18: Análise filogenética por inferência Bayesiana das 267 sequências dos seis fragmentos de genes (*ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4* e *ZWF1a*) concatenados e convertidos na forma haplótipa obtidas no endereço eletrônico MLST. Em vermelho, estão destacadas as DSTs encontradas no HCFMUSP. **(Página 69)**

Figura 19: Análise comparativa da representação gráfica da análise de ancestralidade das sequências dos 61 isolados de *C. tropicalis* das instituições de ensino HCFMUSP e UNICAMP por eBURST com a árvore filogenética por inferência

Bayesiana dos sítios polimórficos por MLST, concatenados e convertidos na forma haplótipa das 267 DSTs dos seis genes *ICLI*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4* e *ZWF1a*. Em vermelho, estão destacados os isolados sequenciais da UNICAMP. Análise por eBURST dos complexo clonais construídos a partir das DSTs de todos os isolados do banco de dados oficial MLST identificou 05 grupos/complexos clonais. **(Página 71)**

RESUMO

Magri MMC. *Caracterização molecular e perfil de sensibilidade de Candida tropicalis isoladas em corrente sanguínea e cateter de pacientes internados em hospitais de ensino* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Infecções causadas por *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) são associados à elevada morbi-mortalidade, e foram consideradas como importantes causas de infecção de corrente sanguínea no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) de março de 1998 a março de 2001. Adicionalmente, são responsáveis pelo aumento do tempo e dos custos de hospitalização e necessidade de cuidados intensivos. Esse estudo tem como objetivo a caracterização molecular e perfil de sensibilidade de 61 isolados de *C. tropicalis* a partir de candidemias no HCFMUSP e Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), através das técnicas de amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD), eletroforese em campo pulsátil (PFGE), tipagem de sequências de múltiplos locus gênicos (MLST) e antifungograma por microdiluição pelos métodos propostos, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST). A análise filogenética por RAPD evidenciou que os iniciadores P1 e P2 mostraram maior capacidade de discriminação que P3. Na análise por PFGE com enzimas de restrição *SfiI*, *SmaI*, *BssHII* e *NaeI*, a enzima *BssHII* mostrou maior poder discriminatório. MLST contribuiu com 36 novas *diploid sequence type* (DSTs) e 23 novos alelos, de acordo com o banco de dados oficial do MLST (<http://pubmlst.org/ctropicalis/>), representando o primeiro estudo que caracterizaram isolados sequenciais na América do Sul. Entre os isolados sequenciais de um mesmo paciente, as microvariações foram mais frequentes no fragmento de gene *XYRI* em 8 pacientes e macrovariações ocorreram em quatro pacientes com mais de um isolado, destacando-se três que apresentaram diferença nos seis alelos estudados. A análise comparativa entre os métodos evidenciou diferenças entre os isolados múltiplos dos pacientes 3, 7 e 11, considerados diferentes pelos três métodos. O poder discriminatório foi de 83,47% para RAPD, 82,18% para PFGE e 97,4 % para MLST. Os resultados do antifungograma mostraram concordância entre os métodos CLSI e EUCAST de 73,8% para o fluconazol, 67,2% para o itraconazol e 80,3% para o voriconazol. Do total de 61 isolados estudados, 3 isolados de diferentes pacientes foram resistentes ao fluconazol, com MIC de 64 µg/mL. O fenômeno de “trailing” foi observado em 50% das amostras testadas frente ao fluconazol, 23% ao voriconazol e 21,3% ao itraconazol. O uso de pH 5,0 para re-análise do CLSI frente ao fluconazol revelou-se como uma ferramenta útil para esclarecer o perfil de sensibilidade de isolados que apresentaram o fenômeno de “trailing”. Não houve correlação entre perfil genético gerado pelas técnicas de caracterização molecular estudadas e o perfil fenotípico através do teste de sensibilidade aos antifúngicos.

Descritores: *Candida tropicalis*, tipagem molecular, farmacorresistência fúngica, fungemia, tipagem de sequências multilocus

SUMMARY

Magri MMC. *Molecular characterization and susceptibility profile of Candida tropicalis isolated from bloodstream culture and catheter in nosocomial patients from teaching hospitals* [thesis]. Sao Paulo: Medical school, University of São Paulo; 2012.

Infections caused by *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) have been characterized as important causes of candidemia at the Hospital of the Medical school, University of São Paulo (HCFMUSP) from March 1998 to March 2001 and are associated with high morbidity and mortality. Additionally, they have been related to higher hospitalization costs because of longer hospitalization times and intensive care needs. This study aims to analyze the molecular typing and antifungal susceptibility profile of 61 isolates of *C. tropicalis* from 41 patients with candidemia in HCFMUSP and University of Campinas (UNICAMP), through Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multilocus Sequence Typing (MLST) and broth microdilution antifungal susceptibility methodologies proposed by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST). Phylogenetic analysis showed higher discriminatory power index of P1 and P2 primers than P3 by RAPD analysis. PFGE was performed with restriction enzymes *Sfi*I, *Sma*I, *Nae*I and *Bss*HII) and the enzyme *Bss*HII presented the best performance. MLST analyses revealed 36 new diploid sequence type (DSTs) and 23 new alleles according to the *C. tropicalis* MLST database (<http://pubmlst.org/ctropicalis/>), representing the first study to characterize the sequential isolates of *C. tropicalis* candidemia in South America. Microvariation in a single gene was found in the sequential isolates from 8 patients. The main polymorphisms occurred in the alleles of the *XYR1* gene. Macrovariation was detected in isolates from four patients, where 3 patients presented polymorphisms in six gene fragments. The comparative analysis revealed differences among sequential isolates from patients 3, 7 and 11, considered by three different methods. The discriminatory power was 83.47% for RAPD, 82.18% for PFGE and 97.4% for MLST. The agreement between the CLSI and EUCAST methods was 73.8% to fluconazole susceptibility, 67.2% to itraconazole and 80.3% to voriconazole. Of the 61 isolates tested, 3 isolates from different patients were resistant to fluconazole, MIC of 64 mg/mL. The trailing phenomenon was observed in 50% to fluconazole, 23% to voriconazole and 21.3% to itraconazole. Among the isolates studied, the use of pH 5.0 facilitated the determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) for the re-analysis of fluconazole by CLSI, proving to be an important tool for the trailing phenomenon. No correlation was observed between genetic profile generated by the techniques of molecular characterization and phenotypic profile determined by susceptibility tests to antifungal drugs.

Descriptors: *Candida tropicalis*, molecular typing, drug resistance fungal, fungemia, multilocus sequence typing

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Importância da Infecção de Corrente Sanguínea por *Candida* sp.

As infecções fúngicas sistêmicas hospitalares, particularmente as causadas por *Candida* sp, têm se apresentado como importantes causas de morbi-mortalidade em pacientes internados, além de serem responsáveis pelo aumento do tempo e dos custos de hospitalização. (Fraser et al., 1992; Voss et al., 1996; Rentz et al., 1998; Pfaller et al., 1998; Gudlaugsson et al., 2003; Sheng et al., 2005; Morgan et al., 2005).

Na década de 90, um episódio de candidemia custava 34.123 dólares para o sistema público de saúde e 44.536 dólares para o sistema privado (Rentz et al., 1998). O custo nacional de candidemia hospitalar excede duzentos milhões de dólares. O tempo de internação é o principal fator responsável por esses valores, justificando a importância de investimentos no estudo das fungemias por *Candida*. O tratamento de candidemia aumenta os gastos hospitalares em 6.000 a 22.000 dólares e os custos de hospitalização em 6.000 e 29.000 dólares (Morgan et al., 2005).

As espécies de *Candida* mais frequentemente isoladas em corrente sanguínea (candidemia) são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, entre outras. Além das infecções causadas por *C. albicans*, merecem destaque espécies resistentes ao fluconazol, tais como *C. krusei* e isolados de *C. glabrata* (Hitchcock et al., 1993).

O aumento da incidência de candidemia tem sido atribuído à melhora da sobrevivência de pacientes altamente suscetíveis à infecção. Os principais grupos de pacientes que estão relacionados ao aumento de casos de infecção de corrente sanguínea são: 1- Pacientes imunossuprimidos por neoplasias em geral, câncer hematológico, regimes quimioterápicos agressivos, transplantes de medula óssea ou órgãos sólidos e neutropenia prolongada (Abi-Said et al., 1997; Viscoli et al., 1999; Kontoyiannis et al., 2001; Myoken et al., 2004; Vigoroux et al., 2006; Sipsas et al., 2009), aids (Tumbarello et al., 1999), 2- Pacientes submetidos a procedimentos invasivos como uso de cateteres venosos centrais, longa permanência em UTI, nutrição parenteral, grandes cirurgias, uso de antibióticos de largo espectro e pacientes queimados (Das et al., 2011; Fraser et al.,

1992; Almirante et al., 2005; Colombo et al., 2007); e 3- Em neonatologia, a infecção de corrente sanguínea por *Candida* ocorre especialmente em recém-nascidos de baixo peso (Tragiannidis et al., 2012; Spiliopoulou et al., 2012).

Candidemia também pode ser classificada como comunitária. Nos EUA, Sofair et al. (2006) estudaram 1143 episódios de candidemia, dos quais 356 foram considerados comunitários (31%), entre outubro de 1998 e setembro de 2000. *C. albicans* foi responsável por 132 (37%), *C. glabrata* 89 (25%), *C. parapsilosis* 57 (16%), e *C. tropicalis* 53 (15%). Os casos de candidemia da comunidade foram menos frequentemente associados com imunossupressão. Dentre os fatores de risco para candidemia dos 1143 episódios destacam-se: cirurgias até três meses (29%), terapia imunossupressora (28%), neoplasias (21%), neutropenia (10%), infecção pelo HIV (8%) e uso de cateter venoso central em 197 pacientes (55%).

As taxas de mortalidade e a letalidade associadas à candidemia permanecem altas (Gudlaugsson et al., 2003; Falagas et al., 2006; Zaoutis et al., 2005). A mortalidade varia de 14% (em Unidade de Terapia Intensiva) a 71% em transplantados hepáticos. Os estudos diferem quanto aos métodos utilizados, população estudada, número de isolados estudados e critério para definir mortalidade atribuída à candidemia.

Na década de 80, a infecção por *Candida* spp foi a sétima causa de infecções nosocomiais nos EUA. Durante a década, a incidência foi aumentando, estando entre os cinco primeiros agentes isolados de hemoculturas intra-hospitalares (Banerjee et al., 1991).

Na década de 1990, no programa SCOPE (Programa Nacional de Vigilância das Infecções Nosocomiais de Corrente Sanguínea), realizado em 50 centros médicos dos EUA, Pfaller et al. (1998) encontraram *Candida* spp como o agente responsável por 8% (379) dos 4.725 episódios de infecção de corrente sanguínea. Segundo registros do “National Nosocomial Infections Surveillance System”, as espécies de *Candida* foram o sexto patógeno mais isolado entre as infecções hospitalares, ocupando o quarto lugar em unidades de terapia intensiva. Em relação ao total de infecções fúngicas hospitalares, as espécies de *Candida* foram responsáveis por 72%. Dados semelhantes foram encontrados por Karlowsky et al. (1997) que estudaram retrospectivamente, de 1976 a

1996, no “Health Sciences Centre” em Winnipeg – Manitoba, a evolução dos índices de candidemia. Os autores mostraram que a partir de 1991, *Candida spp.* passou a ser a quarta causa de infecção de corrente sanguínea, antecedida por *Staphylococcus coagulase negativo*, *S. aureus* e *E. coli*.

No programa SENTRY (antimicrobial surveillance program), de 1997-1999, Pfaller et al. (2001) relataram que dos 1184 isolados de *Candida spp.* em corrente sanguínea, 55% foram *C. albicans*, 15% *C. glabrata*, 15% *C. parapsilosis* e 9% *C. tropicalis*. Na América Latina, encontraram, 45% *C. albicans*, 25% *C. parapsilosis*, 16% *C. tropicalis* e 6% *C. glabrata*.

De 2000 a 2011, *Candida sp.* foi considerada a quarta causa de infecção de corrente sanguínea em hospitais terciários tanto nos EUA quanto em outros centros no mundo (Edmond et al., 1999; Wisplinghoff et al., 2004). Nos EUA, Europa e Canadá a taxa de incidência varia entre 0,045 e 0,38 casos/1000 admissões (Falagas et al., 2010). No Brasil as taxas variam entre 0,74 e 2,49/1000 admissões (Colombo et al., 2006; Colombo et al., 2007; Motta et al., 2010; Sampaio Camargo et al., 2010).

Vários trabalhos relataram a prevalência de *C. albicans* e o aumento das espécies não *C. albicans* (Papas et al., 2003; Falagas et al., 2010). Entre eles, Price et al. (1994), num estudo realizado em hospital terciário nos EUA, relataram diminuição de candidemia por *C. albicans* de 87% para 30%, aumento de *C. glabrata* de 2% para 24% e *C. tropicalis* de 2% para 24%. Em estudo mais recente, Sipsas et al. (2009) avaliaram retrospectivamente pacientes com candidemia e neoplasias hematológicas na Universidade do Texas, de março de 2001 a fevereiro de 2007. Dos 173 episódios de candidemia em 170 pacientes, 125 (72%) apresentaram persistência da candidemia, principalmente em uso de fluconazol (22%), caspofungina (20%) e voriconazol (14%). As frequências de *C. glabrata* e *C. krusei* diminuíram e de *C. parapsilosis* (24%) e *C. tropicalis* (21%) aumentaram. A mortalidade global foi de 38% e a mortalidade atribuída a candidemia foi 18%. A espécie com maior mortalidade foi *C. glabrata*.

Na França, em um estudo comparativo entre fungemia de *C. albicans* e não *C. albicans*, Leroy et al. (2010) encontraram que candidemia por espécies não *C. albicans* ocorreram mais tardiamente e foram mais associadas com neutropenia.

Em hospitais de ensino na China de 1998 a 2007, Wu et al. (2011) encontraram, em análise multivariada, que os episódios de candidemia por espécies não *C. albicans* foram significativamente relacionados a trauma craniano e sepse bacteriana e *C. albicans*, entubação orotraqueal e leucocitose.

Em hospitais brasileiros, Colombo et al. (2006) registraram 712 casos de candidemia, com incidência de 2,49 casos por 1.000 admissões e 0,37 casos por 1.000 pacientes-dia. *C. albicans* foi a espécie mais comum (40%), seguida por *C. tropicalis* (20,9%) e *C. parapsilosis* (20,5%). Perfil de sensibilidade diminuído ao fluconazol ocorreu em 33 (5%) dos isolados, sendo seis (1%) resistentes. Houve uma nítida correlação de concentrações inibitórias mínimas entre fluconazol e voriconazol.

Em São Paulo, Brasil, Colombo et al. (2007) avaliaram as características epidemiológicas de candidemia em 4 hospitais terciários. Dos 7038 episódios de infecção de corrente sanguínea, candidemia foi identificada em 282 casos (4%). A taxa de incidência foi 1,66 por 1000 admissões hospitalares. *C. albicans* foi o agente mais frequentemente isolado em 38% e as espécies não *C. albicans* em 62% incluindo predominantemente *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. A resistência aos azóis ocorreu em 2% de todos isolados (1 isolado *C. glabrata* e 4 *C. rugosa*). A taxa de mortalidade foi de 61% e o paciente cirúrgico com internação prolongada foi o mais frequentemente acometido.

No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de 1994 a 1996, Costa et al. (2000) descreveram 50% das candidemias causadas por *C. albicans* e 50% por espécies não *C. albicans*. Registraram elevada letalidade geral nas candidemias (41%), com maior gravidade para a *C. tropicalis* (71%). Em 2006, Motta et al. (2010) encontraram uma taxa de incidência de candidemia de 1,87/1000 admissões sendo *C. albicans* (52.2%), *C. parapsilosis* (22.1%), *C. tropicalis* (14.8%) e *C. glabrata* (6.6%).

1.2. *Candida tropicalis*

Como agente causador de candidíase invasiva, *C. tropicalis* é atualmente considerada uma das espécies mais frequentemente isoladas (segunda à quarta espécie mais frequente). A proporção de episódios de candidemia causada por *C. tropicalis* varia amplamente segundo a área geográfica de 4% a 24% de todos os episódios de candidemia (Fallagas et al., 2010; Horn et al., 2009; Leroy et al., 2009; Bedini et al., 2006; Nucci e Colombo, 2007; Chakrabarti et al., 2009; Muñoz et al., 2010). Tem-se mostrado alta prevalência em pacientes com câncer e neutropenia e em outras condições predisponentes como diabetes e no paciente idoso (Wingard et al., 1995; Abi-Said et al., 1997; Viscoli et al., 1999; Kontoyiannis et al., 2001; Myoken et al., 2004; Vigoroux et al., 2006; Nucci e Colombo, 2007; Sipsas et al., 2009).

Em modelo animal de fungemia, *C. tropicalis* não foi necessariamente mais virulenta que *C. albicans*. No entanto, mostrou maior virulência quando introduzida em trato gastrointestinal de animal neutropênico ou imunodeprimido com citarabina, com mucosite ou com supressão da microbiota bacteriana endógena por antibióticos (Wingard et al., 1982).

Em estudo multicêntrico de vigilância de candidemias realizado pela Organização Européia de Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC), de 1992 a 1994, 90 de 249 episódios de candidemia ocorreram em pacientes com tumor sólido e 159 em pacientes com doença hematológica maligna. Candidemia por *C. tropicalis* foi encontrada em 11% dos casos, antecedida por *C. albicans* (49%), com incidência similar a *C. parapsilosis* (11%) e seguida por *C. glabrata* (10%) (Viscoli et al., 1999).

No Texas (EUA), de 1988 a 1992, Abi-Said et al. (1997) encontraram 491 episódios de fungemia (6/1000 admissões), dos quais, espécies não *C. albicans* foram responsáveis por 53%. Houve aumento na incidência de infecção por *C. krusei* e *C. glabrata*, que parece estar relacionada ao uso profilático do fluconazol. Em análise multivariada, um fator importante para infecção de corrente sanguínea por *C. tropicalis* foi a ausência de profilaxia com fluconazol. Infecções por *C. tropicalis* foram mais frequentes nos neutropênicos e com índice de APACHE II elevado.

Segundo Kontoyiannis et al. (2001), em estudo retrospectivo, pacientes com doença hematológica maligna, principalmente leucemia, apresentaram mais fungemia por *C. tropicalis*. A maioria dos casos de fungemia (60%) estava associada à neutropenia, fungemia persistente e maior tempo de internação em UTI, podendo significar maior virulência. Em contraste com outros estudos, em que fungemia por esta espécie em unidade de terapia intensiva está associada a altos índices de APACHE II, pacientes com *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram baixa pontuação.

Em hospitais israelenses, Weinberger et al. (2005) mostraram que *C. albicans* foi a espécie predominante (55%), seguida por *C. parapsilosis* (16%) e *C. tropicalis* (16%). *C. glabrata* foi responsável por 10% e *C. krusei* 2%. Os pacientes com *C. tropicalis* eram mais jovens e mais comumente apresentavam neutropenia grave, leucemia e haviam sido submetidos a transplante de medula óssea. A letalidade foi maior nas espécies não *C. albicans*.

Em Barcelona, na Espanha, entre janeiro de 2002 a dezembro de 2003, Almirante et al. (2005) estudaram 345 casos de candidemia com incidência anual de 4,3 casos/100.000 habitantes, 0,53 casos/1.000 altas hospitalares e 0,73 casos/10.000 pacientes - dia. *C. tropicalis* (58%) foi mais frequente em neutropênicos e em neoplasias malignas (58%) comparada com outras espécies de *Candida* (4%) ($P = 0.01$). Os autores descreveram uma letalidade de 42%. Já Vigouroux et al. (2006) relataram 45 episódios de candidemia em pacientes com neoplasia hematológica maligna na França, entre 1997 e 2004, encontrando alta incidência de *C. tropicalis* (27%). Adicionalmente, Fraser et al. (1992), em estudo retrospectivo de 106 pacientes com candidemia entre 1988-1989 e Rex et al. (1996) avaliando 206 pacientes não neutropênicos, observaram que *C. tropicalis* foi a segunda espécie mais encontrada.

Em outro estudo espanhol, Muñoz et al. (2010) compararam 59 casos de fungemia por *C. tropicalis* com 177 casos de outras espécies de *Candida* num período de 24 anos (janeiro de 1985 a dezembro de 2008). A análise multivariada mostrou como risco independente para fungemia, câncer e porta de entrada abdominal. Quando os sobreviventes foram comparados com os não sobreviventes, os fatores de risco associados a pior prognóstico foram neutropenia, tratamento com corticosteroides e

choque séptico. Os fatores de risco para mortalidade em análise multivariada foram: tratamento com corticosteroides e choque séptico, enquanto infecção do trato urinário e remoção do cateter foram fatores protetores. *C. tropicalis* foi a quarta causa mais comum de fungemia.

No Brasil, Cunha, em 2003, em dissertação apresentada à UNIFESP, estudou candidemias de dois centros universitários. Foram identificados 299 episódios de candidemia com predomínio de espécies não *C. albicans* (59%), sendo 123 episódios por *C. albicans* (41%) e 83 por *C. tropicalis* (27,7%). Nos pacientes com câncer, *C. tropicalis* foi predominante em relação a *C. albicans*. A mortalidade associada à candidemia por *C. tropicalis* foi maior que por *C. albicans* e a neutropenia foi mais frequentemente associada à *C. tropicalis*.

No Hospital das Clínicas da FMUSP, Cota, em 2004, em estudo retrospectivo para dissertação apresentada a Faculdade de Medicina da USP, observou um crescente aumento no número de pacientes com fungemias por *C. tropicalis* de 1996 a 2001. As clínicas com maior ocorrência de fungemia foram: Enfermaria da Hematologia (8 casos), Unidade de Queimados (6 casos), UTI do Pronto Socorro (6 casos), UTI Primeira Clínica Cirúrgica, Segunda Clínica Cirúrgica e Cirurgia Experimental (5 casos), UTI da Clínica Médica (5 casos) e UTI de Tétano e Moléstias Infecciosas (5 casos). Houve maior prevalência em pacientes com câncer (33,8%), hepatopatias graves e queimaduras extensas.

A maior casuística de fungemia por *C. tropicalis* brasileira foi publicada por Nucci et al. (2007), com um total de 924 episódios de candidemia de 906 pacientes de 12 instituições brasileiras. *C. albicans* foi a mais freqüente (384 casos, 41,5%) seguida por *C. tropicalis* (188 casos, 20%) e *C. parapsilosis* (187 casos, 20%). A proporção de candidemias causadas por *C. tropicalis* variou, entre as 12 instituições, de 15,7% para 25,8%. Não houve diferença na distribuição de casos entre *C. albicans* e *C. tropicalis* nos diferentes grupos etários. Em relação às condições de base, exceto para recém-nascidos, destacaram-se pacientes com câncer, especialmente tumores sólidos, diabetes em adultos e idosos e doença pulmonar em crianças. Em neonatos, a prematuridade foi a condição mais importante (87%). Não houve diferenças estatisticamente significantes

entre *C. tropicalis* e *C. albicans*. A proporção de doentes com câncer foi mais elevada em pacientes com *C. tropicalis*, mas a diferença não foi estatisticamente significativa (30% vs. 24%). *C. tropicalis* foi a segunda espécie mais isolada em pacientes com câncer e neoplasias hematológicas. Entre os 54 pacientes neutropênicos, *C. tropicalis* foi o principal agente de candidemia (30%), seguida por *C. parapsilosis* (24%) e *C. albicans* (22%).

1.3. Caracterização Molecular

A aplicação de técnicas moleculares tem um papel importante na investigação epidemiológica, contribuindo para a caracterização da origem de infecções hospitalares, particularmente de surtos, no estudo da resistência dos microorganismos aos antimicrobianos, além de permitir o esclarecimento de aspectos patogênicos.

Entre os métodos que têm sido mais utilizados na caracterização molecular podem ser citados:

1. RAPD (“Random Amplification of Polimorphic DNA”) amplificação aleatória do DNA polimórfico.
2. RFLP/REA (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”) análise do DNA genômico por polimorfismo do tamanho dos fragmentos gerados pelas enzimas de restrição.
3. PFGE (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”) eletroforese em campo pulsátil com enzima de restrição.
4. MLST (“Multilocus Sequence Typing”) tipagem de sequências de múltiplos locus gênicos.

A técnica de RAPD tem sido muito usada para caracterização molecular de *Candida spp.* Em um estudo comparativo entre RAPD, API 120 C e CHROMagar, Steffan et al. (1997) avaliaram a capacidade de discriminação do método. Todos isolados designados como *C. tropicalis* pelo API20C e não pelo RAPD, foram identificados como não *C. tropicalis* pelo CHROMagar. Quando foi repetido API20C,

muitos desses isolados contraditórios não revelaram ser *C. tropicalis*, indicando que RAPD foi um teste confiável e discriminante.

Por outro lado, Holmberg et al. (1996) demonstraram que a reprodutibilidade dessa técnica depende das condições da padronização da PCR. Em *C. albicans*, Clemons et al. (1997) compararam as técnicas de RAPD, PFGE e REA (análise do DNA por enzimas de restrição), concluindo que o REA, embora necessite de maiores quantidades de DNA, foi o mais reprodutível. O RAPD é reprodutível, porém apresenta variação na intensidade das bandas. Magee et al. (1992) testaram a enzima de restrição *EcoR1* em isolados de *C. albicans*, mostrando que a análise por RFLP apresentou menor grau de resolução que o PFGE.

Na França, Vrioni et al. (2001) analisaram por RAPD e PFGE 17 isolados de *C. albicans*, 16 de *C. tropicalis* e 10 de *C. parapsilosis*. Os isolados de *C. tropicalis* apresentaram padrões diferenciados por RAPD, sugerindo que a infecção não foi hospitalar. Os resultados relativos à *C. parapsilosis* mostraram homologia das cepas, sugerindo uma fonte única exógena.

Wang et al. (2007) estudaram a associação entre sensibilidade ao fluconazol e o perfil genético de *C. tropicalis* por RAPD e PFGE com a enzima de restrição *BssHII* e encontraram que isolados resistentes parecem ser geneticamente relacionados.

A técnica de PFGE com enzima de restrição foi amplamente utilizado em vários estudos de investigação epidemiológica, caracterizando as amostras de acordo com seu padrão cromossômico. Rho et al. (2004) mostraram superioridade da cariotipagem utilizando a enzima de restrição *BssHII* em relação a *SfiI* em amostras de urina. De Bernardis et al. (1999) compararam pelas análises de morfologia, resistência e PFGE, o biotipo e a virulência em isolados de pele de *C. parapsilosis* de pacientes HIV+ e HIV-.

Doebbeling et al. (1991) realizaram um estudo comparando eletroforese em campo pulsátil (utilizando também as enzimas de restrição *SfiI*, *EagI*, *SacII* e *NaeI*) com padrão de isoenzimas para tipagem molecular de *C. tropicalis* em nove isolados, mostrando que a cariotipagem sem enzima de restrição falhou em distinguir entre os isolados do surto e os controles, necessitando das enzimas de restrição. O perfil de

isoenzimas foi compatível com a cariotipagem embora de difícil execução e de alto custo.

Zhang et al. (1997) estudaram 89 isolados de 56 pacientes em sete centros americanos, analisados por eletroforese em campo pulsátil com as enzimas de restrição *SfiI* e *BssHII* e encontraram 49 diferentes tipos de DNA dos 89 isolados. Chou et al. (2007a), estudando o poder discriminatório de PFGE com as enzimas de restrição *BssHII*, *NaeI* e *RsrII* em *C. tropicalis* concluíram que a *NaeI* foi a melhor escolha entre as três.

Atualmente, outras técnicas moleculares têm sido desenvolvidas com alto poder discriminatório e reprodutibilidade. Entre elas destaca-se MLST, método baseado na análise dos polimorfismos dos nucleotídeos “single-nucleotide polymorphisms” (SNPs) em fragmentos de genes essenciais “housekeeping genes” de até 500pb detectados através de sequenciamento molecular (Bougnoux et al., 2002; Odds et al., 2006; Odds e Jacobsen, 2008). A técnica de MLST foi descrita para espécies de *Candida* como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, entre outras.

Em *C. tropicalis*, até 26 de agosto de 2012, estavam disponíveis somente seis estudos com a técnica de MLST sendo 02 do Reino Unido/Escócia, 03 de Taiwan e um artigo de revisão de análise filogenética. O primeiro estudo foi descrito por Tavanti et al. (2005).

Tavanti et al. (2005) descreveram alto grau de reprodutibilidade para diferenciar, por MLST, isolados de *C. tropicalis* através de fragmentos polimórficos de seis genes (*MDR1*, *ICL1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*) com poder discriminatório acima de 99%. O método diferenciou 87 tipos de seqüências diplóides DSTs (“Diploid Sequence Type”) entre o total de 106 isolados testados. O gene *XYR1* mostrou alta capacidade de diferenciação, distinguindo três genótipos por polimorfismo para 11 sítios polimórficos.

Em Taiwan, Chou et al. (2007b) utilizaram o MLST para caracterizar os perfis genéticos de 52 isolados de *C. tropicalis*. Encontraram 33 DSTs entre os 52 isolados e 33,3% das 33 DSTs foram agrupados em três grandes grupos clonais por análise de ancestralidade (eBURST). Dois “clusters” apresentaram resistência ou crescimento “trailing” ao fluconazol (14/20, 70%). Os padrões encontrados na cariotipagem sugerem

que, possivelmente, mais de um clone com resistência ou “trailing” surgiram e se espalharam em Taiwan em 1999. Li et al. (2009) estudaram a possível disseminação de uma DST em Taiwan num estudo multicêntrico. Encontraram correlação entre DST e resistência e a presença de alguns alelos relacionados com baixos valores de CIM.

Jacobsen et al. (2008) realizaram um estudo da filogenia molecular por MLST em 242 isolados de *C. tropicalis*. A análise haplótipa revelou diversos eventos de recombinação. Em múltiplos isolados de um mesmo paciente, embora comumente indistinguíveis por MLST, descreveram alguns eventos de diferenças causadas por perda parcial ou completa de heterosigose.

Chen et al. (2009), em Taiwan, avaliaram o padrão genético de 50 isolados de *C. tropicalis* de 14 pacientes por MLST e PFGE (com a enzima de restrição *NaeI*). Encontraram correlação, estatisticamente significativa ($P < 0.05$), entre os dois métodos. Na avaliação dos resultados da corrida eletroforética, nota-se a dificuldade de visualização das bandas no PFGE, sendo necessária utilização de correção computacional.

A caracterização molecular é essencial para o conhecimento das fontes e dos mecanismos que geraram aumento de incidência dessas infecções em alguns hospitais, não se podendo, ainda, indicar um método padrão-ouro para a tipagem molecular de *C. tropicalis*.

1.4. Resistência – Perfil de sensibilidade

As infecções fúngicas invasivas têm alta morbidade e mortalidade, e o uso precoce de antifúngicos de forma apropriada pode alterar o prognóstico.

As opções terapêuticas são caracterizadas pela toxicidade, interação medicamentosa e, muitas vezes, pelo alto custo. As drogas mais comumente utilizadas são: anfotericina B deoxicolato e suas formulações lipídicas, os azólicos (itraconazol, fluconazol, voriconazol) e as equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina). A emergência de resistência aos antifúngicos é atribuída ao seu uso prolongado, profilático e, algumas vezes, inapropriado.

Durante a última década, utilizou-se fluconazol como droga de primeira linha para o tratamento de candidíase. Espécies resistentes ao fluconazol começaram a ganhar importância e cepas de *C. albicans* e outras espécies de *Candida* como, *C. glabrata*, passaram a apresentar diminuição de sensibilidade. Em virtude disso, tornou-se necessário o conhecimento da sensibilidade aos antifúngicos, por meio de testes confiáveis e reprodutíveis, para garantir melhor assistência no tratamento das infecções por *Candida*, cujas manifestações clínicas variadas e a alta mortalidade exigem o uso precoce e correto de antifúngicos.

Os azólicos são fungistáticos e seu mecanismo de ação principal ocorre na biossíntese do ergosterol da membrana fúngica, através da inibição da enzima lanosterol-demetilase, sendo citocromo P450 dependente. A conversão de lanosterol em ergosterol é impedida, aumentando a permeabilidade e progressiva instabilidade da célula fúngica (Sanglard *et al.*, 2002).

Existe pouca informação disponível a respeito dos mecanismos moleculares de resistência de *C. tropicalis* aos azóis em comparação com bactérias. Avaliando-se as possíveis causas de resistência aos azólicos, pode-se citar o aumento da expressão de bombas de efluxo, por exemplo, os transportadores ABC e MSF, que estão relacionados a regulação do transporte e ao acúmulo intracelular de antifúngicos. Em *C. albicans*, a super expressão dos genes codificadores dos transportadores ABC, *cdr1* e *cdr2* e dos transportadores MSF (gene *mdr1*) podem estar relacionados à diminuição da sensibilidade (Mishra *et al.*, 2007).

Especificamente em *C. tropicalis*, Vandeputte *et al.* (2005) relataram, como mecanismo de resistência, o aumento da expressão do gene MDR1 (*CtMDR1*) e do gene *CtERG11*, com mutação no ponto A393T. A alteração na via biossintética do ergosterol é outro mecanismo associado à resistência (Mishra *et al.*, 2007). Adicionalmente, tem-se encontrado associação entre a produção de biofilme por algumas espécies de *Candida* e resistência aos antifúngicos (Bizerra *et al.*, 2008).

Na década de 90, na Holanda, Voss *et al.* (1996), em estudo retrospectivo, multicêntrico, de 1987 a 1995, mostraram que 94,6% de 671 infecções fúngicas foram causadas por *Candida* spp, sendo 60% dos episódios de candidemia causados por *C.*

albicans. Nesse estudo, os índices de candidemia por *C. albicans* com sensibilidade diminuída ao fluconazol aumentaram 4,7 vezes em 1995, comparado com um aumento de 2,8 vezes para outras espécies não *C. albicans*.

Em 1992, o documento M27-P publicado pelo NCCLS (“National Committee for Clinical Laboratory Standards”), atualmente, CLSI (“Clinical and Laboratory Standards Institute”), padronizou a realização de antifungograma para leveduras (*Candida* e *Cryptococcus neoformans*) e a definição dos pontos de corte apenas para *Candida spp.* e alguns antifúngicos.

Em 1995, foi publicado o documento M27-T, que estabeleceu faixas de referência de concentrações inibitórias mínimas CIM para duas cepas de controle de qualidade para os agentes antifúngicos e disponibilizou um método para o teste de microdiluição em caldo. Posteriormente, foram desenvolvidos pontos de corte relevantes para os agentes antifúngicos disponíveis, incluídos na Norma M27 - A (1997). Estabeleceram-se, então, faixas de referência das CIMs de 24 e 48 horas para os testes de microdiluição com agentes antifúngicos, resultando no documento M27 - A2. Em 2008, foi publicado o documento M27 - A3/S3, que padronizou algumas leituras para 24 horas e alterou os pontos de corte para voriconazol.

Os índices de resistência de *C. tropicalis* aos azólicos, segundo o método padronizado pelo CLSI, variam de 3 a 32%. Esta variação pode ser explicada pelo fenômeno de “trailing”, caracterizado por crescimento reduzido e persistente de alguns isolados de *Candida spp.* na presença de drogas fungistáticas. St-Germain et al. (2001) sugeriram que este fenômeno parece ser espécie específica para isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Analisando 764 isolados, encontraram 98% de “trailing” tanto para o fluconazol quanto para o itraconazol. Segundo Arthington-Skaggs et al. (2002), os índices de “trailing” nos isolados de *C. albicans* foram de 18,2% para fluconazol e de 16,3% para o itraconazol. Para *C. tropicalis*, o fenômeno ocorreu em 59,3% para fluconazol e 29,7% para itraconazol.

Os isolados com o fenômeno de “trailing” podem expressar o fenótipo conhecido como “low-high MIC”, onde as amostras são sensíveis após 24 horas de incubação (CIM de fluconazol $\leq 8\mu\text{g/mL}$), mas parecem ser resistentes após 48 horas (CIM de fluconazol

$\geq 64\mu\text{g/mL}$). Rex et al. (1998) mostraram que cobaias infectadas com cepas “low-high MIC” de *C. tropicalis* apresentavam resposta ao tratamento com o fluconazol de forma similar aos isolados suscetíveis.

O EUCAST (“European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing”) segundo Cuenca-Estrella et al., em 2002 e 2003, incorporou algumas modificações do documento M-27-A2 do CLSI, as quais incluem, a adição de glicose 2% no meio RPMI-1640 e uma maior quantidade de inóculo (10^5ufc/mL), permitindo menor tempo de incubação (24 horas) e sendo concordante com CLSI.

Sims et al. (2006) mostraram boa concordância entre E-teste e microdiluição, especialmente após 48h, para as espécies de *Candida*, exceto, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Esta última apresentou discordância devido ao fenômeno de “trailling”.

No Brasi, Da Matta et al. (2007) avaliaram isolados de *Candida* sp. obtidas de corrente sanguínea de pacientes internados em 4 hospitais terciários entre 1995 e 2003 em São Paulo, Brasil, quanto à sensibilidade por microdiluição, utilizando-se a metodologia do CLSI. Num total de 1000 isolados (400 cepas de *C. albicans* (40%), 243 de *C. tropicalis* (24,3%), 238 de *C. parapsilosis* (23,8%), 44 de *C. glabrata* (4,4%), 30 de *C. guilliermondii* (3%), e 25 de *C. rugosa* (2,5%), apenas 1,9% das cepas testadas foram SDD e 0,2% deles eram resistentes a fluconazol.

Espinel-Ingroff et al. (2009) avaliaram as CIMs obtidas por microdiluição para voriconazol, realizando-se leituras em 24h e 48h em 2162 isolados clínicos. Obtiveram, em leituras de 24h, porcentagens inadequadas, consideradas erro maior, para *C. albicans* (2,7%), *C. glabrata* (4,1%) e *C. tropicalis* (9,7%), ressaltando que 48h podem ser necessárias para determinação das CIMs.

A escolha dos melhores métodos para análise da sensibilidade aos antifúngicos deve também usar como referência a resposta *in vivo* dos pacientes à terapêutica (Clancy et al., 2006). No entanto, nem sempre é observada correlação entre provas *in vitro* e *in vivo* (Park et al., 2006).

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

1. Estabelecer comparação entre as técnicas de tipagem molecular em isolados de *C. tropicalis* a partir de candidemia em dois hospitais terciários;
2. Avaliar a sensibilidade de isolados de *C. tropicalis* ao fluconazol, itraconazol, anfotericina B e voriconazol;
3. Estabelecer correlação entre as características fenotípicas e genotípicas dos isolados.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o poder discriminatório das seguintes técnicas de tipagem molecular: RAPD, PFGE (com e sem enzima de restrição) e MLST em isolados de *C. tropicalis*;
2. Estudar a variabilidade genética de isolados múltiplos de um mesmo paciente de *C. tropicalis*;
3. Comparar os resultados do perfil de sensibilidade de *C. tropicalis* a antifúngicos pelo emprego de dois métodos padronizados CLSI e EUCAST.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1. Casuística

Foram estudados 61 isolados de *C. tropicalis* de 43 pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) de 1998-2000 e Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) de 2001 a 2003, com diagnóstico de infecção de corrente sanguínea.

Foram coletados, retrospectivamente, dados demográficos como idade, sexo, presença de comorbidades, data da hemocultura, uso de antifúngicos, uso de cateteres venosos e óbito de pacientes com fungemia hospitalar. Fungemia foi definida como infecção primária de corrente sanguínea, com base nos critérios de diagnóstico de infecção hospitalar do “Centers for Disease Control and Prevention”, tendo sido excluídos pacientes com hemocultura positiva nas primeiras 48 horas de internação por não compreender o critério de infecção hospitalar. Os dados de prontuários foram coletados por uma só pessoa que elaborou uma lista de orientação para a coleta uniforme de dados.

Todas as variáveis foram registradas durante o período que precedeu a hemocultura, desde o primeiro dia de internação até o dia da primeira hemocultura positiva para *C. tropicalis*, sendo o período posterior avaliado no sistema de vigilância. Foi considerada como “Breakthrough” fungemia, a candidemia que ocorreu durante a administração de agentes antifúngicos sistêmicos como profilaxia ou terapia por pelo menos sete dias consecutivos prévios à primeira hemocultura positiva (Kontoyannis et al., 2002).

As culturas do HCFMUSP isoladas de hemocultura foram mantidas na Divisão de Laboratório Central na Seção de Micologia, sendo identificadas por método automatizado BACTEC (Bactec 9240 System, Becton, Dickinson, USA), VITEC (bioMérieux, Nürtingen) e por assimilação de carbono, API20C (BioMérieux AS, Paris, France). Os isolados da UNICAMP foram identificados por método automatizado

VITEC e por método cromogênico CHROMagar *Candida* (Chromagar microbiology, Paris, France), sendo isoladas de corrente sanguínea e cateter, pareadas ou não.

Foram utilizadas cepas padrão ATCC 200956 de *C. tropicalis*, *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019). As leveduras foram mantidas em meio BHI glicerol a -80°C até o momento de uso.

3.2. Identificação

Com a finalidade de padronizar a identificação dos isolados e avaliar criteriosamente a presença de possível contaminação ou cultura mista, os isolados provenientes do HC-FMUSP e da UNICAMP foram reisolados e reidentificados no Laboratório de Investigação Médica (LIM-48) por dois métodos. Primeiramente, utilizou-se o método cromogênico comercial CHROMagar *Candida* (Chromagar microbiology, Paris, France), que contém 15 g de ágar, 10,2 g de peptona, 22 g de mistura cromogênica e 0,5 g de cloranfenicol, ao qual adicionou-se 1 L de água destilada. Após a preparação do meio cromogênico, foi inoculada uma amostra de cada levedura sobre a superfície de cada placa. Em seguida, foram incubadas a 37°C por 48 horas. A identificação da espécie da *Candida* foi realizada de acordo com o padrão de cor obtido na cultura.

A seguir, a identificação foi confirmada pelo teste de assimilação de carbono ID 32 C (BioMerieux AS, Paris, França). Após 24 e 48 horas de incubação, o resultado de crescimento da levedura em cada cúpula foi lido visualmente, comparando cada cúpula ao controle, considerando-se positivo de acordo com grau de turvamento da solução. As reações obtidas foram codificadas em um padrão numérico e comparadas a padrões de fungos já caracterizados, permitindo assim a identificação da espécie do fungo.

3.3. Caracterização Molecular

3.3.1 Quantificação

Foram utilizadas 10 alças da cultura de *C. tropicalis* cultivadas em meio ágar Sabouraud por 72 horas a 30 °C, diluídas em 10 mL de tampão salino fosfato. Após sedimentação, o sobrenadante foi recuperado e submetido ao processo de centrifugação e o precipitado lavado e suspenso em tampão salino fosfato.

A contagem foi realizada com o auxílio de microscópio óptico comum, utilizando-se câmara de Neubauer, observando-se variação de $2,6 - 4,59 \times 10^8$ células/mL.

3.3.2 Extração de DNA

Segundo Buchman *et al.* (1990), as amostras foram cultivadas em meio Sabouraud líquido (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom), em agitação por 48 horas à 30 °C. Em seguida, foram submetidas a duas etapas de lise: a primeira com Lyticase (Sigma-Aldrich, EUA) e tampão de lise composto por sorbitol e β mercaptoetanol e a segunda com proteinase K (Invitrogen, EUA). A purificação do DNA foi realizada com 1:1 (vol/vol) de fenol clorofórmio e a precipitação com acetato de sódio 3 M e 1 ml de etanol gelados. O DNA foi ressuspenso em 100 μ L de TE, em seguida, dosado e conservado a -20 °C até o momento do uso.

O DNA extraído foi utilizado para as técnicas de RAPD e amplificação dos fragmentos de genes utilizados na análise de MLST.

3.3.3 Dosagem de DNA

A dosagem de DNA foi realizada em espectrofotômetro Gene Quant (Pharmacia). O DNA extraído utilizado apresentou grau de pureza entre 95-100 % e razão DNA/proteína acima de 1,6 (1,85 em média). A quantidade de DNA recuperada foi de 0,1 a 9,8 μ g/ μ L. A dosagem de DNA, a razão DNA/proteína e o grau de pureza estão exemplificados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Distribuição dos resultados da extração de DNA dos 61 isolados de *C. tropicalis* obtidos de 43 pacientes com infecção de corrente sanguínea segundo o grau de pureza, razão DNA/proteína e concentração de DNA

Isolados	Pureza (%)	Razão DNA / proteína	DNA (µg/µL)
1a	104	1,89	1,20
1b	105	1,89	2,00
1c	107	1,93	4,60
2a	101	1,82	0,75
2b	102	1,85	0,45
3a	113	2,05	0,10
3b	103	1,86	0,65
4a	104	1,89	0,70
4b	100	1,82	0,20
5a	105	1,90	0,90
5b	104	1,89	1,30
6a	100	1,80	0,10
6b	104	1,89	0,95
6c	97	1,76	0,10
7a	109	1,98	0,60
7b	108	1,95	0,60
8a	114	2,06	0,75
8b	113	2,04	0,40
9a	104	1,89	0,90
9b	104	1,89	1,00
9c	96	1,73	0,10
10a	106	1,92	0,65
10b	116	2,10	0,30
11a	115	2,07	2,65
11b	97	1,76	0,20
12a	102	1,85	0,55
12b	110	2,00	0,35
12c	111	2,00	0,25
13a	104	1,88	1,05
13b	111	2,01	0,70
14a	108	1,95	0,45
14b	115	2,08	0,90
15	101	1,83	3,20
16	95	1,72	1,10
17	112	2,02	4,20
18	99	1,80	1,90
19	99	1,79	1,30
20	101	1,82	2,00
21	115	2,08	5,40
22	98	1,69	4,90
23	99	1,79	0,80
24	101	1,83	0,90
25	112	2,02	4,60
26	115	2,08	9,80
27	102	1,84	0,25
28	99	1,79	2,00
29	97	1,76	1,05
30	100	1,81	1,75
31	100	1,81	2,05
32	100	1,81	1,40
33	97	1,76	0,25
34	95	1,68	0,25
35	99	1,80	1,60
36	95	1,67	1,30
37	96	1,74	0,90
38	98	1,77	1,35
39	98	1,78	1,65
40	102	1,85	1,10
41	102	1,84	0,60
42	105	1,90	0,95
43	103	1,87	0,50

NOTA: A dosagem de DNA foi realizada em espectrofotômetro Gene Quant (Pharmacia).

3.3.4 Reação de Amplificação ao acaso do DNA polimórfico (RAPD)

Na reação de amplificação, foram adicionados em tubos de microcentrífuga os tampões para padronização inicial (Gibco, Pharmacia, Fermentas, Biotools, Labtrade, Eppendorf), deoxonucleosídeos trifosfatos (dNTP) mix, MgCl₂ e Taq DNA polimerase. Foram testados pelo menos 12 oligonucleotídeos iniciadores contendo 30-50% de guanina e citosina, com 10 pb, descritos segundo Lin *et al.* (1995) e Vrioni *et al.* (2001). Utilizou-se também iniciadores de 22 pb (CT1 e CT2, separadamente), que classicamente amplificam a região conservada da região interna transcrita ribossomal (ITS 1 e ITS 4) na tentativa de melhorar a especificidade (Lindsay *et al.*, 2001). Os tubos contendo 5×10^{-8} g de DNA, foram colocados no aparelho termociclador (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA).

As condições da reação de PCR foram padronizadas para se obter um resultado confiável e reprodutível. Inicialmente, utilizaram-se iniciadores aleatórios em várias temperaturas de hibridização de 32 °C a 38 °C de modo que apresentasse o menor número de bandas claras e acima de 1031 pb que tornam a interpretação difícil e a reprodutibilidade baixa. As condições do termociclador foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, 45 ciclos de 94 °C por 1 min, hibridização a 32-38 °C por 1 min, 72 °C por 2 min e extensão final por 7 min a 72 °C. A análise dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose corada com brometo de etídeo (Promega, EUA) a 2,0%, 80 V durante 2 horas.

Para assegurar a reprodutibilidade dos resultados, as reações foram repetidas pelo menos duas vezes em tempos distintos muitas vezes por profissionais distintos. Tomou-se cuidado na padronização da reação para garantir que os oligonucleotídeos iniciadores selecionados tivessem a capacidade de discriminar interespecies.

Para análise dos isolados foi empregada, inicialmente, avaliação visual do número de bandas e posteriormente calculados os coeficientes de similaridade. Foram desconsideradas as bandas claras e pouco reprodutíveis e aquelas acima de 1031pb.

As diferenças gênicas entre os isolados foram calculadas pelos coeficientes de similaridade de Jaccard ou Dice e agrupadas utilizando os métodos UPGMA

(“Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic averages”) e agrupamento de vizinhos (“neighbor-joining”). O cálculo do poder discriminatório foi através do index discriminatório individual proposto por Simpson (Hunter and Fraser, 1989).

3.3.5 Eletroforese em Campo Pulsátil

Os isolados de *C. tropicalis* foram cultivados em caldo YEPD (Yeast Extract 1%, Peptone 2% e Dextrose 2%). Em seguida as células foram recuperadas por centrifugação e submetidas a várias lavagens com tampão EDTA. Em uma alíquota da suspensão, foram adicionados “Lyticase” (Sigma-Aldrich, EUA) e agarose de baixo ponto de fusão a 2%. Após incubação, foram adicionados tampão Tris, EDTA, e SDS 10% e proteinase K (Invitrogen, EUA). Após lavagens com Tris-HCl/EDTA, o material foi incubado overnight a 5 °C.

A reação de PFGE foi padronizada com as enzimas *SfiI*, *NaeI* (*PdiI*), *NaeI* (*PdiI*) FastDigest, *BssHII*, *SmaI* e *SmaI* FastDigest, visando comparar as diferentes características e selecionando-se as mais indicadas para a análise da variabilidade genética (Chou et al., 2007).

A enzima *SfiI* foi testada nas concentrações de 10-20 U/amostra, obtendo-se maior corte com 20 U/amostra. A enzima *NaeI* foi testada nas concentrações de 10 U, 15 U e 20 U por bloco de DNA. Os isolados foram testados com diferentes volumes de enzima de restrição *NaeI* (*PdiI*) FastDigest e *SmaI* FastDigest, sendo estes: 1 µL (conforme orientação do fabricante), 1,5 µL, 2,0 µL, 2,5 µL, 5,0 µL e 10 µL. A enzima *BssHII* foi padronizada com 4 U/µL.

A análise dos produtos foi feita através de eletroforese em campo pulsátil no sistema “Counter-clamped Homogenous Electric Field” (CHEF DRIII- Bio Rad Laboratories) com pulso inicial e final e tempo de corrida variável conforme a enzima de restrição utilizada.

A programação do aparelho para a cariotipagem sem enzima de restrição foi padronizada com pulso inicial de 120 s e final 280 s, 4,5 V e tempo de corrida de 48 horas. Para a enzima *SfiI* utilizou-se pulso inicial de 5 s e final de 90 s a 6 V com tempo

de corrida de 26 horas. Para as enzimas *NaeI* (*PdiI*) e *NaeI* (*PdiI*) FastDigest (10U/ μ L) o pulso inicial foi de 6 s e o final foi de 50 s a 6 V com tempo de corrida de 23 horas. Para a enzima *BssHII* (4 U/ μ L), utilizou-se pulso inicial de 5 s e final de 50 s a 6 V com tempo de corrida de 24 horas e para as enzimas *SmaI* e *SmaI* FastDigest (10 U/ μ L) o pulso inicial foi de 5 s e o final de 50 s a 6 V com tempo de corrida de 22 horas.

Para a corrida eletroforética utilizou-se gel de Agarose a 1,2% “low melting” corado com brometo de etídeo (Promega, EUA) em tampão TBE 0,5X. Esta técnica foi realizada no Laboratório de Investigação Médica de Bacteriologia – LIM 54 do HCFMUSP sob responsabilidade da Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa.

Para a interpretação dos resultados dos géis com a enzima de restrição foi necessário marcar as bandas com o auxílio de programas computacionais (Alphaease FC, Inotech e Adobe Photoshop), sendo possível a marcação de presença das bandas e mudança no padrão de brilho/contraste dos géis.

As diferenças gênicas entre os isolados foram calculadas pelos coeficientes de similaridade de Jaccard e Dice e agrupadas utilizando o método UPGMA e o agrupamento de vizinhos. O cálculo do poder discriminatório foi através do index discriminatório individual proposto por Simpson (Hunter and Fraser, 1989).

3.3.6 MLST

O método de MLST (Tavanti et al., 2005) obedeceu as seguintes etapas de execução:

3.3.6.1 Reação de PCR, Purificação e dosagem dos fragmentos dos seis genes selecionados para MLST

As características dos genes estudados e os tamanhos dos produtos da PCR esperados estão dispostos na **Tabela 2**, mostrando que os fragmentos de DNA amplificado variam de 479 – 737 pb e todos os seis genes apresentam um produto proteico conhecido.

Após a extração de DNA em 50 µL de reação contendo 100 ng de DNA, *Pfu* DNA polimerase (Promega, Madison, WI, EUA), tampão, deoxonucleosídeo trifosfatos (dNTP) e os oligonucleotídeos iniciadores “forward” e “reverse” dos fragmentos de genes *ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*, foi padronizada para um resultado confiável com banda única e nítida. Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de agarose para todas as amostras para determinação do tamanho das bandas e avaliação da qualidade do material amplificado através da obtenção de banda única. Após avaliação da intensidade das bandas, as amostras foram selecionadas para a purificação.

A purificação foi realizada com o Kit comercial “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Health care Life Sciences, UK) e a dosagem com o kit comercial “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para a concentração de 10 - 20 ng/µL. Quando se recuperou pequena concentração de DNA houve a necessidade de realizar mais de uma reação por amostra para atingir a concentração necessária para a reação de sequenciamento.

A reação de sequenciamentos foi realizada em duplicata nos 366 fragmentos dos seis fragmentos de genes amplificados purificados e dosados (10-20 ng/µL) em “forward” e “reverse” totalizando 1 464 sequências. O tamanho dos fragmentos de DNA, obtidos para cada um dos seis genes estudados, variou entre 370 pb e 525 pb, resultando em 2 677 nucleotídeos para cada isolado, constituindo num total de 163 297 nucleotídeos finais.

Tabela 2 - Características dos fragmentos dos genes utilizados na reação de MLST

Fragmento do gene	Produto Gênico	Gene Bank n	Amplicon (pb)	Fragmento sequenciado (pb)
<i>ICL1</i>	Isocitrato ligase	D00703	737	447
<i>MDR1</i>	Proteína multidroga resistente	AF194419	663	425
<i>SAPT2</i>	Protease Aspartato 2	AF115320	658	525
<i>SAPT4</i>	Protease Aspartato 4	AF115322	483	390
<i>XYR1</i>	D-xilose redutase I ou II	AB002105	479	370
<i>ZWF1a</i>	G6PD		647	520

FONTE: Tabela modificada de Tavanti et al. (2005), evidenciando as características dos fragmentos dos genes selecionados para MLST.

3.3.6.2 Seqüenciamento e avaliação dos cromatogramas em busca de heterozigose

Os fragmentos foram sequenciados em duplicata no sequenciador automatizado DNA ABI 3500 (Applied Biosystems) em ambas as orientações “forward” e “reverse”, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de PCR originais e o “BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit” v3.1 (Applied Biosystems, EUA) de acordo com as orientações do fabricante. A qualidade de cada cromatograma foi avaliada utilizando o software Phred-Phrap (Ewing et al., 1998a; Ewing et al., 1998b) e as seqüências consenso foram obtidas utilizando o programa CAP3, que esta disponível no endereço eletrônico da web (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>).

Os cromatogramas foram cuidadosamente examinados visualmente em busca de heterozigose. Posteriormente, os polimorfismos dos seis fragmentos de genes sequenciados foram concatenados em uma única seqüência, conforme descrito anteriormente por Tavanti et al. (2005). O alinhamento foi realizado cuidadosamente com o auxílio dos programas disponíveis na rede: Bioedit

(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>) e MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011). Posteriormente, todas as sequências foram comparadas a outras similares do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/tbl2asn2/>) e submetidas ao endereço <http://pubmlst.org/ctropicalis/> oficial do MLST *C. Tropicalis* Database (Jolley et al, 2004).

3.3.6.3 Pesquisa e inserção dos alelos e DSTs no endereço oficial MLST *C. tropicalis*

As sequências de cada fragmento de gene foram inseridas no endereço oficial: (<http://pubmlst.org/ctropicalis/>) obedecendo as seguintes etapas:

- 1- Avaliação e comparação de uma sequência de cada fragmento de gene por vez, de cada isolado, em busca dos alelos/genótipos já existentes no banco de dados. Quando já existentes, o programa ofereceu um número que corresponde ao determinado alelo. Quando se trataram de novos alelos, após a inclusão dos alelos no banco de dados, foi fornecida a porcentagem de homologia e o ponto exato onde ocorreu o polimorfismo. Uma vez criteriosamente avaliados, os polimorfismos encontrados foram confirmados em busca de eventual erro. Por exemplo, para o isolado 1a no fragmento de gene *XYRI*, o alelo encontrado é muito próximo ao alelo 53 com 99,73% de identidade, apresentando Y ao invés de C. Os novos alelos/genótipos encontrados foram submetidos ao banco de dados oficial através do envio das sequências e cromatogramas e posterior aprovação pelo curador.
- 2- Em seguida os alelos/genótipos de cada fragmento de gene foram combinados gerando um número que corresponde as DSTs. As novas DSTs foram submetidas ao curador do banco de dados *C. tropicalis* MLST.

3.3.6.4 Análise haplótipa

Os polimorfismos foram selecionados e separados. Em seguida, foi realizada a análise haplótipa, sendo cada base reescrita em duplicata para A, C, G ou T se homozigótica, ou como duas bases que constituem as letras K, M, R, S, W ou Y normatizadas pela IUPAC – “International Union of Pure and Applied Chemistry”, quando ocorreu heterozigose. A heterozigose foi definida pela presença de picos coincidentes nos cromatogramas (Tavanti et al., 2005 e Odds et al., 2007).

Para cada SNP, como se trata de organismo diplóide, as possibilidades possíveis são homozigóticos ou heterozigóticos, iguais ou diferentes, conforme os picos visualizados nas sequências (“forward” e “reverse”). Por exemplo, em relação a uma sequência hipotética **T****K****T****C****A****Y****R****S****W****G****M**, a conversão para a forma haplótipa seria **TT**(**GT**)**TTCCAA**(**CT**)(**AG**) (**CG**) (**AT**)**GG**(**AC**).

Após a identificação dos SNPs, os polimorfismos dos seis fragmentos de genes sequenciados foram concatenados formando uma sequência única/simples a ser comparada com as demais.

3.3.6.5 Análise filogenética

A análise filogenética foi obtida através da comparação dos seguintes métodos de agrupamento: UPGMA, agrupamento de vizinhos, máxima parcimônia, inferência Bayesiana e máxima verossimilhança. As árvores filogenéticas não enraizadas foram geradas através da inserção das sequências nos seguintes programas: MEGA 5.0, Mr. Bayes 3.2.1 (<http://mrbayes.sourceforge.net/download.php>) e BEAST software 1.7.2 que foi utilizado em conjunto com um pacote de programas (BEAST, BEAUti, LogCombiner, TreeLogAnalyser, Tracer e FigTree), encontrados e obtidos sem custo, no endereço da web (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Programs>). As árvores filogenéticas não enraizadas com valores de “bootstrap” > 1000 réplicas foram comparadas e posteriormente foram escolhidas aquelas com maior capacidade de discriminação e agrupamento.

Foram utilizadas as sequências concatenadas dos fragmentos dos seis genes excluindo-se a heterozigose, com a finalidade de estabelecer comparação e estimar o poder da heterozigose no agrupamento.

Em seguida, realizou-se a análise filogenética dos polimorfismos das sequências dos seis fragmentos de genes individualmente em sua forma haplótipa e a análise das sequências concatenadas na forma haplótipa dos seis fragmentos de genes. Por último, realizou-se a análise de todas as 267 sequências das DSTs descritas no endereço oficial do MLST cedidas para análise. Os clados foram numerados para serem consistentes com pelo menos 70% de “bootstrap”. O cálculo do poder discriminatório foi através do index discriminatório individual proposto por Simpson (Hunter and Fraser, 1989).

3.3.6.6 Análise de ancestralidade

A relação de ancestralidade entre os isolados foi estudada através de “eBURST package” (<http://eburst.mlst.net/>).

3.4 Perfil de sensibilidade a antifúngicos

As soluções-mãe dos antifúngicos, as placas e o inóculo foram preparados de acordo com as normas descritas nos documentos M27-A2, M27-A3/S3 CLSI e EUCAST, 2002.

Os antifúngicos foram distribuídos em placas, de modo que cada coluna (1-12) com oito fileiras (A-H) recebesse uma concentração de antifúngico, partindo da menor diluição para a maior. Reservou-se a primeira coluna para o controle negativo e a última para o controle positivo.

O inóculo foi preparado utilizando-se amostra de levedura com repique de 24 horas em ágar Sabouraud incubadas a 35 °C. A seguir, as leveduras foram introduzidas em 5 mL de solução fisiológica 0,9% atingindo a escala 0,5 de McFarland, com auxílio de espectrofotômetro. A diluição, segundo CLSI, foi de 100 µL do inóculo para o tubo correspondente da amostra contendo 4,9 mL de meio RPMI, obtendo-se diluição 1/50. Posteriormente, 500 µL foram adicionados a 9,5 mL de meio RPMI obtendo-se diluição

1/20. No EUCAST, adicionou-se 1000 µL do inóculo em 09 mL de meio RPMI, obtendo-se diluição 1/10. As amostras foram plaqueadas para cada antifúngico.

A leitura dos resultados foi realizada visualmente em espectrofotômetro (Versa Max Tunable Microplates Reader), com comprimento de onda de 530 nm, comparando-se o controle positivo com o crescimento dos poços com antifúngicos diluídos.

Os valores de CIM (concentração inibitória mínima) para anfotericina B foram definidos pela menor concentração de droga que impediu qualquer grau de crescimento (100%) para o CLSI e 90% para o EUCAST. Para os azóis os valores de CIM foram definidos pela menor concentração de droga na qual se observa inibição de 50% ou mais de crescimento.

Os pontos de corte foram definidos de acordo com a padronização estabelecida pelo documento M27-A3/S3 do CLSI e pelo EUCAST v3.0 (27/04/2011) para *C. tropicalis*. As amostras que apresentaram dúvida entre o fenômeno de “trailing” e resistência ao fluconazol foram repetidas utilizando-se RPMI com pH igual a 5,0. Todos os resultados foram repetidos pelo menos duas vezes. Não foi realizado antifungigrama para fluconazol pH igual a 5,0 para o método EUCAST.

3.5. Aprovação pelo Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq 19/02/2003 - No. 1007/02). O trabalho foi realizado através de estudo de isolados e análise retrospectiva de prontuário.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Características Demográficas dos pacientes

Foram estudados 61 isolados de *C. tropicalis* sendo 44 isolados da UNICAMP e 17 do HCFMUSP obtidos de amostras clínicas (sangue e/ou ponta de cateter venoso central) de 43 pacientes. A descrição das características demográficas dos isolados pode ser observada na **Tabela 3**. Em azul estão representados os isolados da UNICAMP (1-26) e em verde, os pacientes do HCFMUSP (27 - 43). Os pacientes em azul claro 1 - 14 possuem mais de um isolado por paciente. Dos 43 pacientes estudados, 28 eram adultos e 15 tinham idade inferior a 18 anos. A faixa etária variou entre 9 meses e 75 anos, com a média de 37 anos.

Do total de isolados, 48 são de hemocultura e 13 de ponta de cateter. Foram incluídos 09 pacientes (1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 13 e 14) que apresentaram culturas positivas pareadas em sangue e ponta de cateter venoso central e 05 pacientes com mais de uma hemocultura positiva sem cultura de cateter. O intervalo de positividade entre as culturas pareadas foi de 0 a 12 dias com mediana de 6 dias. Os isolados 17, 19, 20 e 26 são exclusivamente de ponta de cateter sem positividade em hemocultura.

As principais unidades em que os pacientes foram internados no momento do diagnóstico de candidemia foram: pediatria (23%), unidade de terapia intensiva de adultos e pediatria (18%), unidade de cirurgia gastrointestinal (14,75%), cirurgia do trauma (8,2%), neurologia e neurocirurgia (8,2%), pronto socorro (6,6%), gastroclínica (6,6%) entre outras. Não foi possível caracterizar surto porque não foram obtidos isolados da mesma unidade, no mesmo período de tempo.

Tabela 3 - Distribuição de 61 isolados de *C. tropicalis* a partir de 43 pacientes com diagnóstico de infecção de corrente sanguínea de acordo com a idade, hospital de origem, material biológico, data da hemocultura positiva e local de isolamento

Pacientes/Idade	Isolados	Hospital	Material	Data	Enfermaria
1/44a	1a	UNICAMP	Sangue	24/03/03	UTI geral
	1b	UNICAMP	Sangue	28/03/03	UTI geral
	1c	UNICAMP	Cateter	31/03/03	UTI geral
2/74a	2a	UNICAMP	Cateter	25/07/02	Gastrocirurgia
	2b	UNICAMP	Sangue	30/07/02	Gastrocirurgia
3/9a	3a	UNICAMP	Sangue	25/06/02	Pediatria
	3b	UNICAMP	Cateter	25/06/02	Pediatria
4/9m	4a	UNICAMP	Cateter	21/04/03	UTI pediátrica
	4b	UNICAMP	Sangue	21/04/03	UTI pediátrica
5/71a	5a	UNICAMP	Sangue	13/07/02	Cirurgia de trauma
	5b	UNICAMP	Sangue	24/07/02	Pronto Socorro
6/2a	6a	UNICAMP	Sangue	17/06/02	Pediatria
	6b	UNICAMP	Cateter	17/06/02	Pediatria
	6c	UNICAMP	Sangue	17/06/02	Pediatria
7/2a	7a	UNICAMP	Sangue	02/09/02	Pediatria
	7b	UNICAMP	Sangue	08/09/02	Pediatria
8/65a	8a	UNICAMP	Sangue	08/09/01	Gastroclínica
	8b	UNICAMP	Cateter	10/09/01	Gastroclínica
9/36a	9a	UNICAMP	Cateter	15/01/00	Neurocirurgia
	9b	UNICAMP	Sangue	15/01/00	Neurocirurgia
	9c	UNICAMP	Sangue	17/01/00	Neurologia
10/44a	10a	UNICAMP	Sangue	15/12/02	Gastrocirurgia
	10b	UNICAMP	Sangue	22/12/02	Gastroclínica
11/9a	11a	UNICAMP	Sangue	12/09/01	UTI pediátrica
	11b	UNICAMP	Sangue	24/09/02	Pediatria
	12a	UNICAMP	Sangue	28/10/02	Clínica Médica
12/58a	12b	UNICAMP	Sangue	31/10/02	Gastrocirurgia
	12c	UNICAMP	Sangue	31/10/02	Gastrocirurgia
	13a	UNICAMP	Sangue	14/10/02	Gastroclínica
13/64a	13b	UNICAMP	Cateter	17/10/02	Gastrocirurgia
	14a	UNICAMP	Sangue	03/01/01	Cirurgia de trauma
14/3a	14b	UNICAMP	Cateter	03/01/01	Cirurgia de trauma
15/69a	15	UNICAMP	Sangue	11/01/01	UTI
16/11m	16	UNICAMP	Sangue	13/02/01	Pediatria
17/70a	17	UNICAMP	Cateter	04/02/02	Pneumologia
18/25a	18	UNICAMP	Sangue	05/02/02	Oncologia
19/72a	19	UNICAMP	Cateter	19/02/02	Hemodíalise
20/1a	20	UNICAMP	Cateter	19/05/02	Gastrocirurgia
21/9a	21	UNICAMP	Sangue	25/06/02	Pediatria
22/27a	22	UNICAMP	Sangue	05/08/02	Neurologia / UTI
23/65a	23	UNICAMP	Sangue	25/09/02	Pronto Socorro
24/17a	24	UNICAMP	Sangue	14/12/02	Cirurgia de trauma
25/62a	25	UNICAMP	Sangue	04/03/03	Cirurgia de trauma
26/72a	26	UNICAMP	Cateter	28/03/03	Gastrocirurgia
27/65a	27	FMUSP	Sangue	30/03/01	Pronto Socorro da cirurgia
28/5a	28	FMUSP	Sangue	01/02/01	Pediatria
29/32a	29	FMUSP	Sangue	04/07/99	UTI de Infectologia
30/66a	30	FMUSP	Sangue	06/03/01	Pronto socorro
31/70a	31	FMUSP	Sangue	18/01/00	Cirurgia vascular
32/40a	32	FMUSP	Sangue	16/04/01	Neurologia
33/16a	33	FMUSP	Sangue	29/01/99	Hematologia
34/15a	34	FMUSP	Sangue	07/04/98	Pediatria
35/40a	35	FMUSP	Sangue	11/12/99	Unidade de queimados
36/2a	36	FMUSP	Sangue	14/09/00	Pediatria
37/18a	37	FMUSP	Sangue	24/09/01	Pediatria
38/23a	38	FMUSP	Sangue	12/03/98	Hematologia
39/28a	39	FMUSP	Sangue	03/04/01	Cirurgia geral
40/70a	40	FMUSP	Sangue	17/03/00	Unidade de queimados
41/75a	41	FMUSP	Sangue	29/07/98	UTI de nefrologia
42/30a	42	FMUSP	Sangue	20/10/98	Pronto socorro
43/15a	43	FMUSP	Sangue	18/04/01	Ginecologia

FONTE: HCFMUSP e UNICAMP

NOTA: Em azul, estão representados os isolados da UNICAMP, sendo em azul claro os pacientes com mais de um isolado e azul escuro, os com um único isolado de sangue ou cateter. Em verde estão representados os isolados do HCFMUSP

4.2. Caracterização Molecular

4.2.1. Análise por RAPD dos isolados de *C. tropicalis*

Os três oligonucleotídeos iniciadores selecionados (P1, P2 e P3) foram capazes de detectar diferenças entre as espécies de *Candida* e foram os mais reprodutíveis. Os oligonucleotídeos iniciadores P1 e P2 amplificaram 13 bandas diferentes e o P3, 11 bandas. Nas **Figuras 1 e 2** estão os resultados da reação de RAPD com os iniciadores P1, P2, e P3, de até 10 pb. Os iniciadores de 22 pb apresentaram menor capacidade de discriminação, portanto foram excluídos da análise.

A distribuição quanto à similaridade dos padrões de banda amplificados de 32 isolados sequenciais de um mesmo paciente estão representados na **Tabela 4**, destacando-se diferenças entre os isolados. Observou-se que mais de 50% dos pacientes apresentaram padrões com diferença de mais de uma banda. Essa observação também foi variável em função dos iniciadores utilizados. Destacam-se os isolados dos pacientes 3, 6a6b em relação ao 6c, 7 e 11 que foram diferentes pelos três iniciadores testados.

Os padrões amplificados dos isolados únicos da UNICAMP (isolados 15 a 26) e HCFUSP (isolados 27 a 43), representados na **Figura 2 e na Tabela 5**, apresentam padrões de bandas muito próximos. Destaca-se o isolado 35 (HCFMUSP) que apresentou diferença em mais de uma banda nos três oligonucleotídeos iniciadores.

O uso dessa técnica “in house” na rotina foi muito sensível à mudança de lote dos reagentes, tempo de trabalho em bancada e a variação de temperatura do termociclador, sendo necessárias padronizações de todas as variáveis e teste de reagentes de múltiplas origens para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

Tabela 4: Distribuição de 32 isolados de *C. tropicalis* a partir de 14 pacientes com diagnóstico de infecção corrente sanguínea, quanto à similaridade dos padrões de banda gerados pelo RAPD utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores P1, P2, e P3

Pacientes	Isolados	Padrões de bandas		
		Idênticos	Diferentes	Semelhantes
	1a vs 1c vs 1b			
1	1a vs 1c	P1, P2, P3		
	1a vs 1b		P2, P3	P1
	1b vs 1c		P2, P3	P1
2	2a vs 2b	P3	P1, P2	
3	3a vs 3b		P1, P2, P3	
4	4a vs 4b	P1, P2, P3		
5	5a vs 5b	P2, P3	P1	
	6a vs 6b vs 6c			
6	6a vs 6b	P1, P2, P3		
	6a vs 6c		P1, P2, P3	
	6b vs 6c		P1, P2, P3	
7	7a vs 7b		P1, P2, P3	
8	8a vs 8b	P1, P2		P3
9	9a vs 9b vs 9c	P1, P2, P3		
10	10a vs 10b	P2, P3	P1	
11	11a vs 11b		P1, P2, P3	
	12a vs 12b vs 12c	P2, P3		
12	12a vs 12b	P1		
	12a vs 12c	P2, P3		P1
	12b vs 12c	P2, P3		P1
13	13a vs 13b	P3	P2	P1
14	14a vs 14b	P1, P3		P2

NOTA: Padrões idênticos: Todas as bandas coincidem; Padrões semelhantes: diferença em somente 01 banda; Padrões diferentes: diferença maior ou igual a 02 bandas

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados dos isolados múltiplos/sequenciais de *C. tropicalis* por RAPD com os iniciadores P1, P2 e P3. A coluna “0” corresponde a cepa ATCC de *C. tropicalis*. A coluna PM corresponde ao padrão de peso molecular. As amostras do mesmo paciente estão dispostas lado a lado. O paciente de número 1 apresentou o isolado de número 1b com padrão diferente das demais nos três oligonucleotídeos iniciadores selecionados. O mesmo ocorre para os pacientes 3, 6, 7 e 11.

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados dos isolados únicos da UNICAMP (isolados 15 a 26) e do Hospital das Clínicas da FMUSP (isolados 27 a 43) submetidos a reação de RAPD (com os iniciadores P1, P2 e P3). A coluna “0” corresponde a cepa ATCC de *C. tropicalis*. P2 e P3.

Tabela 5: Distribuição dos resultados dos padrões de agrupamento dos 29 isolados únicos de pacientes do HCFMUSP e UNICAMP com fungemia por *C. tropicalis*, gerados pelo RAPD utilizando-se os iniciadores P1, P2 e P3

RAPD	P1	P2	P3
	<u>35</u>	<u>35</u>	<u>35</u>
16, 18, 27 a 29, 32 a 39, 41 a 43	15 a 24, 27 a 32, 33, 36 a 43	15, 16, 18, 27, 28	20, 21
15, 20 a 24	25	26	30, 32, 33, 36 a 43
26, 30	25	34	25
31, 34, 40	17		26
19			24, 31
			34
			29
			22
			17
			19, 23
Total	8	5	12

NOTA: As amostras sublinhadas correspondem aos isolados dos pacientes do HCFMUSP e as demais aos da UNICAMP

A análise filogenética pelo método de agrupamento UPGMA dos isolados sequenciais de *C. tropicalis* de um mesmo paciente da UNICAMP submetidos à reação de RAPD, está representada na **Figura 3**, destacando-se a distância entre os isolados dos pacientes 1, 3, 6, 7 e 11. Esses resultados foram equivalentes para os três iniciadores.

Analisando-se os dendrogramas formados pelos diferentes iniciadores (P1, P2 e P3), pode-se notar que P1 e P2 mostraram maior capacidade de discriminação e agrupamento entre os isolados. O iniciador P3 apresentou a menor capacidade de agrupamento formando um grande grupo destacado em azul na **Figura 3**. Com relação aos isolados do paciente 8, o iniciador P3 detectou diferença em 1 banda entre os isolados 8a vs. 8b.

As análises filogenéticas dos 29 isolados únicos de *C. tropicalis* (17 HCFMUSP e 12 UNICAMP) estão representadas na **Figura 4**. O perfil observado nas amostras do HCFMUSP apresentou um padrão similar de bandas entre os isolados, da mesma forma que o padrão apresentado pela maioria das amostras UNICAMP. Estabelecendo-se relação entre os padrões formados pelo RAPD e as clínicas de origem dos pacientes com candidemia, não se sugere uma origem comum pelo RAPD.

Para os isolados únicos da UNICAMP e HCFMUSP, os iniciadores P1 e P3 identificaram um maior número de padrões/classes que o iniciador P2, diferentemente em relação aos isolados múltiplos de um mesmo paciente. Tal fato mostra que o poder discriminatório depende não apenas de uma seleção criteriosa dos iniciadores e sua padronização, mas também dos isolados estudados.

Figura 3: Comparação entre os dendrogramas gerados por UPGMA dos produtos amplificados dos isolados múltiplos de *C. tropicalis* da UNICAMP com marcador molecular RAPD (P1, P2 e P3). Em azul, estão representados comparativamente o maior grupo formado pelo P3 com o P1 e P2, evidenciando a menor capacidade de discriminação para o P3. As flechas em vermelho estão destacando os isolados, 3b, 7a.

Figura 4: Os dendrogramas indicam a similaridade entre os isolados únicos de *C. tropicalis* do HCFMUSP (verde) e da UNICAMP (preto) através da análise por RAPD com os oligonucleotídeos iniciadores P1, P2 e P3. Os grupos foram definidos por UPGMA e as matrizes geradas pelo coeficiente de similaridade de Dice. Em laranja, está representada a cepa de referência ATCC e destacados em verde, estão os isolados do HCFMUSP.

4.2.2. PFGE com as enzimas de restrição *SfiI*, *NaeI (PdiI)*, *NaeI (PdiI)* FastDigest, *BssHII*, *SmaI* e *SmaI* FastDigest

A técnica de PFGE (sem enzima de restrição) apresentou baixo poder discriminatório, reforçando a necessidade de corte com enzima de restrição para comparar os polimorfismos no DNA cromossomal e extracromossomal dos isolados.

Os resultados de PFGE com as enzimas *NaeI (PdiI)* e *SmaI* apresentaram uma grande quantidade de bandas de difícil leitura, mesmo após várias tentativas de padronização, tornando impossível a comparação entre os isolados. A **Figura 5** mostra alguns resultados do corte enzimático com a *NaeI (PdiI)*.

As enzimas *SmaI* FastDigest e *NaeI (PdiI)* FastDigest não funcionaram conforme o protocolo do fabricante, mesmo após várias tentativas de padronização (mudança de concentração das enzimas e tempo de corte).

Utilizando-se a enzima *SfiI*, foram obtidos padrões de corte para todos os isolados ampliando muito pouco os resultados da cariotipagem sem enzima de restrição, com baixa capacidade de discriminação. No total, foram obtidos quatro padrões de corrida eletroforética após o corte enzimático. Os coeficientes de similaridade entre os isolados, calculados pelo coeficiente de Dice, variaram de 84,21 a 100%; sendo na maioria dos isolados acima de 94,74%. A **Figura 6** mostra os resultados da corrida eletroforética em campo pulsátil das cepas de *C. tropicalis* com a utilização da enzima de restrição *SfiI*.

O PFGE com *SfiI* gerou dois grandes agrupamentos na análise dos isolados dos dois hospitais de ensino, tendo as amostras do HCFMUSP se concentrado em um dos agrupamentos na árvore filogenética junto com algumas amostras da UNICAMP. Entre os isolados múltiplos de um mesmo paciente, destacam-se os isolados dos pacientes 5, 6, 7, 14 que apresentaram padrões diferentes entre seus pares (**Figura 8**).

Empregando PFGE com a enzima de restrição *BssHII*, observou-se um maior poder discriminatório, especialmente entre os isolados dos pacientes da UNICAMP. Os resultados da corrida eletroforética em campo pulsátil das cepas de *C. tropicalis* estão dispostos na **Figura 7**. A corrida eletroforética mostrou um maior número de bandas e

padrões (19) que a *SFII* (04). Os isolados do HCFMUSP mantiveram-se agrupados, à exceção das amostras dos pacientes 27, 28 e 29 (**Figura 8**). Entre os isolados múltiplos de um mesmo paciente, destacam-se as amostras pareadas dos pacientes 1, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, que apresentaram padrões diferentes entre os pares. Os isolados 1a vs 1b vs 1c, 4a vs 4b, 7a vs 7b e 10a vs 10b estão muito próximos no dendrograma entre seus pares, sugerindo maior proximidade genética. Em relação a *SFII*, observaram-se as mesmas diferenças entre os isolados 5, 6 e 7, com exceção ao 14.

As principais dificuldades encontradas no PFGE com a utilização de enzima de restrição foram: 1- Escolha da enzima a ser utilizada; 2- Padronização do corte enzimático; 3- Interpretação dos géis pela quantidade e intensidade das bandas.

Figura 5: Resultado da corrida eletroforética em campo pulsátil do DNA extraído dos isolados de *C. tropicalis* com a utilização da enzima de restrição *NaeI*. O primeiro gel corresponde aos isolados da UNICAMP e o segundo aos do HCFMUSP. O padrão de peso molecular *S. cerevisiae* está disposto na primeira coluna e a última coluna 0 corresponde a cepa ATCC de *C. tropicalis*. Nas colunas 8b a 9c nota-se uma grande variação na intensidade das bandas e o padrão gerado pelos cortes da enzima de restrição é múltiplo e de difícil comparação.

PM 5a 5b 6a 6b 6c 7a 7b 8a 8b 9a 9b 9c 0

Figura 6: Resultado da corrida eletroforética em campo pulsátil do DNA extraído dos isolados de *C. tropicalis* com a utilização da enzima de restrição *SfiI*. O padrão de peso molecular *S. cerevisiae* está disposto na primeira coluna e a última coluna 0 corresponde a cepa ATCC de *C. tropicalis*. As amostras múltiplas de um mesmo paciente estão representadas nas colunas 2 a 13, destacando-se as amostras 5a, 5b e 7a.

PM 10a 10b 11a 11b 12a 12b 12c 13a 13b 14a 0

Figura 7: Resultado da corrida eletroforética em campo pulsátil do DNA extraído dos isolados de *C. tropicalis* com a utilização da enzima de restrição *BssHII*. O padrão de peso molecular *S. cerevisiae* está disposto na primeira e a última coluna 0 corresponde a cepa ATCC de *C. tropicalis*. Nas colunas 2 a 10 estão dispostas as amostras dos isolados múltiplos da UNICAMP, destacando-se 11a, 11b e 12a.

Figura 8: Resultado da análise filogenética comparativa do marcador molecular PFGE com as enzimas de restrição *SfiI* (esquerda) e *BssHII* (direita) pelo método de agrupamento de vizinhos (“neighbor joining”) e o coeficiente de similaridade de Dice. Os padrões diferentes obtidos pela corrida eletroforética estão representados ao lado de cada árvore filogenética. Em verde, estão destacados os isolados do HCFMUSP e, em preto, os isolados da UNICAMP.

4.2.3. Comparação entre RAPD com os três iniciadores (P1, P2, P3) e PFGE (com enzima de restrição *Bss*HII)

Entre os isolados sequenciais de um mesmo paciente observou-se concordância para os isolados dos pacientes, 1, 6, 7 e 11. Em relação aos isolados únicos, houve grande concordância entre os iniciadores P1, P2 e o PFGE, mostrando baixa variabilidade genética entre os isolados do HCFMUSP. O iniciador P3 revelou concordância em relação aos outros iniciadores e ao PFGE para os isolados 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43. Destaca-se o isolado HCFMUSP (35), que apresentou um perfil totalmente diferente pelos três iniciadores. Tal capacidade de discriminação não ocorreu no PFGE com as enzimas de restrição testadas.

4.2.4. Resultados da reação de MLST

4.2.4.1. PCR e sequenciamento dos seis fragmentos de genes *ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*

Foram caracterizados por MLST todos os 61 isolados de *C. tropicalis* de 43 pacientes com diagnóstico de candidemia. Inicialmente, com relação a reação de PCR, foram realizadas 720 reações. Os resultados das corridas eletroforéticas para a visualização dos produtos amplificados estão exemplificados na **Figura 9**. Os oligonucleotídeos iniciadores para os genes *SAPT4* e *XYR1* mostraram melhor rendimento e positividade nas reações de PCR.

Alguns isolados apresentaram grande discrepância em relação às dosagens obtidas para determinados fragmentos de genes como, por exemplo, os isolados 1a, 5a, 5b, 7b, 8b, 9b, 2a, 3b, 4a, 4b, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25 e 26. O DNA de 32 isolados foi extraído novamente. A **Tabela 6** exemplifica a dosagem final dos seis fragmentos de genes estudados e a **Figura 10** o tamanho e as características dos fragmentos de genes após a

purificação. Ao final das reações, obteve-se quantidade suficiente para a realização das reações de sequenciamento em duplicata.

As análises visuais das sequências obtidas após a reação de sequenciamento, obtenção da sequência consenso e posterior alinhamento não mostraram interferência de inserção, gap, poliploidia ou aneuploidia nos cromatogramas.

A presença de picos duplos correspondentes a heterozigose foi frequente, sendo necessário realizar nova reação de sequenciamento em mais da metade dos isolados para confirmação da heterozigose. Detectaram-se no total, 543 heterozigoses em todos os fragmentos de genes, das quais Y (C+T) com 59,5%, R (A+G) com 22,3%, W (A+T) com 13,6%, K (G+T) com 2,2%, M (A+C) com 1,5 % e S (C+G) com 0,9%. A **Figura 11** mostra os sítios polimórficos correspondentes a heterozigose nos seis fragmentos dos genes estudados. Nos seis fragmentos de genes analisados, identificaram-se 154 sítios polimórficos (20 *ICL1*, 27 *MDR1*, 39 *SAPT2*, 34 *SAPT4*, 19 *XYR1* e 15 *ZWF1*).

Tabela 6 - Distribuição das concentrações de DNA amplificado dos 61 isolados de *C. tropicalis* obtidas após purificação e dosagem dos seis fragmentos de genes *ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*

Isolados	DNA amplificado					
	<i>ICL1</i>	<i>MDR1</i>	<i>SAPT2</i>	<i>SAPT4</i>	<i>XYR1</i>	<i>ZWF1a</i>
1a	20	20	130	20	60	150
1b	20	30	40	70	70	20
1c	70	170	200	300	70	100
2a	10	20	50	20	20	10
2b	120	110	110	100	100	70
3a	85	90	70	100	80	70
3b	40	100	20	90	150	40
4a	25	40	20	100	90	35
4b	35	160	90	60	40	200
5a	40	70	70	310	100	20
5b	20	20	20	30	46	120
6a	30	50	50	30	56	30
6b	25	30	150	130	200	100
6c	50	50	40	30	50	25
7a	40	90	20	20	60	100
7b	60	20	20	30	20	20
8a	20	30	60	100	100	10
8b	50	140	20	80	60	200
9a	52	20	20	100	100	10
9b	31	20	20	100	100	20
9c	70	60	20	75	120	70
10a	70	80	90	70	50	60
10b	30	50	40	60	30	20
11a	20	20	20	20	50	20
11b	20	20	60	20	20	20
12a	20	100	60	60	60	80
12b	20	40	20	80	50	100
12c	20	20	20	20	20	20
13a	60	80	20	40	75	100
13b	33	40	20	40	32	20
14a	60	70	20	100	50	100
14b	50	85	20	100	40	100
15	98	20	20	100	100	200
16	20	40	40	100	45	55
17	20	20	100	20	50	20
18	20	40	20	40	40	45
19	60	140	145	20	20	100
20	20	35	100	20	45	20
21	40	40	20	40	60	25
22	90	45	125	100	45	25
23	20	20	100	20	20	20
24	60	20	135	40	70	20
25	120	100	135	200	20	200
26	35	220	115	200	20	100
27	80	20	20	20	100	20
28	20	20	40	60	100	40
29	40	30	25	30	100	20
30	30	20	20	80	100	80
31	30	20	20	20	60	20
32	20	160	40	40	100	10
33	60	20	20	20	30	30
34	100	260	30	100	80	100
35	40	130	40	40	150	200
36	100	40	60	60	60	40
37	20	20	20	40	20	20
38	60	20	40	20	100	50
39	60	20	60	60	60	20
40	20	20	40	20	80	100
41	20	100	100	100	100	50
42	20	70	100	40	100	20
43	20	235	240	40	80	200

NOTA: As condições da reação de PCR foram padronizadas segundo Tavanti et al, 2005, evidenciando grande variação na concentração de DNA.

Figura 9: Resultado das reações de amplificação dos fragmentos dos 06 genes estudados *ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*, evidenciando o tamanho e a presença de banda única. A primeira coluna de cada corrida eletroforética corresponde ao padrão de peso molecular (M) e as demais colunas correspondem a alguns dos isolados sequenciais de um mesmo paciente da UNICAMP.

Figura 10: Resultado da corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, utilizando 2 ul de Low DNA Mass Ladder e 2ul de DNA purificado com o “KIT GFX PCR DNA and GEL BAND PURIFICATION”. A primeira coluna representa o “Ladder” referente às concentrações de DNA obtidas com as amostras ATCC amplificadas com cada iniciador testado. Os tamanhos de fragmentos gerados são *ICL1*: 737 pb, *MDR1*: 663 pb, *SAPT2*: 652 pb, *SAPT4*: 483 pb, *XYR1*: 483 pb e *ZWF1a*: 647 pb. Os produtos esperados para sequenciamento são de 370 a 520 pb.

4.2.4.2. Identificação dos alelos/genótipos e das DSTs

Todos os fragmentos de genes sequenciados, alinhados, editados e no tamanho ideal, foram submetidos ao endereço eletrônico oficial do MLST *C. tropicalis* (<http://pubmlst.org/ctropicalis/>). Posteriormente, os alelos foram combinados e submetidos novamente ao banco de dados oficial do MLST sendo possível encontrar as DSTs (Diploid Sequence Type). Os alelos previamente descritos e os inéditos, bem como as DSTs encontradas, estão disponibilizados na **Tabela 7**.

O número total de alelos/genótipos encontrados nos seis fragmentos de genes sequenciados foi 73, sendo *ICL1* (seis), *MDR1* (dezoito), *SAPT2* (nove), *SAPT4* (oito), *XYR1* (vinte e quatro) e *ZWF1a* (oito). Em relação ao gene *ICL1*, o alelo/genótipo mais encontrado foi o 1, presente em 45 isolados (73,8%) e no gene *MDR1* os genótipos mais frequentes foram o 7 em 21 isolados (34,43%) e o 24 em 17 isolados (27,87%). O gene *SAPT2* evidenciou, mais frequentemente, os genótipos 4 em 27 isolados (44,26%) e 3, em 22 isolados (30,07%). Com relação ao gene *SAPT4*, os genótipos mais frequentes foram o 7, em 26 isolados (42,62%) e o 11, em 13 isolados (21,3%). O gene *XYR1* apresentou grande variedade de genótipos (24 no total). No gene *ZWF1*, o genótipo 6 foi

o mais frequente em 20 isolados (32,79%), o 3 em 15 isolados (23%) e o 4 em 12 isolados (19,67%). O programa identificou 23 alelos/genótipos novos, sendo *ICLI* (três), *MDR1* (seis), *SAPT2* (três), *SAPT4* (um), *XYRI* (sete) e *ZWF1a* (três). A relação entre alelos novos/número total de alelos foi de 0,35 (35%).

Em relação às DST, observaram-se 39 (36 novas) nos 61 isolados, submetidas e publicadas em 02 de abril de 2012 no banco de dados oficial do MLST. Das 39 DSTs encontradas, três já eram previamente conhecidas (124, 134 e 203) visualizadas na penúltima coluna da **Tabela 7**. A DST mais frequentemente encontrada foi a 232, dos isolados 1c, 6b, 11b, 14a, 33, 42 e 43, sendo os quatro primeiros da UNICAMP e os três últimos do HCFMUSP. Em seguida, a DST 251 representada pelos isolados 27, 30, 36, 39 e 41, sendo todos do HCFMUSP. A relação entre DSTs novas/DST totais foi de 0,92 (92%).

4.2.4.3. Análise dos polimorfismos encontrados entre os isolados sequenciais de um mesmo paciente

Pequenas alterações genéticas definidas como microvariação são caracterizadas por variações em um único genótipo entre isolados sequenciais de um mesmo paciente. No presente estudo, as microvariações foram mais frequentes no fragmento de gene *XYRI* entre os seguintes isolados: 1a vs. 1c, 5a vs. 5b, 6a vs. 6b, 8a vs. 8b, 9a = 9b vs. 9c, 10a vs. 10b, 12a vs. 12b e 14a vs. 14b, como mostrado na **Tabela 8**. Polimorfismo em um único nucleotídeo (SNP) e em um único alelo/genótipo ocorreu entre os isolados 8a vs. 8b, 9a = 9b vs. 9c, 10a vs. 10b e 12a vs. 12b. Para ilustrar esta situação, o isolado 8a (alelo 52) foi diferente do isolado 8b (alelo 84) porque apresentou perda de heterozigose na posição 215. Múltiplas variações no mesmo gene ocorreram entre 1a vs. 1c (3 SNP), 5a vs. 5b (5 SNP) e 6a vs. 6b (3 SNP). Os principais polimorfismos no gene *XYRI* ocorreram nas posições 215, 242 e 344, evidenciadas na **Tabela 8**. Alterações genéticas em dois fragmentos de genes foi encontrada entre os isolados 6b vs. 6c no fragmento de gene *MDR1* (1 SNP) e *XYRI* (3 SNP) e entre os isolados 13a vs. 13b com *SAPT2* (4 SNP) e *XYRI* (1 SNP).

Grandes diferenças (macrovariações) ocorreram em quatro pacientes (2, 3, 7 e 11) com mais de um isolado, destacando-se os isolados dos pacientes 3, 7 e 11 que apresentaram diferença nos seis alelos estudados. Nos isolados 3b e 7a, cinco dos seis alelos estudados foram considerados inéditos e incorporados no banco de dados oficial.

Entre os pacientes com positividade nas culturas de sangue e cateter, destacam-se os isolados: 1b (sangue) vs. 1c (cateter), 2a (cateter) vs. 2b (sangue) e 3a (sangue) vs. 3b (cateter). Nesses pacientes, ocorreram grandes diferenças em pelo menos cinco fragmentos de genes entre seus pares, sugerindo que o isolado do sangue aparentemente não teve relação com o isolado do cateter. Entre os isolados 1a (sangue) vs. 1c (cateter) 6a (sangue) vs. 6b (cateter), 8a (sangue) vs. 8b (cateter) e 14a (sangue) vs. 14b (cateter), a diferença foi encontrada somente em um único fragmento de gene *XYRI*, sugerindo uma maior proximidade genética entre os seus pares. Entre os isolados 13a (sangue) vs. 13b (cateter), as diferenças estão em dois fragmentos de genes, *SAPT2* e *XYRI*.

CIM superior a 32 µg/mL para o fluconazol, foi observada em pelo menos um isolado dos pacientes 5 (5b, DST 124), 12 (12c, DST 256) e 25 (DST 238), como mostra a **Tabela 7**. O paciente 5 teve boa resposta ao tratamento com fluconazol, apesar de MIC = 64 µg/mL. Os antifúngicos mais comumente usados foram fluconazol e anfotericina B, em 5 e 12 pacientes, respectivamente. Todos os pacientes receberam doses preconizadas das drogas antifúngicas. Além disso, dois pacientes (5 e 12) foram simultaneamente infectados por isolados resistentes e sensíveis. No paciente 5, o isolado 5b (DST 124) foi considerado resistente ao fluconazol e 5a (DST 239), suscetível ao fluconazol. No paciente 12, o isolado 12c (DST 256) foi resistente ao fluconazol e 12a (DST 238) e 12b (DST 248) foram considerados suscetíveis ao fluconazol. DSTs 124, 238 e 256 não foram exclusivas dos isolados resistentes. Como podem ser observados na Tabela 7, os isolados 20 (DST 124), 16 (DST 256), 7b, 12 e 26 (DST 238) foram todos sensíveis ao fluconazol.

Figura 11: A figura editada do programa BIOEDIT mostra os sítios polimórficos dos fragmentos de genes estudados *ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*. Os sítios heterozigóticos estão representados pelas letras K, M, S, R, Y e W de acordo com as normas IUPAC.

Tabela 7: Distribuição de 61 isolados de *C. tropicalis* obtidos de cultura de sangue e/ou cateter de 43 pacientes segundo os alelos/genótipos, DSTs, análise de ancestralidade e o perfil de sensibilidade ao fluconazol encontrados nos seis fragmentos de genes analisados

Paciente / Hospital	Isolado	Cultura	Data	ICL1	MDR1	SAPT2	SAPT4	XYR1	ZWF1a	DST	EBURST	FCZ CIM µg/mL
1 / U	1a	Sangue	24/03/03	1	24	3	7	53	6	239	4	0,5
	1b	Sangue	28/03/03	1	7	4	11	4	3	234	6	1
	1c	CVC	31/03/03	1	24	3	7	24	6	232	4	2
2 / U	2a	CVC	25/07/02	1	7	4	11	50	3	236	6	2
	2b	Sangue	30/07/02	3	58	4	13	76	1	265	singleton	2
3 / U	3a	Sangue	25/06/02	1	29	4	1	51	1	249	singleton	0,5
	3b	CVC	25/06/02	28	84	28	7	86	28	258	singleton	1
4 / U	4a	CVC	21/04/03	3	4	4	17	77	4	264	singleton	1
	4b	Sangue	21/04/03	3	4	4	17	77	4	264	singleton	2
5 / U	5a	Sangue	13/07/02	1	24	3	7	53	6	239	4	1
	5b	Sangue	24/07/02	1	24	3	7	48	6	124	4	64
6 / U	6a	Sangue	17/06/02	1	24	3	7	53	6	239	4	1
	6b	CVC	17/06/02	1	24	3	7	24	6	232	4	0,5
	6c	Sangue	17/06/02	1	87	3	7	89	6	261	singleton	2
7 / U	7a	Sangue	02/09/02	29	48	29	48	87	30	267	singleton	1
	7b	Sangue	08/09/02	1	7	4	6	52	4	238	1	0,5
8 / U	8a	Sangue	08/09/01	1	7	1	6	52	4	237	1	1
	8b	CVC	10/09/01	1	7	1	6	84	4	243	1	1
9 / U	9a	CVC	15/01/00	10	58	4	8	31	3	246	18	1
	9b	Sangue	15/01/00	10	58	4	8	31	3	246	18	1
	9c	Sangue	17/01/00	10	58	4	8	3	3	247	18	0,5
10 / U	10a	Sangue	15/12/02	1	7	4	11	19	3	241	6	1
	10b	Sangue	22/12/02	1	7	4	11	51	3	235	6	1
11 / U	11a	Sangue	12/09/01	3	7	4	6	52	4	203	1	2
	11b	Sangue	24/09/01	1	24	3	7	24	6	232	4	0,5
12 / U	12a	Sangue	28/10/02	1	7	4	6	52	4	238	1	1
	12b	Sangue	31/10/02	1	7	4	6	84	4	248	1	2
	12c	Sangue	31/10/02	1	1	18	1	31	1	256	3	64
13 / U	13a	Sangue	14/10/02	3	7	4	6	84	4	245	1	0,5
	13b	CVC	17/10/02	3	7	1	6	52	4	134	1	0,25
14 / U	14a	Sangue	03/01/01	1	24	3	7	24	6	232	4	0,25
	14b	CVC	03/01/01	1	24	3	7	89	6	261	singleton	1
15 / U	15	Sangue	11/01/01	1	24	3	7	90	6	262	4	0,5
16 / U	16	Sangue	13/02/01	1	1	18	1	31	1	256	3	1
17 / U	17	CVC	04/02/02	1	7	4	6	67	6	244	singleton	2
18 / U	18	Sangue	05/02/02	30	85	30	7	88	29	259	singleton	2
19 / U	19	CVC	19/02/02	1	49	18	1	31	1	266	3	1
20 / U	20	CVC	19/05/02	1	24	3	7	48	6	124	4	0,5
21 / U	21	Sangue	25/06/02	3	39	3	7	90	7	268	singleton	0,5
22 / U	22	Sangue	05/08/02	1	24	3	7	47	6	240	4	4
23 / U	23	Sangue	25/09/02	1	87	3	7	89	6	261	singleton	0,5
24 / U	24	Sangue	14/12/02	3	1	4	11	19	1	255	singleton	0,5
25 / U	25	Sangue	04/03/03	1	7	4	6	52	4	238	1	64
26 / U	26	CVC	28/03/03	1	7	4	6	52	4	238	1	0,5
27 / H	27	Sangue	30/03/01	1	7	4	11	76	3	251	6	1
28 / H	28	Sangue	01/02/01	3	86	12	11	73	3	260	singleton	2
29 / H	29	Sangue	04/07/99	1	17	3	7	1	3	242	singleton	0,5
30 / H	30	Sangue	06/03/01	1	7	4	11	76	3	251	6	2
31 / H	31	Sangue	18/01/00	3	4	4	7	77	7	254	singleton	2
32 / H	32	Sangue	16/04/01	1	7	4	11	76	7	263	6	2
33 / H	33	Sangue	29/01/99	1	24	3	7	24	6	232	4	1
34 / H	34	Sangue	07/04/98	1	83	1	11	2	3	253	singleton	0,5
35 / H	35	Sangue	11/12/99	1	24	3	7	24	7	233	4	1
36 / H	36	Sangue	14/09/00	1	7	4	11	76	3	251	6	2
37 / H	37	Sangue	24/09/01	1	24	3	7	47	6	240	4	1
38 / H	38	Sangue	12/03/98	1	82	3	7	24	6	250	4	0,25
39 / H	39	Sangue	03/04/01	1	7	4	11	76	3	251	6	0,25
40 / H	40	Sangue	17/03/00	1	66	3	7	9	7	252	singleton	1
41 / H	41	Sangue	29/07/98	1	7	4	11	76	3	251	6	0,25
42 / H	42	Sangue	20/10/98	1	24	3	7	24	6	232	4	1
43 / H	43	Sangue	18/04/01	1	24	3	7	24	6	232	4	1

NOTA: U = UNICAMP e H = HCFMUSP; CVC = cateter venoso central; DST = diploid sequence type; Em negrito estão representados todos os alelos/ genótipos novos sendo um representante de cada circundado evidenciando 23 alelos novos; Em vermelho estão destacadas as 36 DSTs novas submetidas no banco de dados oficial em 02 de abril de 2012.

Tabela 8: Distribuição dos resultados da análise das diferenças entre as sequências de 32 isolados sequenciais de *C. tropicalis* em 14 pacientes quanto aos alelos/genótipos, diferenças dos nucleotídeos, similaridade (%) e a análise de ancestralidade

Pacientes	Isolados	Diferença no genótipo	Diferença no nucleotídeo	Similaridade %	Ancestralidade
1	1a vs 1c	<i>XYRI</i> : 53 - 24	215: C-Y; 242: C-Y; 344: T-Y	99,19	4
	1a /1c vs 1b	5 alelos	Diferenças em 5 alelos		4 vs 6
2	2a vs 2b	5 alelos	Diferenças em 5 alelos		6 vs singleton
3	3a vs 3b	6 alelos	Diferenças em 6 alelos		Diferentes singletons
4	4a vs 4b	Idênticos		100	Idênticos singletons
5	5a vs 5b	<i>XYRI</i> : 53 - 48	11: Y-T; 14: Y-T; 215: C-Y; 242: C-Y; 344: T-Y	98,65	4
6	6a vs 6b	<i>XYRI</i> : 53 - 24	215: C-Y; 242: C-Y; 344: T-Y	99,19	4
	6a vs 6c	<i>MDR1</i> : 24 - 87	7: T-Y	99,76	4 vs singleton
		<i>XYRI</i> : 53 - 89	14: Y-C; 344: T-Y	99,46	
	6b vs 6c	<i>MDR1</i> : 24 - 87 <i>XYRI</i> : 24 - 89	7: T-Y 14: Y-C; 215: Y-C; 242: Y-C	99,76 99,19	
7	7a vs 7b	6 alelos	Diferenças em 6 alelos		singleton vs 1
8	8a vs 8b	<i>XYRI</i> : 52 - 84	215: Y-C	99,73	1
9	9a = 9b vs 9c	<i>XYRI</i> : 31 - 3	242: C-Y	99,73	18
10	10a vs 10b	<i>XYRI</i> : 19 - 51	344: Y-T	99,73	6
11	11a vs 11b	6 alelos	Diferenças em 6 alelos		1 vs 4
12	12a /12b vs 12c	5 alelos	Diferenças em 5 alelos		1 vs 3
	12a vs 12b	<i>XYRI</i> : 52 - 84	215: Y-C	99,73	1
13	13a vs 13b	<i>SAPT2</i> : 4 - 1 <i>XYRI</i> : 84-52	55: W-T; 262: G-R; 310: R-A; 421: C-Y 215: C-Y	99,06 99,73	1
14	14a vs 14b	<i>XYRI</i> : 24 - 89	14: Y-C; 215: Y-C; 242: Y-C	99,19	4 vs singleton

FONTE: Todos os fragmentos de genes foram submetidos ao endereço eletrônico oficial do MLST <http://pubmlst.org/ctropicalis/>

NOTA: Os isolados dos pacientes 1 a 14 são da Universidade Estadual de Campinas.

4.2.4.4. Análise filogenética dos seis fragmentos dos genes na forma haplótipo não concatenados

A análise filogenética dos seis genes, separadamente, está representada na **Figura 12a e 12b**. Destacam-se as sequências dos isolados 7a, 3b e 18 todos da UNICAMP, que estão agrupadas e distantes dos demais isolados em todos os alelos, exceto na análise do alelo *SAPT4*. Os isolados da UNICAMP e HCFMUSP estão dispostos em boa parte dos agrupamentos formados pelas árvores filogenéticas,

respeitando o número e abrangência dos isolados estudados. Alguns isolados tendem a se organizar em grupos específicos nas árvores filogenéticas. Entre os isolados do HCFMUSP, destacam-se os isolados 27, 30, 36, 39 e 41, agrupados de maneira conjunta em todos os genes.

Os fragmentos de genes *XYRI* e *MDRI* apresentaram maior poder discriminatório sendo 95,03% e 80,33%, respectivamente (**Figuras 12b e 12a**). O alelo *ICLI* apresentou o menor valor, 45,68%, *SAPT2* 66,5%, *SAPT4* 74,43% e *ZWF1a* 79,13% (**Figuras 12a e 12b**).

A análise comparativa entre os pacientes com mais de um isolado está representada na **Tabela 9**, destacando-se o fragmento de gene *XYRI*, com maior polimorfismo entre todos os genes, agrupando como idênticos, apenas os isolados 4a vs. 4b e 9a vs. 9b. Na **Figura 13**, estão representados os dendrogramas com todas as 90 sequências descritas no endereço oficial, na forma haplótipa do gene *XYRI*. Estão destacados os isolados 21, 28 e os isolados 3b, 7a e 18 alelos encontrados nos hospitais de ensino (HCFMUSP e UNICAMP).

Tabela 9: Distribuição de 32 isolados de *C. tropicalis* a partir de fungemia em 14 pacientes com mais de um isolado de sangue e/ou cateter, quanto a similaridade nas sequências dos 06 genes estudados (*ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*)

Pacientes	Isolados	Alelos idênticos
1	1a vs 1c vs 1b	<i>ICL1</i>
	1a vs 1c	<i>MDR1, SAPT2, SAPT4, ZWF1a</i>
	1a vs 1b	<i>ICL1</i>
	1b vs 1c	<i>ICL1</i>
2	2a vs 2b	<i>SAPT2</i>
3	3a vs 3b	Diferenças nos seis alelos
4	4a vs 4b	<i>ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, XYR1, ZWF1a</i>
5	5a vs 5b	<i>ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, ZWF1a</i>
6	6a vs 6b vs 6c	<i>ICL1, SAPT2, SAPT4, ZWF1a</i>
	6a vs 6b	<i>ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, ZWF1a</i>
	6a vs 6c	<i>ICL1, SAPT2, SAPT4, ZWF1a</i>
	6b vs 6c	<i>ICL1, SAPT2, SAPT4, ZWF1a</i>
7	7a vs 7b	Diferenças nos seis alelos
8	8a vs 8b	<i>ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, ZWF1a</i>
9	9a = 9b vs 9c	<i>ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, ZWF1a</i>
	9a vs 9b	<i>ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, XYR1, ZWF1a</i>
	9a vs 9c	<i>ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, ZWF1a</i>
10	10a vs 10b	<i>ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, ZWF1a</i>
11	11a vs 11b	Diferenças nos seis alelos
12	12a vs 12b vs 12c	<i>ICL1</i>
	12a vs 12b	<i>ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, ZWF1a</i>
	12a vs 12c	<i>ICL1</i>
	12b vs 12c	<i>ICL1</i>
13	13a vs 13b	<i>ICL1, MDR1, SAPT4, ZWF1a</i>
14	14a vs 14b	<i>ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, ZWF1a</i>

FONTE: Todos os fragmentos de genes foram submetidos ao endereço eletrônico oficial do MLST <http://pubmlst.org/ctropicalis/>

NOTA: Os isolados dos pacientes 1 a 14 são da UNICAMP; em cinza estão os pacientes 3, 7 e 11 que apresentam diferenças nos seis genes estudados

Figura 12a: Representação das diferentes árvores filogenéticas não enraizadas por máxima verossimilhança dos fragmentos dos genes *ICL1*, *MDR1* e *SAPT2*, das 61 sequências de 43 pacientes do HCFMUSP e da UNICAMP. Os números destacados em vermelho representam os valores de “bootstrap” obtidos na construção das árvores.

Figura 12b: Representação das diferentes árvores filogenéticas não enraizadas por máxima verossimilhança dos fragmentos dos genes *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*, das 61 sequências de 43 pacientes do HCFMUSP e da UNICAMP. Os números destacados em vermelho representam os valores de “bootstrap” obtidos na construção das árvores.

Figura 13: Dendrogramas não enraizados obtidos por máxima verossimilhança com as 90 sequências completas do fragmento de gene *XYR1*. Os dendrogramas incluíram as sequências dos 24 alelos encontrados para esse fragmento de gene dos 61 isolados dos 43 pacientes com infecção de corrente sanguínea nos hospitais de ensino estudados. Em azul, estão representadas as posições dos 24 alelos dos isolados da UNICAMP e HCFMUSP. À direita, destaca-se o dendrograma na forma circular.

4.2.4.4. Análise filogenética dos seis fragmentos de genes concatenados com e sem heterozigose

O dendrograma das sequências dos seis fragmentos de genes concatenados, excluindo-se a heterozigose com as 61 sequências do estudo e posteriormente com todas as sequências das 267 DSTs do banco de dados oficial foram gerados e estão visualizados na **Figura 14**. A árvore filogenética apresentou baixos valores de “bootstrap”, sendo menores de 50%. O dendrograma mostra que em 100 árvores geradas, menos de 50 árvores permaneceriam com os nós na mesma localização. Esses dados sugerem uma baixa capacidade de sustentação desses nós. Essa análise conseguiu agrupar as sequências dos isolados 3b, 7a e 18 em localização distante das demais, bem como a análise dos cinco alelos individualmente. O dendrograma com todas as 267 DSTs também destaca os isolados 3b, 7a e 18.

O resultado da análise filogenética dos fragmentos dos seis genes concatenados na forma haplótipa está visualizado na **Figura 15a e 15b**. A distância genética entre as cepas de *C. tropicalis* foram representadas pela construção de um dendrograma não enraizado agrupado por Máxima verossimilhança. O ponto de corte de 100% de “bootstrap” foi escolhido aleatoriamente para a definição de clados (acima de 70%) e foram mantidos nas árvores os valores acima de 50%.

Analisando-se todos os genes concatenados, de maneira geral, os isolados deste estudo foram enquadrados em dois clados principais (I e II) e um clado solitário, divididos pelo valor de “bootstrap” de 100%. O clado I constituiu-se de três grupos representados por letras (de A – C), com 57 isolados. O grupo A, com 23 (37,7%) isolados, sendo 22 da UNICAMP e 01 do HCFMUSP, correspondendo ao isolado 31. O grupo B, com 14 (22,3%) isolados, sendo a maioria (10) do HCFMUSP e o grupo C, com 20 (32,8%) isolados, sendo apenas 06 do HCFMUSP. O clado solitário é composto pelo isolado 21 e o clado II, pelos isolados 3b, 7a e 18, como mostra a **Figura 15a**. O poder discriminatório foi de 97,4%.

Os isolados fluconazol resistentes mantiveram-se distantes no dendrograma. Os isolados 12c e 25 foram agrupados no Grupo A, separados por valor de bootstrap de 99%. O isolado 5b foi agrupado no Grupo C.

A árvore filogenética gerada com os 32 isolados dos 14 pacientes com mais de um isolados apresentou altos valores de “bootstrap” nos nós principais, representando mais nitidamente a proximidade evolutiva desses isolados. Entre os pacientes do HCFMUSP, observou-se uma baixa variabilidade genética em relação aos da UNICAMP. Os resultados das análises filogenéticas dos fragmentos dos seis genes concatenados na forma haplótipa dos isolados sequenciais de um mesmo paciente comparativamente aos do HCFMUSP, estão visualizados na **Figura 15b**.

Estabelecendo-se uma comparação entre a análise haplótipa das sequências dos seis fragmentos de genes concatenados com a análise haplótipa individual das sequências do alelo *XYR1* (**Figura 16**), que obteve 95,03% de poder discriminatório, pode-se notar a manutenção da divisão em dois clados principais. Ainda pode-se notar que embora os grupos do clado I não sejam idênticos, eles são comparáveis. A adição dos outros cinco genes na análise concatenada contribuiu muito pouco com aumento do poder discriminatório, mas muito em valores de significância dos nós.

Comparando-se os dendrogramas da análise haplótipa das sequências dos seis fragmentos de genes concatenados com as sequências dos seis genes concatenados excluindo-se a heterozigose, dispostos na **Figura 17**, pode-se notar que a análise da heterozigose foi fundamental para detectar pequenas diferenças (microevolução /microvariação), como o que ocorreu com os isolados 9a e 9b em relação ao 9c e entre os isolados 13a e 13b.

A **Figura 18** mostra a disposição dos isolados adicionando-se à análise todas as 267 DSTs obtidas do endereço oficial do MLST <http://pubmlst.org/ctropicalis/> até 08/08/2012. Na árvore nota-se a distribuição das DSTs do estudo e a permanência dos isolados 3b, 7a e 18 agrupados. As DSTs encontradas no estudo (Brasil), quando analisados pelo método de inferência Bayesiana, foram agrupados em vários clados possivelmente existentes.

Figura 14: Dendrogramas não enraizados obtidos por máxima verossimilhança com as sequências completas dos seis fragmentos dos genes concatenados excluindo-se os sítios heterozigóticos. À esquerda está representado o dendrograma realizado somente com as 39 DSTs dos 61 isolados do estudo, destacando-se os isolados 3b, 7a, 18, 21, da UNICAMP e o isolado 28 do HCFMUSP. À direita, o dendrograma circular representa o agrupamento de todas as sequências das 267 DSTs do banco de dados mundial. As DSTs do estudo estão marcadas com uma cruz azul.

Figura 15a: Dendrograma não enraizado obtido por máxima verossimilhança dos sítios polimórficos das 61 sequências dos fragmentos dos 06 genes (*ICLI*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4* e *ZWF1a*) concatenados na forma haplótipa. As sequências foram dispostas em dois clados I e II e um clado solitário. O clado I foi dividido em 3 grupos. Em vermelho, estão destacados os isolados do HCFMUSP. O clado II representa os isolados 7a, 3b e 18.

Figura 15b: Árvores filogenéticas não enraizadas pelo método de agrupamento máxima verossimilhança. A) 32 isolados múltiplos de *C. tropicalis* de 14 pacientes da UNICAMP submetidos à reação de sequenciamento dos seis genes concatenados; B) 12 isolados únicos da UNICAMP e C) 17 isolados únicos do HCFMUSP.

Figura 16: Comparação das árvores filogenéticas (A) das sequências dos seis genes concatenados (*ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4* e *ZWF1a*) na sua forma haplótipa com (B) as sequências do fragmento de gene *XYR1*. Os dendrogramas foram gerados pelo método de agrupamento máxima verossimilhança evidenciando dois cladros I e II com grupos não idênticos, mas comparáveis. O clado I foi dividido em 3 grupos. Em vermelho, estão destacados os isolados do HCFMUSP. O clado II representa os isolados 7a, 3b e 18.

Figura 17: Comparação das árvores filogenéticas das sequências dos seis fragmentos de genes concatenados na sua forma haplótípa (A) com as sequências dos seis fragmentos de genes concatenados excluindo-se a heterozigose (B), dos 61 isolados de *C. tropicalis*. Os dendrogramas foram gerados por máxima verossimilhança. Na análise haplótípa houve a divisão em dois Clados I e II. O dendrograma B não foi dividido em clados ou grupos pelos baixos valores de “bootstrap”, embora muitas sequências tenham sido coincidentes. Em vermelho, estão destacados os isolados do HCFMUSP em ambos os dendrogramas. Os isolados 7a, 3b e 18 foram agrupados de forma semelhante nas duas árvores.

Figura 18: Análise filogenética por inferência Bayesiana das 267 sequências dos seis fragmentos de genes (*ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4* e *ZWF1a*) concatenados e convertidos na forma haplótipo obtidas no endereço eletrônico MLST. Em vermelho, estão destacadas as DSTs encontradas no HCFMUSP.

4.2.4.5 Análise de ancestralidade das 267 DSTs descritas

A análise de ancestralidade pelo eBURST com as 39 DSTs do estudo incluídas nas 267 DSTs descritas revelou, no total, 28 grupos e 131 DSTs sem ancestral comum, classificadas como “singletons”. Em relação às DSTs desse estudo, foi possível definir ancestrais comuns em 24 DSTs das 39, conforme mostra a **Figura 19**. A **Tabela 10** mostra os cinco grupos onde os isolados do estudo foram incluídos dentro dos 28 totais. O grupo 1 incluiu 07 DSTs do estudo totalizando 27 DSTs, o grupo 3 incluiu 02 DSTs em 10 DSTs, o grupo 4 incluiu 07 em 09 DSTs, o grupo 6 foi formado por seis DSTs do estudo e o grupo 18 incluiu somente duas DSTs do estudo.

Entre todas as DSTs do estudo, 15 ainda não tem descrição de ancestrais comuns para um total de 131 (“singletons”), não sendo possível agrupá-las em grupos/complexos

clonais, destacando-se as DSTs dos isolados 18, 7a e 3b. A **Figura 19** mostra a disposição espacial das DSTs geradas no estudo em comparação com todas do banco de dados do MLST. As DSTs que estão ligadas entre si são as que apresentam semelhança em 5 dos 6 fragmentos de genes analisados.

No grupo 1, o isolado 13b assumiu a posição central do grupo e o mesmo não ocorre na análise filogenética. Os isolados 3b, 7a e 18 estão localizados em posição bem periférica em relação às outras DSTs na análise de ancestralidade, assim como na análise filogenética, como mostra a **Figura 19**.

A **Tabela 11** estabelece uma comparação entre os métodos moleculares do estudo, RAPD (com os oligonucleotídeos iniciadores P1, P2 e P3), PFGE com enzima de restrição que avalia o DNA total cromossomal e extracromossomal e o MLST pela análise de ancestralidade. Nessa análise, destacam-se os isolados dos pacientes 3, 7 e 11, considerados diferentes pelos três métodos e os isolados dos pacientes 1, 4, 6, 9, 12, 13, que foram considerados idênticos por pelo menos um dos três oligonucleotídeos iniciadores do RAPD, pelo PFGE *Bss*HII e pelo eBURST – MLST.

Figura 19: Análise comparativa da representação gráfica da análise de ancestralidade das sequências dos 61 isolados de *C. tropicalis* das instituições de ensino HCFMUSP e UNICAMP por eBURST com a árvore filogenética por inferência Bayesiana dos sítios polimórficos por MLST, concatenados e convertidos na forma haplótipa das 267 DSTs dos seis genes *ICLI*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4* e *ZWF1a*. Em vermelho, estão destacados os isolados sequenciais da UNICAMP. Análise por eBURST dos complexo clonais construídos a partir das DSTs de todos os isolados do banco de dados oficial MLST identificou 05 grupos/complexos clonais.

Tabela 10: Distribuição das 39 DSTs segundo grupos e *singletons* gerados pela análise de ancestralidade em comparação com as 267 DST descritas até 02 de abril de 2012

Grupos formados pela análise de eBURST					<i>Singletons</i>				
Grupo 1	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 6	Grupo 18					
134	110	232	251	247	109	194	176	156	25
27	256	262	241	246	108	193	172	154	24
90	119	240	236		107	191	69	152	23
178	111	239	235		268	190	67	151	22
175	12	42	234		267	89	66	150	21
153	80	124	263		265	88	63	49	9
145	1	250			264	87	61	48	8
203	50	95			101	84	60	46	6
237	78	233			261	83	209	43	128
7	266				260	82	208	41	127
106					259	81	204	40	126
243					258	228	202	148	3
64					255	227	201	146	2
155					254	226	163	143	123
37					253	225	162	141	122
238					252	185	161	39	19
223					249	183	160	35	17
248					244	77	59	33	16
62					242	76	58	32	15
245					94	75	57	136	118
222					231	74	56	135	116
14					230	73	55	133	115
200					199	219	54	132	112
221					198	218	53	131	
220					197	217	51	130	
224					196	213	159	29	
30					195	210	157	26	

NOTA: As DSTs em vermelho correspondem aos hospitais do estudo (UNICAMP e HCFMUSP). Foram escolhidos 5 dos 28 grupos descritos por incluírem as DSTs observadas no presente estudo. As análises foram realizadas com 401 isolados/267 DST. Os grupos foram formados pelas DSTs com pelo menos 5 alelos idênticos.

FONTE: Programa eBURST 3.0 obtido no endereço: <http://eburst.mlst.net/>

Tabela 11- Comparação dos 32 isolados de *C. tropicalis* a partir de 14 pacientes quanto aos padrões de banda idênticos, gerados pelo RAPD (P1, P2, e P3) e PFGE (*Bss*HII) com a análise de ancestralidade por eBURST do MLST

Pacientes	Isolados	Padrões de bandas	eBURST
		Idênticos	5 alelos idênticos / 6 loci
1	1a vs 1c vs 1b	P1, P2, P3,BssHII	MLST Grupo 4
	1a vs 1c		
	1a vs 1b		
	1b vs 1c		
2	2a vs 2b	P3, BssHII	
3	3a vs 3b	Diferentes em todos os métodos moleculares	
4	4a vs 4b	P1, P2, P3	MLST Grupo não definido
5	5a vs 5b	P2, P3	MLST Grupo 4
6	6a vs 6b vs 6c	P1, P2, P3,BssHII	MLST Grupo 4
	6a vs 6b		
	6a vs 6c		
	6b vs 6c		
7	7a vs 7b	Diferentes em todos os métodos moleculares	
8	8a vs 8b	P1, P2	MLST Grupo 1
9	9a vs 9b vs 9c	P1, P2, P3, BssHII	MLST Grupo 18
10	10a vs 10b	P2, P3	MLST Grupo 6
11	11a vs 11b	Diferentes em todos os métodos moleculares	
12	12a vs 12b vs 12c	P2, P3	MLST Grupo 1
	12a vs 12b	P1	
	12a vs 12c	P2, P3	
	12b vs 12c	P2, P3, BssHII	
13	13a vs 13b	P3, BssHII	MLST Grupo 1
14	14a vs 14b	P1, P3, BssHII	

FONTE: Pacientes com infecção de corrente sanguínea dos hospitais, HCFMUSP e UNICAMP, de 1998 a 2003

NOTAS: Padrões idênticos: quando todas as bandas coincidem e apresentam 100% de similaridade, calculado pelo coeficiente de similaridade de Dice e Jaccard; estão destacados em cinza, os pacientes que não apresentaram nenhum isolado considerado idêntico entre si por todos os métodos moleculares (RAPD, PFGE com enzima de restrição BssHII e análise de ancestralidade de MLST).

4.3. Caracterização fenotípica dos isolados quanto à sensibilidade aos antifúngicos

Foram realizadas leituras de 150 placas, verificando-se crescimento fúngico suficiente para determinação das CIMs. Reforçando a confiabilidade nos resultados, as CIMs das cepas padrão (ATCC) de *C. parapsilosis* e *C. krusei* apresentaram resultados esperados compatíveis com a literatura.

Observou-se crescimento mais acentuado em 24 horas para o método EUCAST em relação às 48 horas do CLSI. A método proposto pelo CLSI apresentou crescimento em grumos (microcolônias) e bolhas, sendo necessárias medidas como agitação e quebra com agulha para facilitar as leituras.

Os valores das CIMs para Anfotericina B variaram de 0,06 a 1 µg/mL, destacando-se a sensibilidade de todos os isolados ao antifúngico e a concordância entre CLSI e EUCAST (**Tabela 12**).

O fenômeno de “trailing” tornou difícil a interpretação visual e espectrofotométrica das CIMs (principalmente no EUCAST), sendo, muitas vezes, impossível distinguir “trailing” de resistência. Observou-se de 21 a aproximadamente 50% dos isolados frente aos azóis, sendo 49,18 % em relação ao fluconazol, 22,95% ao voriconazol e 32,79% ao itraconazol.

Em relação ao fluconazol, os valores de CIM variaram de 0,25 a 64 µg/mL. A maior dificuldade de interpretação das CIMs ocorreu no EUCAST em relação ao CLSI, como mostra a **Tabela 13**. Destacam-se 18 isolados (29,51 %) nos quais o fenômeno de “trailing” dificultou a interpretação quanto à sensibilidade. Observou-se discordância quanto à CIM, entre CLSI e EUCAST, em 15 (24,59%) isolados e em 09 (64,3%) de 14 pacientes com mais de um isolado. Para ilustrar essa situação, o isolado 1b apresentou CIM igual a 1 µg/mL no CLSI e 64 µg/mL no EUCAST. O CLSI apresentou 06 (9,84%) isolados classificados como R/SDD e o EUCAST, 15 (24,59%) isolados com CIM maiores que 4 µg/mL. Concordância quanto à resistência entre os dois métodos ocorreram em 03 isolados (17,64%).

Os resultados da caracterização fenotípica dos isolados, quanto à sensibilidade ao fluconazol pelo método CLSI com RPMI pH igual a 5,0 foram: 1- Redução da

ocorrência do fenômeno de “trailing”, facilitando a leitura das CIMs; 2- Grande concordância entre as leituras realizadas em 24 e 48h, mostrando que os resultados do CLSI tiveram nesse experimento, resultados rápidos como EUCAST (**Tabela 13**); 3- Os controles com as cepas padrão obtiveram os resultados esperados, mostrando que o pH igual a 5,0 não inibiu o crescimento; 4- A ocorrência de grumos e bolhas foi maior com pH ácido, dificultando a leitura espectrofotométrica, sendo necessário agitar as placas por, pelo menos, 5 min antes da leitura visual e retirar as bolhas com alça de plástico estéril.

Os isolados 1b, 4b, 6c, 25 e 34 permaneceram com “trailing” após a acidificação do meio. Os isolados 3a, 3b, 5b, 12c, 22 e 25, com CIMs entre 16 e 64 $\mu\text{g/mL}$, com “trailing”, foram considerados SDD/resistentes ao fluconazol com o pH igual a 7,0. Quando os mesmos foram submetidos à acidificação do meio, apenas os isolados 5b, 12c e 25 permaneceram com CIMs maiores ou iguais a 32 $\mu\text{g/mL}$. Destacam-se os isolados 3a, 3b, 22 que foram considerados sensíveis ao fluconazol.

Estabelecendo-se uma comparação entre os resultados do EUCAST e CLSI (pH igual a 7,0 e pH igual a 5,0) para o fluconazol, pôde-se notar que, pelo EUCAST, os isolados 1b, 1c, 3a, 4b, 6a, 6b, 6c, 7b, 11a, 13b, 25, 35 e 37 apresentaram “trailing” (não se podendo definir se eram resistentes ou não). Empregando pH igual a 5,0, houve possibilidade de esclarecer que os isolados 5b, 12c e 25 foram considerados resistentes / SDD pelo CLSI (**Tabela 13**).

Em relação ao voriconazol, as CIMs variaram entre 0,015 e 8 $\mu\text{g/mL}$. O fenômeno de “trailing” dificultou a interpretação dos resultados em 14 isolados (23%). O CLSI apresentou 05 (8,19%) isolados classificados como R/SDD e o EUCAST 15 (24,6%) isolados com CIM maior que 0,125. Observou-se concordância quanto à resistência entre CLSI e EUCAST em 02 isolados (11,11%). (**Tabela 14**)

Os resultados das CIMs para itraconazol variaram entre 0,015 e 8 $\mu\text{g/mL}$ sendo visualizados na **Tabela 14**. Em 18 pacientes, o fenômeno de “trailing” dificultou a interpretação dos resultados.

A concordância entre os métodos quanto ao perfil de sensibilidade foi de 78,6 % para fluconazol, 72,13 % para itraconazol e 77,05 % para voriconazol.

Tabela 12: Distribuição dos 61 isolados de *C. tropicalis* de 43 pacientes com infecção de corrente sanguínea, quanto ao perfil de sensibilidade à Anfotericina B pelos métodos CLSI e EUCAST

Isolados	CLSI	EUCAST	S ≤ 1/ R > 1
	CIM µg/mL	CIM µg/mL	
1a	1	0,25	S
1b	1	1	S
1c	1	0,5	S
2a	0,5	0,25	S
2b	1	1	S
3a	0,5	1	S
3b	1	0,5	S
4a	1	0,5	S
4b	0,5	5	S
5a	1	1	S
5b	1	0,5	S
6a	1	0,5	S
6b	0,5	1	S
6c	1	0,5	S
7a	1	1	S
7b	1	0,5	S
8a	1	0,25	S
8b	1	0,5	S
9a	0,5	0,5	S
9b	0,5	0,5	S
9c	1	0,5	S
10a	1	0,5	S
10b	1	0,5	S
11a	0,5	0,5	S
11b	1	0,5	S
12a	1	0,25	S
12b	1	0,25	S
12c	1	0,5	S
13a	0,5	0,5	S
13b	1	0,25	S
14a	1	0,5	S
14b	1	0,5	S
15	0,5	0,5	S
16	1	0,5	S
17	1	0,5	S
18	1	1	S
19	1	0,5	S
20	1	0,5	S
21	1	0,5	S
22	1	0,5	S
23	1	0,5	S
24	1	1	S
25	1	0,5	S
26	0,5	0,5	S
27	1	1	S
28	1	1	S
29	0,5	0,25	S
30	1	0,5	S
31	0,5	1	S
32	1	0,5	S
33	1	1	S
34	1	0,5	S
35	0,5	1	S
36	1	1	S
37	1	0,5	S
38	1	1	S
39	1	0,5	S
40	0,5	1	S
41	1	0,5	S
42	1	0,5	S
43	1	0,06	S

NOTA: CIM = concentração inibitória mínima; S = sensível a anfotericina B

Tabela 13: Distribuição das CIMs de fluconazol $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ através de microdiluição em caldo pelas metodologias CLSI pH = 7,0 e 5,0 e EUCAST dos 18 isolados de *C. tropicalis* obtidas de 14 pacientes nos hospitais de ensino

Isolados	EUCAST	CLSI pH=7,0	CLSI pH=5,0	
			24h	48h
1b	64	1	1	1
1c	64	1	1	2
2a	8	2	1	2
3a	64	16	1	0,5
3b	2	64	2	1
4b	64	2	2	2
5b	1	64	32	64
6a	64	1	1	1
6b	64	0,25	0,5	0,5
6c	64	0,5	2	2
7b	64	1	0,25	0,5
11a	64	2	2	2
12c	1	64	32	64
13b	64	1	0,25	0,25
22	8	32	4	4
25	64	64	32	64
35	64	1	1	1
37	32	2	1	1

NOTA: CIM = concentração inibitória mínima; N = ausência do fenômeno de trailing; em cinza estão destacados os isolados que apresentaram pelo menos um método com resistência /sensibilidade dose dependente para o CLSI e resistência para o EUCAST.

Tabela 14 - Distribuição dos isolados de *C. tropicalis* quanto às CIMs de itraconazol e voriconazol consideradas R/SDD por, pelo menos, uma das metodologias CLSI e EUCAST

Isolados	Voriconazol (µg/mL)		Itraconazol (µg/mL)	
	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST
1b	0,25	8	0,06	0,5
1c	0,03	8	0,06	0,25
2a	1	0,03	0,12	0,015
2b	0,12	0,03	0,25	0,03
3a	8	0,12	8	0,03
3b	0,5	0,06	0,12	0,015
4b	0,25	0,06	0,12	0,5
5b	8	0,25	8	0,12
6a	0,25	8	0,12	1
6b	0,03	8	0,03	8
6c	0,12	8	0,03	0,25
7a	8	0,015	2	0,015
7b	0,12	8	0,03	1
10b	0,25	0,25	0,12	0,06
11a	0,25	8	0,12	0,5
12c	0,06	0,015	0,06	0,015
13b	0,25	0,12	0,03	0,015
14a	0,12	0,03	0,5	0,015
14b	0,5	0,25	0,06	0,015
18	0,12	0,06	0,25	0,015
22	8	8	0,25	8
25	8	0,12	0,25	1
29	0,06	0,25	0,06	0,015
31	0,25	4	0,015	1
33	0,03	1	0,03	0,06
35	0,25	0,06	0,06	0,03
37	0,12	8	0,03	1
TOTAL R/SDD	5	15	8	12

NOTA: Em vermelho estão representados os isolados Resistentes ou SDD (somente pelo CLSI). Em cinza estão destacados os isolados resistentes aos dois azólicos por algum dos métodos CLSI/EUCAST

4.4. Dados clínicos e laboratoriais de pacientes com fungemia hospitalar por *C. tropicalis* internados na UNICAMP

A **Tabela 15** mostra a distribuição de dados relativos à hemocultura positiva por *C. tropicalis* de 26 pacientes da UNICAMP (14 com mais de um isolado por paciente e 12 com um único isolado), uso prévio de antifúngicos, CIM ($\mu\text{g/mL}$) frente ao fluconazol, “breakthrough fungemia” e óbito. Os pacientes 1, 11 e 25 apresentaram hemoculturas positivas em vigência de antifúngicos.

O tratamento foi instituído após o resultado positivo da hemocultura/cultura de cateter em 19 pacientes, tendo sido no dia da hemocultura apenas nos pacientes 1, 4, 24 e 25.

Os pacientes 3, 16, 19, 21, 22, 23 e 26 não receberam tratamento antifúngico, dos quais 3, 16, 19 e 21 sobreviveram e 22 e 23 morreram sem tratamento. O paciente 26 morreu de causa não relacionada à candidemia três meses após o resultado positivo no cateter para *C. tropicalis*. Os pacientes 7, 11 e 18 permaneceram com o cateter central/hemodiálise a despeito da candidemia e os pacientes 7 e 11 evoluíram para óbito (**Tabela 15**). Na casuística estudada não houve uso de profilaxia de antifúngicos nos seis meses anteriores à candidemia.

Os pacientes 5, 12 e 25 apresentaram pelo menos um isolado com CIM de 64 $\mu\text{g/mL}$. Houve boa resposta ao tratamento com fluconazol no paciente 5, apesar da CIM de 64 $\mu\text{g/mL}$. Os antifúngicos mais utilizados foram anfotericina B em 12 e fluconazol em 4 pacientes e 2 receberam primeiro fluconazol e depois anfotericina B. Todos os pacientes tratados receberam as doses convencionais de antifúngicos. Não foram encontradas informações nos prontuários dos pacientes 8 e 12 pertinentes à pesquisa.

O **Paciente 1** (padrão molecular do isolado 1a é igual ao 1c e ambos diferentes do 1b) de 44 anos foi internado no dia 12/03/2003 com quadro de paracoccidiodomicose, diabetes, pancreatite alcoólica crônica e revascularização arterial de membros inferiores. Evoluiu para hemodiálise e sepse no dia 22/03/2003. A primeira hemocultura positiva para *C. tropicalis* (isolado 1a com CIM fluconazol de 0,5 $\mu\text{g/mL}$)

foi coletada em 22/03/2003 e o antifúngico fluconazol introduzido no dia 24/03/2003 sendo a mesma data do resultado positivo. O paciente persistiu com isolamento positivo em hemocultura no dia 31/03/2003 (isolado 1b com CIM fluconazol de 1,0 µg/mL). Após 05 dias da introdução do antifúngico/primeira hemocultura positiva, foi retirado o cateter de diálise sendo também positivo para a levedura no dia 31/03/2003 (isolado 1c com CIM fluconazol de 2,0 µg/mL). O paciente evoluiu para óbito no dia 06/03/2003.

O **Paciente 2** (isolado 2a é diferente do 2b pelo MLST) de 73 anos, com antecedente de adenocarcinoma gástrico e doença diverticular dos cólons, foi internado no dia 01/04/2002, no dia 10/06/2002 foi passado cateter venoso central. No dia 11/06/2002 foi para cirurgia de gastrectomia subtotal sendo transferido para UTI no pós-operatório imediato, evoluindo com hemodiálise e NPP. No dia 14/07/2002 foi introduzida Anfotericina B e nos dias 25 e 30/07/2002 apresentou culturas positivas para *C. tropicalis*. Evoluiu para óbito no dia 30/07/2002.

O **Paciente 3** (isolado 3a é diferente do 3b pelos três métodos moleculares) de 9 anos com diagnóstico de síndrome cerebelar aguda e síndrome convulsiva, internou em 30/04/2002 sendo necessário passagem de cateter venoso central e entubação oro traqueal. Em 25/05/2002 foi trocado cateter e em 23/06 2002, apresentou quadro febril.

As culturas de sangue e cateter do dia 25/06/2002 foram positivas para *C. tropicalis*, evoluindo para óbito sem tratamento.

O **Paciente 6** (padrão molecular idênticos dos isolados 6a e 6b, ambos diferentes do 6c) de 2 anos com antecedente de Síndrome de Down e cardiopatia grave internou no dia 28/04/2002 para correção cirúrgica da cardiopatia. Evoluiu séptico no dia 12/06/2002, ocasião onde foram colhidas hemoculturas e retirado o cateter central. As duas hemoculturas (isolados 6a e 6c) e cateter (isolado 6b) positivaram no dia 17/06/2002. No dia seguinte foi prescrita anfotericina B. O paciente evoluiu bem e teve alta hospitalar.

O **Paciente 7** (7a é diferente do 7b pelos três métodos moleculares) de 2 anos com antecedente de meningite meningocócica, anóxia pós parada cardiorespiratória, diabetes insipidus, síndrome de West, gastrostomia, infecções urinárias e respiratórias de repetição, muitas resultando em internações, acompanhando ambulatorialmente, interna no dia 03/09/2002 com sepse grave. No dia 02/09/2002 tem a primeira hemocultura positiva para *C. tropicalis* (isolado 7a) e a segunda no dia 08/09/2002 (isolado 7b). A terapia antifúngica foi administrada no dia 10/09/2002 no dia do óbito.

O **Paciente 11**, de 9 anos com antecedente de ingestão acidental de soda cáustica evoluiu com estenose cáustica do esôfago, estômago e fístula esôfago-mediastinal, internou no dia 26/08/2001 na unidade de terapia intensiva com quadro de sepse e insuficiência respiratória. No dia 12/09/2001 evoluiu com sepse novamente, foram colhidos 06 pares de hemocultura no dia 12/09/2001 (isolado 11a), 02 pares no dia 24/09/2001 (isolado 11b) e cultura de líquido pleural positiva do dia 23/09/2001. A Anfotericina B foi introduzida no dia 15/09/2001.

O **Paciente 18**, de 25 anos com antecedente de Sarcoma de Ewing, internou em 19/01/2002 pela oncologia com quadro de diarreia com giardíase, strongiloidíase, blastocistose, evoluindo com sepse, pneumonia e insuficiência respiratória. Foram colhidas 05 hemoculturas positivas para *C. tropicalis*. No dia 07/02/2002, foi prescrito fluconazol e o paciente evoluiu para alta hospitalar.

O **Paciente 25** de 62 anos, vítima de ferimento de arma de fogo, foi internado no dia 07/02/2003. Evoluiu com quadro séptico no dia 28/02/2003. No dia 01/03/2003 foi introduzido fluconazol, trocado para anfotericina B no dia 28/03/2003. A hemocultura foi positiva no dia 04/03/2003. O paciente evoluiu para óbito no dia 10/04/2003. A CIM para o fluconazol foi de 64 µg/mL.

Tabela 15 - Distribuição dos 44 isolados de *C. tropicalis* a partir de 26 pacientes da UNICAMP quanto a hemocultura/cateter, data do isolamento, o antifúngico isolado, perfil de sensibilidade ao fluconazol, *Breakthrough* fungemia e óbito

Paciente/idade	Isolados	Data HMC +	Dia do Antifúngico	Antifúngico	Retirada de CVC	FCZ CLSI µg/mL pH 5,0	Breakthrough	Óbito
1/44a	1a/S	24/03/03	D0	FCZ	31/03/03	0,5	Sim	08/07/03
	1b/S	28/03/03	D04			1		
	1c/C	31/03/03	D07			2		
2/74a	2a/C	25/07/02	D01	AmB	25/07/02	2	Não	Não
	2b/S	30/07/02	D06			2		
3/9a	3a/S	25/06/02	Sem tratamento	Sem tratamento	25/06/02	0,5	Não	Não
	3b/C	25/06/02				1		
4/9m	4a/C	21/04/03	D0	AmB	21/04/03	1	Não	Não
	4b/S	21/04/03	D0			2		
5/71a	5a/S	13/07/02	Sem tratamento	FCZ	Sem	1	Não	Não
	5b/S	24/07/02				D01		
6/2a	6a/S	17/06/02	Sem tratamento	AmB 18/06/2002	17/06/02	1	Não	Não
	6b/C	17/06/02				0,5		
	6c/S	17/06/02				2		
7/2a	7a/S	02/09/02	Sem tratamento	AmB 10/09/2002	Não	1	Não	10/09/02
	7b/S	08/09/02				0,5		
8/65a	8a/S	08/09/01	Sem dados					
	8b/C	10/09/01						
9/36a	9a/C	15/01/00	Sem tratamento	FCZ 18/01/2000	15/01/00	1	Não	20/02/00
	9b/S	15/01/00		1				
	9c/S	17/01/00		D0		0,5		
10/44a	10a/S	15/12/02	Sem tratamento	AmB 22/12/2002	22/12/02	1	Não	28/12/02
	10b/S	22/12/02				D0		
11/9a	11a/S	12/09/01	Sem tratamento	AmB 15/09/2001	Não	2	Sim	24/09/01
	11b/S	24/09/01				D09		
12/58a	12a/S	28/10/02	Sem dados					
	12b/S	31/10/02						
	12c/S	31/10/02						
13/64a	13a/S	14/10/02	Sem tratamento	AmB 16/10/2002	17/10/02	0,5	Não	20/10/02
	13b/C	17/10/02				D01		
14/3a	14a/S	03/01/01	Sem tratamento	AmB 05/01/2001	03/01/01	0,25	Não	07/01/01
	14b/C	03/01/01				1		
15/69a	15/S	11/01/01	Sem tratamento	AmB 15/01/2001	Sem dados	0,5	Não	21/01/01
16/11m	16/S	13/02/01	Sem tratamento	Sem tratamento	16/02/01	1	Não	Não
17/70a	17/C	04/02/02	Sem tratamento	AmB 05/02/2002	04/02/02	2	Não	11/02/02
18/25a	18/S	05/02/02	Sem tratamento	FCZ 07/02/2002	Não	2	Não	Não
19/72a	19/C	19/02/02	Sem tratamento	Sem tratamento	Não	1	Não	Não
20/1a	20/C	19/05/02	Sem tratamento	AmB 20/05/2002	19/05/02	0,5	Não	Não
21/9a	21/S	25/06/02	Sem tratamento	Sem tratamento	Não	0,5	Não	Não
22/27a	22/S	05/08/02	Sem tratamento	Sem tratamento	Não	4	Não	06/08/02
23/65a	23/S	25/09/02	Sem tratamento	Sem tratamento	Não	0,5	Não	24/09/02
24/17a	24/S	14/12/02	Sem tratamento	FCZ de 19-20/11/2002 e AmB 15/12/2002	22/12/02	0,5	Não	29/01/03
25/62a	25/S	04/03/03	D05	FCZ de 01/03/2003 e AmB 28/03/2003	11/03/03	64	Não	10/04/03
26/72a	26/C	28/03/03	Sem tratamento	Sem tratamento	28/03/03	0,5	Não	19/06/03

NOTA: S = isolados obtidos de hemocultura e C = isolados de cateter

FONTE: Dados obtidos de prontuários do HCFMUSP e UNICAMP no período de 1998 a 2003

DISCUSSÃO

5. Discussão

Este estudo, em nosso conhecimento, foi o primeiro a caracterizar os isolados múltiplos/sequenciais de *C. tropicalis* em infecção de corrente sanguínea por MLST na América do Sul. Foi responsável pela incorporação de 36 novas DSTs e 23 alelos no banco de dados oficial, permitindo a comparação dos nossos dados com os de outros países. Com a análise dos padrões genotípicos das amostras encontradas nas duas grandes cidades (através de técnicas de tipagem molecular MLST, PFGE e RAPD) foi possível encontrar polimorfismos de DNA, denominados microvariações e macrovariações, em pacientes com candidemia que tiveram isolados sequenciais a partir de sangue e/ou de cateter.

Na literatura ainda não está bem definido qual o método padrão ouro para caracterização molecular de *C. tropicalis*, embora o PFGE com enzima de restrição, tenha sido muito utilizado em trabalhos de descrição de surtos, séries de casos e banco de cepas. Dentre as principais enzimas de restrição utilizadas em várias espécies de *Candida* destacam-se *Bss*HII e *Sfi*I. Chou et al. (2007a) e Chen et al. (2009) obtiveram os melhores resultados do PFGE com a enzima *Nae*I.

No presente trabalho, o método de PFGE com a enzima *Bss*HII apresentou poder discriminatório de 82,18%, em contraste com os valores maiores que 90% descritos por Chen et al. (2009). Salienta-se que várias enzimas de restrição foram testadas (*Sfi*I, *Nae*I (*Pdi*I), *Nae*I (*Pdi*I) FastDigest, *Bss*HII, *Sma*I e *Sma*I FastDigest), em diferentes concentrações e variações dos métodos preconizados, em função da dificuldade de interpretação dos géis e da grande quantidade e intensidade das bandas.

As enzimas “FastDigest” não funcionaram, provavelmente, porque estão padronizadas para corte enzimático de outros microorganismos como, por exemplo, bactérias. Em relação aos resultados do PFGE com *Sfi*I, o corte enzimático não conseguiu detectar diferenças entre os isolados do HCFMUSP, talvez por se tratar de uma população de isolados com baixa variabilidade genética associada a uma baixa capacidade de discriminação da enzima.

O RAPD mostrou ser uma técnica de fácil execução e reprodutibilidade evidenciada pelos resultados semelhantes obtidos nas repetições, apesar da necessidade

de serem testados vários iniciadores em várias condições, com mesmo tempo de bancada e de critérios rígidos na seleção de reagentes e controles.

Analisando-se os isolados múltiplos de um mesmo paciente por RAPD (com os iniciadores P1, P2 e P3) e PFGE (*Bss*HII), pelo menos 50% dos 32 isolados apresentaram 2 ou mais bandas diferentes amplificadas. Comparando-se os polimorfismos, observou-se que os isolados dos pacientes 3, 6, 7, 11 ficaram distantes dos seus pares. Esses resultados mostram que as duas técnicas apresentaram capacidade de diferenciação similar na análise de grandes diversidades genéticas entre os isolados sequenciais de um mesmo paciente.

Comparando-se as técnicas PFGE e RAPD nas amostras do HCFMUSP, o perfil observado apresentou um padrão similar de bandas entre os isolados, da mesma forma que o padrão apresentado pela maioria das amostras UNICAMP. Os iniciadores P1, P2 e o PFGE apresentaram baixa variabilidade genética entre os isolados do HCFMUSP. O iniciador P3 revelou concordância em relação aos outros iniciadores e ao PFGE em 11 isolados.

Em relação à exequibilidade, o RAPD mostrou-se mais objetivo na análise da intensidade e do número de bandas obtidas nas corridas eletroforéticas. O ponto crucial para ambas as técnicas está na seleção de enzimas de restrição para o PFGE e seleção dos iniciadores com maior poder discriminatório para o RAPD.

Em relação ao MLST, foi possível caracterizar isolados sequenciais de *C. tropicalis* em pacientes com candidemia, obtendo-se 39 DSTs (36 novas) e 73 alelos (23 novos). A taxa de descrição de novos alelos (31,5%) em nosso estudo foi menor do que o número de novas DSTs encontradas (92%), assim como observado por Odds e Jacobsen (2008) em *C. albicans*. Esses dados reforçam em *C. tropicalis* a teoria proposta por estes autores em *C. albicans*, de que possa haver uma tendência de conservação dos alelos e um aumento de combinação entre eles.

Nos hospitais estudados, a diversidade genotípica entre os isolados foi grande, apresentando poder discriminatório de 97,4%. Em relação a outros estudos com *C. tropicalis*, o resultado do poder discriminatório do presente estudo foi discretamente menor que o previamente descrito por Tavanti et al. (2005) de 99% e maior do que os

91,6% descrito por Chou et al. (2007b). Estabelecendo-se comparação com as outras técnicas de tipagem molecular estudadas no presente trabalho, o poder discriminatório do RAPD e do PFGE foi similar, sendo de 83,47% e 82,18%, respectivamente, mas inferior ao MLST.

Com relação à exequibilidade, a técnica de MLST, embora relativamente simples (PCR dos fragmentos dos genes, purificação do produto amplificado, dosagem e sequenciamento), mostrou-se trabalhosa na execução. A técnica de PFGE com enzima de restrição foi mais trabalhosa e de mais difícil interpretação. Em relação às principais críticas do RAPD, nas condições do presente estudo, foi considerado reprodutível, observando-se padrões de banda de fácil determinação. Estabelecendo-se comparação entre as três técnicas utilizadas nesse estudo, em relação à leitura das bandas, o MLST é mais objetivo que o RAPD e o PFGE, que exigem a interpretação subjetiva dos padrões de bandas de fragmentos de DNA. A etapa mais subjetiva do MLST está na análise dos cromatogramas (que é visual) em busca de heterozigose.

As etapas críticas para obtenção da caracterização molecular pela análise dos multilocus gênicos estão listadas abaixo:

1- Qualidade do seqüenciamento em função da necessidade de avaliação visual criteriosa dos cromatogramas, principalmente nas regiões de heterozigose. Uma questão central está na interpretação da heterozigose em microorganismos diplóides a qual *C. tropicalis* faz parte (Odds et al., 2006; Odds e Jacobsen., 2008, Jacobsen et al., 2008b).

2- Análise haplotipa. A subjetividade da análise visual e a necessidade de cuidadosa avaliação dos cromatogramas em busca de heterozigose para a identificação dos SNPs é fundamental para a posterior análise haplotipa correta.

3- Alinhamentos das sequências encontradas e a relação com outras espécies (GeneBank e o endereço eletrônico oficial do MLST).

4- Inclusão das sequências para validação das DSTs pelo endereço eletrônico oficial, <http://pubmlst.org/ctropicalis/>. Esta etapa é crucial para a confiabilidade dos resultados obtidos e nas comparações com as DSTs descritas no mundo. Os critérios para a inclusão dos alelos e DSTs novas são muito rígidos.

5- Construção da árvore filogenética ideal. Muitos estudos que analisam múltiplos isolados encontram grande dificuldade de utilização dos métodos de agrupamento/filogenia probabilísticos porque necessitam de muito tempo computacional. Por esse motivo a maior parte dos estudos utiliza o UPGMA.

6- Análise e identificação de ancestral comum pelo programa eBURST. Para *C. tropicalis*, ainda existe um número muito grande de isolados classificados como singleton, ou seja, sem antecedente comum. Essa limitação deve ser parcialmente solucionada à medida que forem aumentando o número de isolados e DSTs inseridas no banco de dados mundial. No presente estudo, das 39 DSTs encontradas 15 (38,4%) foram classificadas como singletons, ou seja, ainda sem ancestral comum.

Outra limitação deste método é o quanto que os seis genes descritos representariam o genoma como um todo, uma vez que o MLST analisa somente os fragmentos do DNA previamente descritos por Tavanti et al. (2005). Essa padronização ocorreu para um conjunto de isolados restritos a poucas áreas geográficas (especialmente Europa e Asia) e até 22 de agosto de 2012 estavam descritos apenas 401 isolados e 267 DSTs. A última atualização foi em 02/04/2012 com os isolados desse trabalho. Esses dados mostram que há um pequeno número de dados oficiais de *C. tropicalis* em relação a *C. albicans* com 2062 DSTs (<http://calbicans.mlst.net/>).

Uma questão central para a interpretação dos polimorfismos encontrados, principalmente no estudo de isolados sequenciais de um mesmo paciente, está nos cuidados com contaminação, seleção em cultura e pressão seletiva de antifúngicos. A pressão seletiva de determinadas substâncias podem selecionar isolados/clones mais bem adaptados e por esse motivo apresentarem pequenas ou grandes variações em qualquer parte do genoma. Essas variações podem ocorrer nos fragmentos de genes do MLST mesmo sem estarem responsáveis diretamente por resistência aos antifúngicos.

De acordo com estudos prévios, as variações dos isolados do mesmo paciente pode ser explicada pela contaminação cruzada durante o transporte e os tempos de armazenamento (Tavanti et al., 2005) ou devido à polimorfismos relacionados com o uso de drogas antifúngicas (Odds et al., 2007). O presente estudo foi realizado em um dos laboratórios da mesma instituição (HCFMUSP) e os isolados de 1998 a 2000 foram

monitorados desde 1998 para excluir a possibilidade de contaminação. Isolados UNICAMP de 2001 a 2003 foram mantidos no Laboratório de Micologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP de 2001 a 2003. Todos os isolados foram transferidos diretamente para o Laboratório de Investigação Médica (LIM 48), onde foram imediatamente reidentificados e confirmados como *C. tropicalis*, antes do início das análises. Desde então, as amostras foram mantidas num Laboratório único e cuidadosamente monitorizadas durante o trabalho. Todos os isolados e o DNA extraído após a confirmação da espécie foram congelados. Embora haja possibilidade de seleção em cultura por alguns repiques no interior do laboratório, pelo critério utilizado, foi pouco provável.

Em relação às diferenças obtidas em isolados sequenciais de um mesmo paciente, descrevendo melhor os achados da literatura, Tavanti et al. (2005) encontraram um isolado de um mesmo paciente, agrupado pela análise filogenética por neighbor-joining, bem distante dos demais, sendo considerado pelos autores como provável erro de manutenção ou manipulação do isolado em laboratório. Segundo esse trabalho, a principal explicação para essa exceção à tendência “normal” de isolados sequenciais de um mesmo paciente serem altamente semelhantes por MLST, seriam problemas com o transporte e tempo de estocagem, que no caso envolveu vários (três) países, aumentando assim a possibilidade de contaminação cruzada. Os autores sugeriram estudos de maior vigilância de isolados, para uma possível explicação para esses polimorfismos, inclusive isolados submetidos à pressão de antifúngicos. Segundo Odds et al. (2007), a técnica de MLST em isolados sequenciais de *C. albicans* e *C. glabrata* de pacientes com candidemia costuma apresentar o mesmo padrão de DST, mas consideram a possibilidade de se encontrar padrões diferentes em culturas repetidas.

O MLST pode detectar pequenas e grandes mudanças de nucleotídeos, onde visualizamos pontualmente as diferenças, seja por mutação ou por eventos de recombinação, conforme descritos por Jacobsen et al. (2008). Essas pequenas mudanças entre os nucleotídeos obtidas pela análise pelo MLST podem ser denominadas como microvariações. As microvariações estão relacionadas ao ganho ou perda de heterozigose, podendo ocorrer de forma variável, e ainda pouco estudadas, em um ou

mais genes assim como descritas em vários trabalhos entre os quais, Forche et al. (2005), Odds et al. (2006) e Jacobsen et al. (2008).

Em relação aos isolados múltiplos/sequenciais de um mesmo paciente, a técnica de MLST foi capaz de detectar microvariação/macrovariação nos isolados sequenciais de 13 pacientes. A microvariação em um único fragmento de gene foi detectada entre os isolados sequenciais de oito pacientes. Estas pequenas alterações genéticas ocorreram em 1-5 posições de nucleótidos. A macrovariação ocorreu entre os isolados de quatro pacientes, especialmente os isolados de pacientes 2, 3, 7 e 11, que apresentaram diferenças em pelo menos cinco fragmentos de genes sequenciados. Mudanças genéticas em dois fragmentos de genes foram encontradas em dois pacientes. Os resultados obtidos foram consistentes com Jacobsen et al. (2008) e Chen et al. (2009), durante um estudo prospectivo de vigilância nas UTIs de adultos, onde encontraram em diferentes sítios anatômicos do mesmo paciente, vários casos de alterações relacionadas a heterozigose em um ou mais genes entre 11 pacientes com isolados de *C. tropicalis*.

Jacobsen et al. (2008) avaliaram, por MLST, as diferenças entre 18 pares de isolados de *C. tropicalis* e um conjunto de cinco isolados provenientes da mesma fonte. Encontraram polimorfismos entre 7 dos 18 pares de isolados. Os principais polimorfismos encontrados entre os isolados desses 7 pares foram: 1- três pares de isolados onde as diferenças foram em um único ponto (SNP), heterozigótica-homozigótica, em um único gene; 2- dois isolados pareados com perdas de múltiplas de heterozigoses em um único gene e 3- os dois pares restantes com diferenças em múltiplos genes. Entre o conjunto de cinco isolados provenientes da mesma fonte, as diferenças heterozigóticas-homozigóticas, ocorreram em dois genes para 4 dos isolados. O quinto isolado apresentou perda completa de heterozigose em cinco dos seis genes sequenciados em comparação com os outros quatro isolados. Os autores consideraram os resultados raros, mas foram semelhantes aos descritos anteriormente para múltiplos isolados de *C. albicans* (Odds et al., 2006) e intra-familiar de *C. albicans* (Bougnoux et al., 2006).

Em pacientes com candidemia persistente ou recorrente, Da Matta et al. (2010) analisaram 21 isolados de *C. albicans* de oito pacientes em um estudo multicêntrico de vigilância, e com exceção de um paciente com 3 DSTs diferentes, todos os isolados de sete pacientes apresentaram a mesma DST, o mesmo padrão por tipagem ABC e o mesmo perfil de sensibilidade aos antifúngicos.

Em outro estudo, Bourgnoux et al. (2008), em UTI, encontraram 32 isolados de pacientes com diagnóstico de candidemia por *C. albicans* e 118 isolados de candidúria, tipados por MLST. Entre nove pacientes que apresentaram simultaneamente isolados com candidemia e candidúria, apenas um paciente apresentou isolados com diferentes DSTs. Esses isolados apresentaram diferenças em um único locus, sugerindo que eles são, muito provavelmente, evolutivamente relacionados. Em nosso estudo, os isolados sequenciais de 13 dos 14 pacientes tiveram DSTs diferentes, não sendo um evento raro e, além disso, dois deles com diferentes perfis de sensibilidade ao fluconazol.

Em contraste com o presente estudo, Shin et al. (2007), estudando 41 isolados sequenciais de *C. glabrata* provenientes de 15 pacientes com candidemia persistente, mostraram que os isolados sequenciais apresentaram a mesma DST pelo MLST. Além disso, constataram que é possível adquirir resistência aos azólicos durante a candidemia especialmente sobre pressão seletiva de antifúngicos. Em outro estudo, Lott et al. (2012) avaliando isolados de *C. glabrata* de corrente sanguínea e isolados de candidíase não invasiva, não encontraram associação significativa entre DST e resistência ao fluconazol. Nesse estudo, assim como no anterior, o MLST apresentou baixo poder discriminatório.

Em nosso estudo não se encontrou relação entre DSTs e CIMs de fluconazol, bem como associação de alelos/genótipos associados com determinados perfis de sensibilidade, apesar dos isolados sequenciais apresentarem padrões diferentes por MLST. A relação entre determinadas DSTs e perfil de resistência antifúngica ou fenômeno de trailing tem sido descrita. Chen et al. (2009), em *C. tropicalis*, relacionaram a DST 164 (MLST Grupo II) com CIM elevada para fluocitosina. Em outros estudos, Chou et al. (2007b) e Li et al. (2009), em *C. tropicalis*, encontraram associação entre a DST 140 e sensibilidade reduzida ao fluconazol. Os primeiros autores

também relataram uma associação entre DST e fenômeno de “trailing”. Além disso, Li et al. (2009) descreveram vários alelos associados com baixos valores de CIMs ao fluconazol (alelos 3 do *ICLI*; 9 do *MDR1*; 1 do *SAPT2*; 3, 6 e 10 do *SAPT4*; 48 do *XYR1* e 7 do *ZWF1a*). Em nosso estudo, não foi encontrada a DST 140 e, em contraste com o estudo acima, os alelos 48 (*XYR1*) e 6 (*SAPT4*) apresentaram isolados sensíveis e resistentes ao fluconazol.

Adicionalmente, MLST foi capaz de detectar diferenças importantes entre isolados sequenciais de sangue e cateter. Os resultados mostraram que em alguns pacientes, a princípio, não se pôde excluir a existência de mais de um clone de *C. tropicalis* no hospedeiro ou que o cateter talvez não tenha sido a origem da candidemia.

Em resumo, os polimorfismos das amostras múltiplas sequenciais de *C. tropicalis* de um mesmo paciente registradas na literatura podem ser explicadas pelas seguintes razões:

- 1- Possibilidade de infecção por mais de um clone;
- 2- Seleção por repiques sucessivos;
- 3- Mutação do isolado por pressão seletiva de antifúngicos;
- 4- Contaminação dentro do laboratório/banco de cepas/transporte;
- 5- Reprodutibilidade baixa da técnica utilizada;

No presente estudo, as principais explicações para a situação de divergência genética entre os isolados sequenciais obtidos do mesmo paciente, uma vez tendo-se verificado todas as precauções cabíveis para contaminação, seria a possibilidade de infecção por mais de um clone e eventual seleção em cultura.

Portanto, o MLST foi uma ferramenta importante para o estudo da diversidade genética entre os isolados sequenciais de *C. tropicalis*, especialmente em relação aos polimorfismos dos fragmentos de genes estudados. Ele permitiu estudar a origem da candidemia e a relação desta com o cateter. Além disso, pode auxiliar no estudo da relação entre os diversos clones encontrados com diferentes perfis de sensibilidade aos antifúngicos e confirmar que essas discordâncias podem estar presentes em amostras sequenciais de pacientes com candidemia.

Com relação à análise fenotípica, os métodos CLSI e EUCAST mostraram limitações na determinação das CIMs dos isolados de *C. tropicalis* frente aos azóis, destacando-se a presença do fenômeno de “trailing” aos azólicos especialmente ao fluconazol.

A utilização do RPMI com pH igual a 5,0 no método CLSI para o fluconazol foi essencial para facilitar a distinção entre “trailing” e resistência. Apresentou redução considerável do fenômeno de “trailing” facilitando a leitura visual das placas e consequente determinação das CIMs, onde apenas três isolados permaneceram com CIM igual a 64 µg/mL.

No EUCAST, notou-se grande discordância entre os resultados de cepas resistentes/SDD em relação ao CLSI. Esse fato pode ser explicado pela alta frequência do fenômeno de “trailing” no EUCAST dificultando muito a determinação das CIMs e possibilitando que isolados sensíveis sejam consideradas falsamente resistentes. Espinel-Ingroff et al. (2005) relataram que a concordância entre os métodos é espécie específica e dependente do antifúngico empregado, e também observaram grandes discrepâncias quanto às CIMs. Cuenca-Estrella et al. (2002) testando diferentes espécies de *Candida spp.* registraram os mais baixos níveis de concordância entre CIMs para *C. tropicalis*, (93,1% para Anfotericina B, 88,5% para Fluconazol e 78,8% para Itraconazol). No presente estudo a concordância entre os métodos quanto ao perfil de sensibilidade foi 100% para anfotericina B, 78,6 % para fluconazol, 72,13 % para itraconazol e 77,05 % para voriconazol.

A questão central do estudo do perfil de sensibilidade dos isolados foi a dificuldade de discernir entre fenômeno de “trailing” e resistência. Os índices de resistência de *C. tropicalis* aos azólicos, segundo o método padronizado pelo CLSI, variam de 3 a 32%. Esta variação pode ser explicada pelo fenômeno de “trailing”. St-Germain et al. (2001) sugeriram que este fenômeno parece ser espécie específica para isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Em 764 isolados, os autores encontraram 98% de fenômeno de “trailing” tanto para o fluconazol quanto para o itraconazol. Arthington-Skaggs et al. (2002) mostraram que entre fluconazol e itraconazol 39 a 59% de seus isolados de *C. tropicalis* testados apresentaram fenômeno de “trailing” em comparação a

16 a 18% em *C. albicans*. Assim, esse fenômeno parece ser uma característica marcante da espécie *C. tropicalis*.

Com relação ao perfil de resistência, os pacientes 5 e 12, com isolados sequenciais diferentes em relação às DSTs, apresentaram isolados resistentes ao fluconazol, sendo que o paciente 5 não teve história prévia de uso de antifúngicos e os dados de prontuário referente ao episódio de candidemia não foram encontrados para o paciente 12.

Não houve correlação entre DST encontrada e óbito nos dois hospitais, bem como com as outras técnicas RAPD e PFGE. Não houve relação entre CIMs a antifúngico e determinados genótipos identificados por tipagem molecular por RAPD, PFGE e MLST.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

1. A técnica de MLST apresentou maior poder discriminatório e objetividade na leitura em relação ao PFGE e RAPD, com a vantagem de permitir análise de ancestralidade e a utilização de métodos probabilísticos para análise filogenética.
 - a. O estudo incorporou novos alelos e novas DSTs do Brasil no banco de dados mundial (02/04/2012), constituindo-se no primeiro trabalho sobre amostras sequenciais em candidemia da América do Sul segundo nosso conhecimento;
 - b. Em isolados sequenciais de sangue e cateter de pacientes com candidemia, a técnica permitiu detectar a presença de microvariação em cerca de metade dos isolados e, mais raramente, a presença de macrovariação. Essas variações nas sequências de DNA, diferentemente da literatura, foram detectadas em mais de dois terços dos isolados múltiplos/sequenciais estudados.
2. A técnica de caracterização molecular PFGE com a enzima de restrição *Bss*HII mostrou melhor poder discriminatório em relação a outras enzimas testadas, *Sfi*I, *Nae*I (*Pdi*I), *Nae*I (*Pdi*I) FastDigest, *Sma*I e *Sma*I FastDigest, embora com poder discriminatório inferior à literatura. As etapas críticas desse método estão na padronização, na escolha das enzimas e na interpretação das bandas.
3. A técnica de RAPD com os oligonucleotídeos iniciadores P1 e P2 mostrou melhor capacidade discriminatória que o P3 que, no entanto, foi o único capaz de discriminar dois isolados sequenciais de um mesmo paciente, sugerindo a necessidade de seleção e uso de vários iniciadores para tal análise. A técnica de RAPD mostrou-se reprodutível e de fácil execução, exigindo, porém, rígidos controles em todas as etapas de execução.

4. Apesar das três técnicas de caracterização molecular estudadas apresentarem diferentes capacidades discriminatórias, o RAPD (com os iniciadores P1, P2, e P3), PFGE com a enzima de restrição *Bss*HII e MLST foram capazes de discriminar três dos isolados com maior polimorfismo da presente casuística.
5. Em relação ao perfil de sensibilidade de *C. tropicalis* aos antifúngicos pelo emprego dos métodos padronizados CLSI e EUCAST:
 - a. A técnica de EUCAST, em função do fenômeno de trailing, apresentou dificuldade na interpretação da sensibilidade aos azólicos, apesar da objetividade das leituras (espectrofotométrica) e facilidade de execução.
 - b. Em relação aos azólicos (fluconazol, itraconazol e voriconazol), o método EUCAST apresentou percentuais de isolados classificados como resistentes superiores aos do CLSI. Todos isolados foram sensíveis a anfotericina B e concordantes entre CLSI e EUCAST.
 - c. Entre os isolados estudados, a utilização do RPMI com pH igual a 5,0 no método CLSI para o fluconazol facilitou a determinação das CIMs, mostrando ser uma importante ferramenta para esclarecer a susceptibilidade de isolados que apresentaram o fenômeno de “trailing”.
6. Não houve correlação entre perfil genético gerado pelas técnicas de caracterização molecular estudadas e o perfil fenotípico através do teste de sensibilidade aos antifúngicos conforme relatado na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivaria S. The epidemiology of Hematogenous Candidiasis Caused by Different *Candida* species. *Clin Inf Dis*. 1997; 24: 1122-1128.

Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats, Gimenez M, Saballs P, Fridkin Sk, Morgan J, Rodriguez-Tudela, Warnock DW, Pahissa A, and the Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microb*. 2005; 43:1829–35.

Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, Frade JP, Brandt ME, Hajjeh RA, Harrison LH, Sofair AN, Warnock DW. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2002; 46: 2477–81.

Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infection Surveillance System. *Am J Med*. 1991;91: 86S-9S.

Bedini A, Venturelli C, Mussini C, Guaraldi G, Codeluppi M, Borghi V, Rumpianesi F, Barchiesi F, Esposito R. Epidemiology of candidaemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12: 75–80.

Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res.* 2008; 8(3):442-50.

Bougnoux ME, Kac G, Aegerter P, d'Enfert C, Fagon JY; CandiRea Study Group. 2008. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med.* 34(2): 292-9.

Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C (2002) Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 40:1290–7.

Bougnoux ME, Diogo D, Francois N, Sendid B, Veirmeire S, Colombel JF, Bouchier C, Van KH, d'Enfert C, Poulain D. Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1810–20.

Buchman T G, Rossier M, Merz W G, Charache P. Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification of *Candida albicans* by in vitro amplification of fungus-specific gene. *Surgery.* 1990, 108:338-47.

Chen KW, Chen YC, Lin YH, Chou HH, Li SY. The molecular epidemiology of serial *Candida tropicalis* isolates from ICU patients as revealed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Genet Evol.* 2009;9(5):912-20.

Chou HH, Lo HJ, Chen KW, Liao MH, Li SY. Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows clonal cluster enriched in isolates with resistance or trailing growth of fluconazole. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007b;58(4):427-33.

Chou HH, Chiou CS, Chen KW, Li SY. Suitable restriction enzymes for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Candida tropicalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007a;57:451-4.

Clancy CJ, Staley B, Nguyen MH. In vitro susceptibility of breakthrough *Candida* bloodstream isolates correlates with daily and cumulative doses of fluconazole. *Ant. Ag Chemoth*. 2006;50:3496-8.

Clemons KV, Feroze F, Holmberg K, Stevens DA. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. *J Clin Microbiol*. 1997; 35:1332-6.

Clinical Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard* – Third edition. CLSI document M27 – A3. Wayne , Pennsylvania: 2008; 28(14):1-25.

Colombo AL, Guimarães T, Silva LR, de Almeida Monfardini LP, Cunha AK, Rady P, Alves T, Rosas RC. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28(5):570-6.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthington-Skaggs B, da Matta A, Warnock D, Morgan J; Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 2816-23.

Costa S F, Marinho I, Araújo E A P, Manrique A E I, Medeiros E A S and Levin A S. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective. *J Hosp Infect.* 2000;45: 69-72.

Cota IN. *Fungemia por Candida tropicalis: descrição de pacientes internados no HC FMUSP* [dissertação]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW, Donnelly JP, Dromer F, Dupont B, Rex JH, Richardson MD, Sancak B, Verweij PE, Rodriguez-Tudela JL; AFST Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9: 467-74.

Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs, BA, Mellado E, Warnock DW, Rodriguez-Tudela JL. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Ant Ag Chemoth.* 2002;46: 3644-7.

Cunha AKB. *Caracterização Epidemiológica e Microbiológica dos Episódios de Candidemia por Candida tropicalis* [dissertação]. São Paulo. Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. 2003.

Da Matta DA, de Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJ, Travassos NF, Salomão R, Colombo AL. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57(4):399-404.

Da Matta DA, Melo AS, Guimarães T, Frade JP, Lott TJ, Colombo AL. Multilocus sequence typing of sequential *Candida albicans* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *Med Mycol*. 2010;48(5):757-62.

Das I, Nightingale P, Patel M, Jumaa P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. *Int J Infect Dis*. 2011;15(11):759-63.

De Bernardis F, Mondello F, San Millan R, Ponton J, Cassone A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3481-6.

Doebbeling BN, Hollis RJ, Isenberg HD, Wenzel RP, Pfaller MA. Restriction fragment analysis of a *C. tropicalis* outbreak of sternal wound infections. *J Clin Microbiol*. 1991;29:1268-70.

Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*. 1999;29:239-44.

Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL, Verweij PE. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida spp.* to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3884-9.

Espinel-Ingroff A, Canton E, Peman J, Rinaldi MG, Fothergill AW. Comparison of 24-hour and 48-hour voriconazole MICs as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method (M27-A3 document) in

three laboratories: results obtained with 2,162 clinical isolates of *Candida spp.* and other yeasts. *J Clin Microbiol.* 2009;47(9):2766-71.

Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research.* 1998b;8:186–94.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research.* 1998a;8:175–85.

Falagas ME, Apostolou KE, Pappas VD. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case–control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25:419–25.

Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida spp.* among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis.* 2010;14(11):954-66.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985;39:783-91.

Forche A, May G, Magee PT. Demonstration of loss of heterozygosity by single-nucleotide polymorphism microarray analysis and alterations in strain morphology in *Candida albicans* strains during infection. *Eukaryot Cell.* 2005;4(1):156-65.

Fraser VJ, Jones M, Dunkel J, Storfer S, Medoff G, Dunagan WC. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin Infect Dis.* 1992;15:414-21.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande BJ, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*. 2003;37:1172-7.

Hitchcock CA, Pye GW, Troke PF, Johnson EM, Warnock DW. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Ant Ag Chemother*. 1993;37:1962-5

Holmberg K, Feroze F. Evaluation of an optimized system for random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for genotypic mapping of *Candida albicans* strains. *J Clin Lab Anal*. 1996;10:59-69.

Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1695–1703.

Hunter PR, Fraser CA. Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 1989;27:2156-60.

Hunter, PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol*. 1990;28:1903-5.

Jacobsen MD, Rattray AM, Gow NA, Odds FC, Shaw DJ. Mitochondrial haplotypes and recombination in *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2008;46 (7):647-54.

Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics*. 2004;5:86.

Karlowsky JA, Zhanel GG, Klym KA, Hobam DJ, Kabani AM. Candidemia in Canadian Tertiary Care Hospital from 1976 a 1996. *Diag Microbiol Inf Dis*. 1997;29:5-9.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16:111-20.

Kontoyiannis DP, Reddy BT, Hanna H, Bodey GP, Tarrand J, Raad II. Breakthrough candidemia in patients with cancer differs from de novo candidemia in host factors and *Candida* species but not intensity. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002;23(9):542-5.

Kontoyiannis DP, Vaziri I, Hanna HA, Boktour M, Thornby J, Hachem R, Bodey GP, Raad II. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin Inf Dis*. 2001;33:1676-81.

Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, 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). *Crit Care Med*. 2009;37(5):1612-8.

Li SY, Yang YL, Lin YH, Ko HC, Wang AH, Chen KW, Wang CW, Chi H, Lo HJ; TSARY Hospitals. Two closely related fluconazole-resistant *Candida tropicalis* clones circulating in Taiwan from 1999 to 2006. *Microb Drug Resist*. 2009;15(3):205-10.

Lin D, Lehmann PF. Random amplified polymorphic DNA for strain delineation within *Candida tropicalis*. *J Med Vet Mycol*. 1995;33(4):241-6.

Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, Morrison CJ. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3505-11.

Lott TJ, Frade JP, Lyon GM, Iqbal N, Lockhart SR. Bloodstream and non-invasive isolates of *Candida glabrata* have similar population structures and fluconazole susceptibilities. *Med. Mycol.* 2012;50(2): 136-42.

Magee PT, Bowdin L, Staudinger J. Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2674-9.

Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, Singh R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2007;54(3):201-35.

Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD, Sofair AN, Huie-White S, Wilcox S, Harrison LH, Seaberg EC, Hajjeh RA, Teutsch SM. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005;26(6):540-7. Erratum in: *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005;26(8):675.

Motta AL, Almeida GM, Almeida Júnior JN, Burattini MN, Rossi F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Braz J Infect Dis.* 2010;14(5):441-8.

Muñoz P, Giannella M, Fanciulli C, Guinea J, Valerio M, Rojas L, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. *Candida tropicalis* fungaemia: incidence, risk factors and mortality in a general hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(10):1538-45.

Myoken Y, Kyo T, Fujihara M, Sugata T, Mikami Y. Clinical significance of breakthrough fungemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematologic malignancies. *Haematologica*. 2004; 89(3):378-80.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard – second edition. NCCLS document M27 – A2*. Wayne , Pennsylvania: National Committee For Clinical Laboratory Standards. 2002;22(15):1-51.

Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;58(1):77-82.

Odds FC, Davidson AD, Jacobsen MD, Tavanti A, Whyte JA, Kibbler CC, Ellis DH, Maiden MC, Shaw DJ, Gow NA. *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3647-58.

Odds FC, Hanson MF, Davidson AD, Jacobsen MD, Wright P, Whyte JA, Gow NA, Jones BL. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. *J Med Microbiol*. 2007;56:1066-75.

Odds FC, Jacobsen MD. Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 2008;7:1075-84.

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE; NIAID Mycoses Study Group. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy and influence on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis*. 2003;37:634-43.

Park BJ, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA, Iqbal N, Ciblak MA, Lee-Yang W, Hairston MD, Phelan M, Plikaytis BD, Sofair AN, Harrison LH, Fridkin SK, Warnock DW. Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Ant Ag Chemoth.* 2006;50:1287-92

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, Messer SA; SENTRY Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3254-9.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, Coffman S, Hollis RJ. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997–1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:747-51.

Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of Nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diag Microbiol Inf Dis.* 1998;30:121-9.

Price M, LaRocco MT, Gentry LO. Fluconazole susceptibilities of *Candida* species and distribution of species recovered from blood cultures over a 5 – Year Period. *Ant Ag Chemoth.* 1994;38(6):1422-7.

Rentz AM, Halpern MT, Bowden R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clin Infect Dis.* 1998;27:781-8.

Rex JH, Nelson PW, Paetznick VL, Lozano-Chiu M, Espinel-Ingroff A, Anaissie EJ. Optimizing the correlation between results of testing in vitro and therapeutic outcome in vivo for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(1):129-34.

Rex JH, Pfaller MA, Lancaster M, Odds FC, Bolmström A, Rinald MG. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards-recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J Clin Microbiol.* 1996;34:816-7.

Rho J, Shin JH, Song JW, Park MR, Kee SJ, Jang SJ, Park YK, Suh SP, Ryang DW. Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* candiduria using pulsed-field gel electrophoresis. *J Microbiol.* 2004;42:80-6.

Saitou N. and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4:406-25.

Sampaio Camargo TZ, Marra AR, Silva CV, Cardoso MF, Martino MD, Camargo LF, Correa L. Secular trends of candidemia in a tertiary care hospital. *Am J Infect Control.* 2010;38(7):546-51.

Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20(9):462-9.

Sheng WH, Wang JT, Lu DC, Chie WC, Chen YC, Chang SC. Comparative impact of hospital-acquired infections on medical costs, length of hospital stay and outcome between community hospitals and medical centres. *J Hosp Infect.* 2005;59:205-14.

Shin JH, Chae MJ, Song JW, Jung SI, Cho D, Kee SJ, Kim SH, Shin MG, Suh SP,

Ryang DW. Changes in karyotype and azole susceptibility of sequential bloodstream isolates from patients with *Candida glabrata* candidemia. *J Clin Microbiol.* 2007;45(8):2385-91.

Sims CR, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Ostrosky-Zeichner L. Correlation between microdilution, E-test, and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of posaconazole against *Candida spp.* *J Clin Microbiol.* 2006;44(6):2105-8.

Sipsas NV, Lewis RE, Tarrand J, Hachem R, Rolston KV, Raad II, Kontoyiannis DP. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. *Cancer.* 2009;115(20):4745-52.

Sofair AN, Marshall Lyon G, Huie-White S, Reiss E, H. Harrison L, Sanza LT, Arthington-Skaggs BA, and Scott K. Fridkin. Epidemiology of Community-Onset Candidemia in Connecticut and Maryland. *Clin Infect Dis.* 2006;43:32-9.

Spiliopoulou A, Dimitriou G, Jelastopulu E, Giannakopoulos I, Anastassiou ED, Christofidou M. Neonatal intensive care unit candidemia: epidemiology, risk factors, outcome, and critical review of published case series. *Mycopathologia.* 2012;173(4):219-28.

St-Germain G, Laverdière M, Pelletier R, Bourgault AM, Libman M, Lemieux C, Noel G. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2 - Year (1996-1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol.* 2001;39:949-53.

Steffan P, Vazquez JA, Boikov D, Xu C, Sobel JD, Akins RA. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2031-9.

Tamura K. and Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993;10:512-26.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution (In Press)*.

Tavanti A, Davidson AD, Johnson EM, Maiden MC, Shaw DJ, Gow NA, Odds FC. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5593-600.

Tragiannidis A, Fegeler W, Rellensmann G, Debus V, Müller V, Hoernig-Franz I, Siam K, Pana ZD, Jürgens H, Groll AH. Candidaemia in a European Paediatric University Hospital: a 10-year observational study. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(2):27-30.

Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, 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. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1843-50.

Tumbarello M, Tacconelli E, De Gaetano Donati K, Morace G, Fadda G, Cauda R. Candidemia in HIV-infected subjects. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis.* 1999;18:478-83.

Vandeputte P, Larcher G, Bergès T, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemothe*. 2005;49 (11):4608-15

Vigouroux S, Morin O, Moreau P, Jean-Luc Harousseau, Milpied N. Candidemia in patients with hematologic malignancies: analysis of 7 years' experience in a single center. *Haematologica*. 2006;91:717-8

Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, Collette L, Martino P, Vandercan B, Doyen C, Lebeau B, Spence D, kremery V, De Pauw B, Meunier F. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the invasive fungal infection group (IFIG) of the European Organization for Research and treatment of cancer (EORTC). *Clin Inf Dis*. 1999;28:1071-9.

Voss A, Kluytmans JAJW, Koeleman JGM, Spanjaard L, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Verbrugh HA, Vos MC, Weersink AYL, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFGM. Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in five dutch university hospitals. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis*. 1996;15:909-12.

Vrioni G and Matsiolta-Bernard P. Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. *J infect*. 2001;42:50-6.

Wang JS, Li SY, Yang YL, Chou HH, Lo HJ. Association between fluconazole susceptibility and genetic relatedness among *Candida tropicalis* isolates in Taiwan. *J Med Microbiol*. 2007;56(5):650-3.

Weinberger M, Leibovici L, Perez S, Samra Z, Ostfeld I, Levi I, Bash E, D. Turnerf, A., Goldschmied-Reouven, G. Regev-Yochay, S.D. Pitlik, N. Keller. Characteristics of candidaemia with *Candida albicans* compared with non-albicans *Candida* species and predictors of mortality. *J Hosp Inf*. 2005;61:146-54.

Wingard JR, Dick JD, Merz WG, Sandford GR, Saral R, Burns WH. Differences in virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* in mice. *Infect. Immunol.* 1982;37:833-6.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004;39:309-17.

Wu JQ, Zhu LP, Ou XT, Xu B, Hu XP, Wang X, Weng XH. Epidemiology and risk factors for non-*Candida albicans* candidemia in non-neutropenic patients at a Chinese teaching hospital. *Med Mycol.* 2011;49(5):552-5

Zhang J, Hollis R. J., and Pfaller M.A. Variations in DNA Subtype and Antifungal Susceptibility Among Clinical Isolates of *Candida tropicalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1997;27:63-7