

DANIEL ARCHIMEDES DA MATTA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
Candida albicans DE ESTUDO BRASILEIRO
MULTICÊNTRICO DE CANDIDEMIA POR METODOLOGIA
DE “Multilocus Sequence Typing (MLST)”**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina para obtenção
do título de Doutor em Ciências

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIEL ARCHIMEDES DA MATTA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
Candida albicans DE ESTUDO BRASILEIRO
MULTICÊNTRICO DE CANDIDEMIA POR METODOLOGIA
DE “Multilocus Sequence Typing (MLST)”**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Arnaldo Lopes Colombo

Co-orientadora: Dra. Analy Salles de Azevedo Melo

São Paulo

2009

da Matta, Daniel Archimedes

Caracterização de isolados clínicos de *Candida albicans* de estudo brasileiro multicêntrico de candidemia por metodologia de "Multilocus Sequence Typing (MLST)". Daniel Archimedes da Matta, São Paulo, 2009

xxxii, 96f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação da Disciplina de Infectologia

Orientador: Prof. Arnaldo Lopes Colombo

Co-orientadora: Dra. Analy Salles de Azevedo Melo

Título em inglês: Characterization of clinical isolates of *Candida albicans* from a multicenter Brazilian surveillance of Candidemia by Multilocus Sequence Typing (MLST) method

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Especial de Micologia, da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, aprovado pelo Comitê de Ética **No. 770/06**, contando com o apoio financeiro da Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) dentro do programa de bolsa de Doutorado **Processo GM/GD 142025-2005-4**.

Parte do estudo experimental foi realizado no Centers for Disease Control and Prevention (CDC) na cidade de Atlanta, GA, nos Estados dos Unidos, pelo período de agosto de 2007 a julho de 2008. O financiamento desta etapa foi proporcionado pelo CNPq dentro do Programa de Bolsas do Doutorado Sanduíche **Processo SWE 200669/2007-9**.

DANIEL ARCHIMEDES DA MATTA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida albicans* DE
ESTUDO BRASILEIRO MULTICÊNTRICO DE CANDIDEMIA POR
METODOLOGIA DE “Multilocus Sequence Typing (MLST)”**

PRESIDENTE DA BANCA:

Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos Pignatari _____

Profa. Dra. Maria Luiza Moretti _____

Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa _____

Prof. Dra. Rosana Puccia _____

SUPLENTES

Prof. Dr. Guilherme Maranhão Chaves _____

Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo _____

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Dedicatória

À Walkiria e Renato que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida. Obrigado pela vida e por todos os ensinamentos que nenhum título, instituição ou livro me dariam.

À Roberta, por sua paciência, dedicação e por ter disponibilizado um ano da sua vida para desbravar a “América”.

Aos amigos e familiares que me deram a certeza de que a vida é feita de encontros e não de despedidas.

“L'essentiel est invisible pour les yeux”

(Antoine de Saint-Exupéry)

Agradecimentos

Ao Prof. Arnaldo Lopes Colombo, orientador que nestes 14 anos de convivência dividiu parte de seus conhecimentos e ensinamentos numa relação de mestre e aprendiz onde nem sempre foram flores, porém nunca faltou o respeito e sobretudo a amizade.

À Dra. Analy Salles de Azevedo Melo, co-orientadora paciente e dedicada que não poupou esforços para me introduzir dentro do mundo da biologia molecular e foi fundamental para a realização desta dissertação.

À Edméa, a irmã mais velha que a vida me presentiu. Obrigado pelo incentivo e por ter me dado a chance de iniciar no LEMI quando ainda éramos colegas de faculdade .

À Débora ou simplesmente Déborinha, pessoa doce, mas muito competente que me acolheu todas as manhãs com um contagiante sorriso.

Ao Patricio Godoy, amigo e excelente micologista que sempre tinha alguma novidade relacionada ao infinito universo dos fungos filamentosos.

À Beth Skaggs, pesquisadora do CDC que me acolheu no laboratório dos antifúngicos daquela instituição em 2004 durante meu estágio sendo a pessoa que me convidou e me deu incentivo para fazer uma parte experimental do estudo com MLST em Atlanta.

Ao grupo do CDC chefiado pela Dra. Mary Brandt, meu tutor Dr. Timothy Lott que me auxiliou durante minha passagem por lá assim como os outros pesquisadores: Angeline Boey, Beatriz Gomes, Arun Balajee, Naureen Iqbal, Kizee, Eszter, Steve Hurst, Selwyn, Rui Kano, Niwa, Anne Whitney, Corey Franzen, João, Errol Reiss, Tom Chiller e Benjamin Park.

Aos funcionários e amigos da Villa International em Atlanta, que recebem e acolhem as pessoas de todo o mundo de braços abertos amenizando a saudade dos familiares e amigos que deixamos no Brasil.

À Dra Olga F. Gompertz por ter me abrigado em seu laboratório até que o LEMI fosse inaugurado. Tenho esta micologista como exemplo e aqui expresso meu respeito e admiração.

Às minhas irmãs de laboratório: Gisela por sua simplicidade, carisma e amizade; Sabrina pela honestidade em expressar seus sentimentos e princípios; Fernanda sempre amável e prestativa; e Sarah sentimental e verdadeira. Tenho vocês com muito carinho e admiração. Obrigado por tudo.

Aos pós-graduandos Jorge, Marcos e Fernando que têm a importante missão de continuar as atividades iniciadas por outros colegas dentro do LEMI. Sucesso!

Ao Guilherme Chaves, hoje professor de microbiologia na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pelas sugestões que serviram para valorizar este estudo.

À Thaís e ao Robert, agradeço pelo auxílio na análise estatística dos dados e por todos os momentos que precisei deles.

À Leila, Thomas, Ligia, Patrícia Rady, Clédja e Ana Carolina, que embora estejam em outros serviços ou instituições de ensino, foram pessoas muito presentes na minha vida.

Ao Ricardo (Ricardão), jovem com muitas perspectivas e detentor de um futuro promissor dentro da micologia, agradeço pela amizade e pelo apoio durante estes anos.

À Josy, Mariane, Mara, Miriam, Josely e Rosângela, secretárias do laboratório nos últimos 5 anos e que me deram todo o suporte administrativo que precisei durante o período do doutorado.

Ao Daniel, Vinícius, Daniela e Tita, que dividiram a difícil tarefa dos cursos de pós-graduação sempre com bastante perseverança e empenho.

Ao secretário Charlys da Costa da pós-graduação da disciplina, um amigo que nunca negou sequer um favor em todas as vezes que precisei de uma ajudinha.

À Maria de Jesus, Maria Romilda, Viviane, Letícia, Nesma e Fátima, que fizeram do laboratório um ambiente muito harmonioso e próspero com trabalho e bom humor. Obrigado pela amizade e por dividirem parte de suas alegrias comigo.

Ao Bruno (*in memoriam*), que hoje está ao lado de Deus mas foi o primeiro aluno a me convidar para ser orientador do trabalho de conclusão de curso da graduação.

Aos profissionais da Universidade de São Paulo e Instituto Adolfo Lutz liderados pelas professoras Silvia Costa e Marcia Melhem respectivamente, que me deram a oportunidade de apresentar meus dados durante reuniões científicas naquelas instituições.

Aos amigos de pós-graduação Wagner Alckimin e Erika Ferrari pelas sugestões, apoio e amizade.

Aos funcionários, pós-graduandos e professores do Instituto Paulista de Doenças Infecciosas e Parasitárias (IDIPA) e da Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo.

Às agências financiadoras deste estudo, CNPq, CAPES e CDC, por tornarem este estudo uma realidade que certamente trará contribuições inúmeras para a melhor compreensão do papel dos microrganismos em nosso meio, além de proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes que são infectados por doenças fúngicas.

***“A man's friendships are one of the best measures of
his worth.”***

(Charles Darwin)

SUMÁRIO

Dedicatória	vii
Agradecimentos	viii
Lista de tabelas.....	xiii
Lista de figuras	xiv
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xv
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1.0 INTRODUÇÃO	01
1.1 Infecção de corrente sanguínea por espécies de <i>Candida</i>	02
1.2 Características gerais de <i>C. albicans</i> e outras espécies geneticamente relacionadas.....	06
1.2.1 <i>Candida albicans</i>	07
1.2.2 <i>Candida dubliniensis</i>	08
1.2.3 <i>Candida stellatoidea</i> : autêntica <i>C. albicans</i>	09
1.3 Aplicação da tipagem molecular em isolados de <i>C. albicans</i> relacionados a infecções invasivas.....	11
1.3.1 Tipagem molecular por MLST: o conceito.....	13
1.3.1.1 As etapas envolvidas na execução da metodologia do MLST: uma visão prática.....	15
1.3.1.2 Interpretação dos resultados do MLST: construção do dendrograma e conceito do e-BURST.....	16
1.3.1.3 Aplicações do MLST no entendimento da epidemiologia envolvendo a espécie <i>C. albicans</i>	18
1.3.2 Caracterização genotípica de subgrupos A, B, C de <i>C. albicans</i> e subgrupo D para <i>C. dubliniensis</i>	22

1.3.3 Tipagem molecular de <i>C. albicans</i> a partir de isolamento de episódios de candidemia no Brasil.....	22
2.0. OBJETIVOS	25
3.0. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Pacientes com candidemia e as respectivas amostras clínicas.....	28
3.2 Pacientes com candidemia persistente ou recorrente e as respectivas amostras clínicas.....	28
3.3 Armazenamento das amostras.....	29
3.4 Identificação das espécies de leveduras.....	29
3.5 Testes de susceptibilidade aos antifúngicos: microdiluição em caldo.....	30
3.6 Extração do DNA das amostras estudadas.....	30
3.6.1 Extração de DNA através do kit FastDNA da Qbiogene.....	30
3.7 Amplificação dos fragmentos dos 7 genes selecionados para o estudo do MLST.....	31
3.7.1 Amplificação dos fragmentos dos genes utilizados para MLST.....	32
3.7.2 Purificação do DNA para sequenciamento.....	32
3.7.3 Reação de sequenciamento dos fragmentos dos genes escolhidos.....	33
3.7.4 Identificação dos sítios polimórficos ou “single nucleotide polymorphisms (SNPs)” heterozigóticos	33
3.7.5 Introdução das sequências no website oficial do MLST para comparação com a base de dados e utilização do programa eBURST	34
3.7.6 Análise dos dados de MLST e definição de clados de <i>C. albicans</i>	36
3.8 Metodologia para Tipagem ABC (“ABC typing”).....	36
4.0. RESULTADOS.....	38
4.1 Resultados da análise de tipagem molecular de 61 pacientes com candidemia.....	39
4.1.1 Tipagem molecular por MLST.....	39
4.1.1.1 Diploid Sequence Typing (DST)	40
4.1.1.2 Genótipos do MLST	41
4.1.1.3 Classificação dos clados, resultado dos dendrogramas e aplicação do conceito do eBURST	43
4.1.2 Análise molecular por Tipagem ABC.....	45
4.1.3 Análise da tipagem molecular versus hospitais e regiões geográficas do	46

país.....	
4.1.4 Análise do perfil de susceptibilidade a antifúngicos.....	47
4.1.5 Mortalidade entre os pacientes e resultados da tipagem molecular.....	48
4.2 Resultados da análise de tipagem molecular de 8 pacientes com candidemia persistente ou candidemia recorrente.....	49
TABELAS.....	51
FIGURAS.....	60
5.0. DISCUSSÃO.....	69
6.0. CONCLUSÕES.....	79
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
8.0. ANEXOS.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Apresentação dos centros médicos e suas respectivas cidades, número de pacientes com candidemia e cepas de <i>C. albicans</i> incluídas na análise deste estudo.....	51
Tabela 2. Características clínicas de 61 pacientes com episódios de candidemia por <i>C. albicans</i>	51
Tabela 3. Resultados de tipagem molecular por MLST, Tipagem ABC e perfil de susceptibilidade a antifúngicos de 21 cepas de 8 pacientes que apresentaram episódios de candidemia persistente ou candidemia recorrente.....	52
Tabela 4. Lista de fragmentos de genes amplificados no ensaio do MLST para <i>C. albicans</i> com as sequências dos respectivos primers.....	53
Tabela 5. Apresentação dos resultados de sete fragmentos de genes essenciais com o número de pares de bases sequenciados, número de genótipos e número de sítios polimórficos identificados durante o estudo.....	53
Tabela 6. Tabela geral dos isolados de 61 pacientes com episódios de candidemia por <i>C. albicans</i> com as informações do centro médico ou cidade de isolamento, tipagem molecular por MLST e Tipagem ABC.....	54
Tabela 7. Número de DSTs únicos por centro médico definidos pela metodologia de MLST entre as cepas de <i>C. albicans</i> isoladas de pacientes com candidemia	56
Tabela 8. Número de novos genótipos encontrados entre as cepas de <i>C. albicans</i> de pacientes com episódios de candidemia.....	56
Tabela 9. Porcentagem de cepas de <i>C. albicans</i> categorizadas nos 17 clados conhecidos.....	56
Tabela 10. Distribuição e porcentagem dos genótipos por Tipagem ABC dos isolados de 61 pacientes incluídos no estudo.....	57
Tabela 11. Correlação entre a Tipagem ABC e clados definidos por MLST de acordo com cada centro médico.....	57
Tabela 12. Variação de valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM), CIM ₅₀ , CIM ₉₀ e porcentagem de resistência frente aos antifúngicos testados para isolados de <i>C. albicans</i> em 61 pacientes com candidemia.....	58
Tabela 13. Correlação de CIMs elevadas para 5-fluorocitosina e fluconazol versus genótipos e clados de MLST e genótipos de Tipagem ABC	58
Tabela 14. Variação no número de genótipos e sítios polimórficos dos fragmentos de genes analisados entre estudos que utilizaram MLST.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produto do sequenciamento do fragmento do gene <i>AAT1</i> (forward) da cepa 59 para definição do número do genótipo utilizando o website do MLST para <i>C. albicans</i>	60
Figura 2. Website oficial do MLST para comparação da sequência do fragmento do gene à qual se pretende obter um número de genótipo.....	61
Figura 3. Adição dos genótipos encontrados para a determinação do DST.....	62
Figura 4. Ilustração de um cromatograma parcial de um dos isolados para o fragmento SYA1.....	63
Figura 5. Dendrograma UPGMA mostrando as distâncias entre as cepas de <i>C. albicans</i> de pacientes com candidemia tipadas por MLST.....	64
Figura 6. Representação dos diferentes dendrogramas UPGMA mostrando as distâncias entre as cepas nos diferentes fragmentos de genes estudados.....	65
Figura 7. A ilustração mostra a figura gerada pelo programa eBURST 3.0 apresentando o complexo clonal 1 que agrupou 15 DSTs entre todos os outros analisados neste estudo	66
Figura 8. A ilustração mostra a figura gerada pelo programa eBURST 3.0 mostrando a presença de vários complexos clonais.....	67
Figura 9. Gel de eletroforese do produto de PCR para tipagem molecular por Tipagem ABC.....	67
Figura 10. Apresentação do dendrograma UPGMA construído a partir da metodologia do MLST, mostrando as distâncias entre 21 cepas de <i>C. albicans</i> de 6 casos de pacientes com episódios de candidemia persistente e 2 casos de pacientes com candidemia recorrente	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A – Adenina

AAT1 – gene relacionado à asparato aminotransferase

ABC typing – Tipagem ABC

ACC1 – gene relacionado à acetil coenzima A carboxilase

ADP1 – gene relacionado à permease ATP-dependente

AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome (Síndrome do Imunodeficiência Adquirida)

ATCC – American Type Culture Collection

C – Citosina

C. – *Candida*

°C – graus *Celsius*

CA – estado americano da Califórnia

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DNA – Deoxyribonucleic Acid

DST – Diploid Sequence Type

EIEIO – Infections and the Epidemiology of Iowa Organisms

et al. – e colaboradores

EUA – Estados Unidos da América

G – Guanina

HIV – Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HSP – Hospital São Paulo

HSPE – Hospital do Servidor Público Estadual

ITS – internal transcribed spacer

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

LEMI – Laboratório Especial de Micologia.

LOH – loss of heterozygosity (perda da heterozigosidade)

µg/mL – Micrograma por mililitro

mg – Miligrama.

mg/mL – Miligrama por mililitro

mL – mililitro

MLEE – Multilocus Enzyme Electrophoresis

MLST – Multilocus Sequence Typing

MP1b – gene relacionado à manose fosfato isomerase

MO – estado americano do Missouri

MOPS – Morpholinepropanesulfonic acid

NEMIS – National Epidemiology of Mycoses Survey

NJ – estado americano de Nova Jersey

NNISS – National Nosocomial Infections Surveillance System

No. – número

NY – estado americano de Nova Iorque

OH – estado americano de Ohio

pH – Potencial hidrogeniônico

PCR – Polymerase Chain Reaction

Pb – pares de base

RAPD – Random Amplification of Polymorphic DNA

rDNA – Ribossomic DNA (DNA Ribossômico)

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

rpm – rotações por minuto

SB – Southern Blotting

SCOPE – Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance

SENTRY – Antimicrobial Surveillance Program

SNP – Single Nucleotide Polymorphism

ST – Sequence Type

SYA1 – gene relacionado à alanil RNA sintetase

T – Timina

TGI – trato gastrointestinal

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

UK – países do Reino Unido

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

UPGMA – Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

US\$ – valores em dólar americano

USP – Universidade de São Paulo

UTI – unidade de terapia intensiva

VPS13 – gene relacionado à proteína vacuolar

YEPD – Yeast Extract, Peptone, Dextrose

ZWF1 – Glicose-6-fosfato desidrogenase

SÍMBOLOS

% – por cento

≥ – maior ou igual

≤ – menor ou igual

= – Igual a

~ – Aproximadamente

RESUMO

A metodologia do “Multilocus Sequence Typing (MLST)” tornou-se uma ferramenta importante para tipagem molecular para *C. albicans* porque esta metodologia pode caracterizar grande número de isolados rapidamente e está isenta da interpretação subjetiva de padrões de bandas em géis de eletroforese. Este método é muito útil no entendimento da filogenia e epidemiologia de cepas de *C. albicans* recuperadas de infecções fúngicas invasivas. **Objetivos:** 1) aplicar as metodologias de MLST e Tipagem ABC para isolados de *C. albicans* recuperados de infecções de corrente sanguínea em hospitais terciários no Brasil e 2) determinar se cepas indistinguíveis ou diferentes foram responsáveis pelos episódios de candidemia persistente ou candidemia recorrente em isolados sequenciais de mesmo paciente. **Material e Métodos:** Nós aplicamos a metodologia do MLST e Tipagem ABC em isolados de *C. albicans* de 61 pacientes com candidemia coletados durante um estudo multicêntrico realizado em 11 hospitais públicos terciários de 9 cidades brasileiras. Também foram avaliados os isolados sequenciais de 8 pacientes com candidemia persistente ou recorrente. Candidemia persistente foi definido como um episódio de fungemia com duas ou mais culturas positivas para *C. albicans*, em 2 ou mais dias diferentes, a despeito da contínua terapia antifúngica adotada. Candidemia recorrente foi definida como um episódio de candidemia ocorrendo ao menos 1 mês após o episódio incidente e a negatização de duas hemoculturas sequenciais após introdução da terapia antifúngica, envolvendo a mesma espécie de *Candida*. **Resultados:** Um total de 48 únicos “diploid sequence types (DSTs)” foram observados, incluindo 10 novos genótipos e 32 novos DSTs. DST 69 foi o mais comum entre os nossos isolados. Isolados clado 1 responderam a 56% da nossa coleção. O clado 3 e clado 8 foram os clados com maior número de isolados depois de clado 1, ambos respondendo por 10% das amostras. O clado 9 e clado 17 foram responsáveis por 6,5% dos isolados cada um. Isolados clado 12 responderam por 5%. Foi isolada uma única cepa (1,5%) do clado 2, clado 4, clado 16 e um isolado categorizado como “solitário”. Para Tipagem ABC, 82% dos isolados foram classificados como tipo A, seguido por tipo B com 16,5% e tipo C com 1,5%. Quanto aos pacientes com candidemia persistente ou recorrente, para todos os pacientes exceto um, verificou-se a permanência dos mesmos DSTs encontrados entre a primeira e última amostra coletada. Um único paciente com coletas sequenciais pelo período de 10 dias apresentou 3 cepas distintas discriminadas pelo MLST. Uma destas 3 cepas foi a única representante do clado 2 em nosso estudo. **Conclusão:** Mais de 50% dos isolados deste estudo apresentaram novos DSTs, predominando o clado 1 em 56% das amostras. Para a Tipagem ABC, 82% dos isolados foram do tipo A. Este é o primeiro estudo de nosso conhecimento a descrever infecção de corrente sanguínea por 3 cepas distintas de *C. albicans* documentadas no período de 10 dias.

ABSTRACT

The DNA sequence-based genotyping technique multilocus sequence typing (MLST) has emerged as an alternative typing tool for *C. albicans* because can characterize large numbers of isolates rapidly, and does not require the subjective interpretation of banding patterns. This methodology is a very useful tool in understanding the phylogenetics and epidemiology of *C. albicans* strains from invasive candidiasis. **Objective:** Our goal was 1) to apply MLST and ABC typing to *C. albicans* strains recovered from bloodstream infection from public tertiary care hospitals in Brazil and 2) determine whether indistinguishable or different strains were responsible for persistent or recurrent fungemia by performing MLST and ABC typing on sequential *C. albicans* isolates from the same patient. **Methods:** We applied MLST and ABC typing, which is based on the presence or absence of an intron in the 25S rDNA region, to *C. albicans* strains from 61 patients with candidemia collected during a multicenter surveillance study in 11 public tertiary care hospitals, representative of the public health system of 9 of the largest cities in Brazil. We also analyzed *C. albicans* strains from 8 patients with persistent or recurrent candidemia. Persistent candidemia was defined as two or more blood cultures positive for *C. albicans* on 2 or more separate days. Recurrent candidemia was defined as an episode of candidemia occurring at least 1 month after the apparent complete resolution of an infectious episode caused by the same *Candida* species. **Results:** A total of 48 unique profiles or diploid sequence types (DST) were observed, with 10 new sequence types (STs) and 32 new DSTs. DST 69 was the most common DST isolated. *C. albicans* clade 1 accounted for 56% of the collection, clade 3 and clade 8 for 10% each, clades 9 and 17 for 6.5% each, and clade 12 for 5%. Clade 2, clade 4, clade 16 and a singleton strain had 1 isolate each (1.5%). For ABC typing, 82% of the isolates were classified as type A, followed for 16.5% type B and 1.5% type C. All the patients' strains related to persistent or recurrent candidemia but one showed the same MLST diploid sequence type (DST), ABC type and susceptibility profile to antifungals in the first and second samples. One patient with 7 samples collected sequentially over 10 days showed 3 distinct strains, well discriminated by MLST. One of the 3 strains recovered from this patient showed a single *C. albicans* isolate found in our total collection classified as clade 2, although clade 2 is commonly found worldwide. **Conclusion:** More than 50% of isolates from this study form a unique set of DSTs and clade 1 was responsible for 56% of the isolates. For ABC typing, 82% of the isolates were type A. To the best of our knowledge, this is the first study describing a blood stream infection with 3 distinct *C. albicans* strains in the same patient within a short period of time.

***No mistério do Sem Fim, equilibra-se um planeta.
E, no planeta, um jardim, e, no jardim, um canteiro, no
canteiro, uma violeta, e, sobre ela, o dia inteiro, entre o
planeta e o Sem Fim, a asa de uma borboleta.***

(Cecília Meireles)

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Infecção de corrente sanguínea por espécies de *Candida*

Infecções por espécies de *Candida* em corrente sanguínea representam importante problema na medicina seja por sua alta prevalência, alta mortalidade, bem como pelos custos associados a episódios de candidemia que nos Estados Unidos da América (EUA) foram estipulados em valores de até US\$ 45.000 para pacientes adultos (Rentz et al. 1998) e US\$ 120.000 para pacientes pediátricos (Zaoutis et al. 2005). Não há dúvidas que a incidência desta infecção sofre variações ao longo do globo. No Brasil, estudos recentes mostram que as taxas de incidência de candidemia variam de 0,83 a 3,9 casos por 1,000 admissões (Colombo et al. 2006; Colombo et al. 2007; França et al. 2008; Girão et al. 2008; Hinrichsen et al. 2008). Estas taxas de incidência são maiores que aquelas vistas na maioria dos estudos realizados no Hemisfério Norte incluindo EUA (0,28 a 0,96 por 1,000 admissões) (Banerjee et al. 1991; Jarvis, 1995; Pittet, Wenzel, 1995; Wisplinghoff et al. 2004; Zilberberg et al. 2008), Canadá (0,02 a 0,45 por 1,000 admissões) [Macphail et al. 2002; Laupland et al. 2005] e na Europa (0,20 a 0,96 por 1.000 admissões)[Dóczy et al. 2002; Richet et al. 2002; Tortorano et al. 2002; Viudes et al. 2002; Alonso-Valle et al. 2003; Marchetti et al. 2004; Tortorano et al. 2004; Almirante et al. 2005; San Miguel et al. 2005; Odds et al. 2007b; Lagrou et al. 2007; Markogiannakis et al. 2009]. Somente um estudo português mostrou taxa de incidência mais elevada que o restante da Europa tendo-se verificado 2,7 por 1,000 admissões. Este juntamente com outro estudo realizado em Taiwan (2,88 casos por 1.000 admissões) apresentaram altas taxas de incidência similares às encontradas no Brasil (Hsueh, et al. 2002; Costa-de-Oliveira et al. 2007).

Devido à importância das infecções invasivas de corrente sanguínea por espécies de *Candida*, vários programas de vigilância de candidemia têm sido realizados nas últimas três décadas em todo o mundo. Ainda hoje, estes estudos continuam desempenhando papel importante na vigilância da epidemiologia das infecções fúngicas por espécies de *Candida* permitindo descrever as espécies mais prevalentes e dando especial atenção às alterações na frequência da distribuição de espécies e no perfil de susceptibilidade aos antifúngicos utilizados na prática médica. Os primeiros programas de vigilância foram implantados nos Estados Unidos da América (EUA) incluindo as redes coordenadas pelo “Centers for Disease Control and Prevention (CDC)”, o “National Epidemiology of Mycoses Survey (NEMIS)”, o “Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance (SCOPE)”, o

“National Nosocomial Infections Surveillance System (NNISS)”, o programa de vigilância internacional “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program” e “The Emerging Infections and the Epidemiology of Iowa Organisms (EIEIO)”. Estes estudos foram realizados em sua maioria, em hospitais terciários de áreas urbanas com grande concentração de pessoas das principais cidades americanas (Diekema et al. 2002).

Na Europa, estudos relevantes para a caracterização dos episódios de candidemia com tendências temporais e geográficas da distribuição de espécies e taxa de resistência, também foram realizados mostrando que existe alguma variação nestes dados dependendo do país, ano da publicação e centro hospitalar (Dóczi et al. 2002; Marchetti et al. 2004; Tortorano et al. 2004; Almirante et al. 2005; San Miguel et al. 2005; Lagrou et al. 2007; Quindós et al. 2008; Flórez et al. 2009).

No Brasil, observam-se os esforços de alguns grupos em investigar o perfil epidemiológico de pacientes que evoluem com candidemia (Colombo et al. 1999; Costa et al. 2000; Aquino et al. 2005; Barberino et al. 2006; Medrano et al. 2006; Colombo et al. 2006; Colombo et al. 2007; Girão et al. 2008; Hinrichsen et al. 2008; Chang et al. 2008; França et al. 2008). Deve-se ressaltar que a maioria destes estudos envolvem a caracterização das infecções fúngicas de corrente sanguínea em um único centro médico, sendo raros os estudos multicêntricos em nosso meio. A seguir estão descritos estudos onde se indica o tipo de estudo, frequência na distribuição das espécies do gênero *Candida* responsáveis por infecções de corrente sanguínea e a taxa de mortalidade geral quando reportado.

Em 1999, Colombo et al. conduziram estudo prospectivo multicêntrico de candidemia documentados em 6 hospitais das cidades de São Paulo e Rio de Janeiro, entre os anos de 1995 e 1996. Entre os 145 episódios de candidemia avaliados, os autores observaram prevalência de 63% de isolados de *Candida* não-*albicans*. Nesta casuística, *Candida parapsilosis* (25%) e *Candida tropicalis* (24%) foram as espécies de *Candida* não-*albicans* mais encontradas. Vale notar que a proporção de isolamento de *Candida glabrata* foi de 4%. A taxa de mortalidade geral foi de 50%.

Em estudo prospectivo conduzido por Costa et al. (2000) foram avaliadas todas as fungemias reportadas no Hospital das Clínicas da cidade de São Paulo, nos anos de 1995 e 1996. Dos 86 episódios de fungemia analisados, 97% foram atribuídos ao gênero *Candida* e a espécie *C. albicans* foi responsável por 50% das fungemias documentadas. As principais espécies de *Candida* não-*albicans* foram *C. parapsilosis*

(17%), *C. tropicalis* (12%) e *C. guilliermondii* (10%). A taxa de mortalidade geral foi de 41%, mas curiosamente, os autores identificaram a taxa de mortalidade de 71% associada à espécie *C. tropicalis*.

Aquino et al. (2005) investigaram infecções de corrente sanguínea causadas pelo gênero *Candida* no Hospital de Clínicas de Porto Alegre de abril de 1998 a agosto de 2004 identificando 131 episódios de candidemia durante o estudo. As espécies mais frequentes foram *C. albicans* (45%), *C. parapsilosis* (24,4%), *C. tropicalis* (15,3%), *C. glabrata* (6,9%), e *C. krusei* (4,6%). A taxa de mortalidade geral foi de 52%.

Barberino et al. (2006) avaliaram os fatores de risco relacionados a candidemia em três hospitais terciários na cidade de Salvador. Tratava-se de um estudo caso-controle retrospectivo com dados coletados por oito anos, onde os controles eram os pacientes com hemocultura positiva para bactéria e os casos foram definidos com uma hemocultura positiva para espécies de *Candida*. Foram identificados 69 pacientes com hemoculturas positivas para bactéria e 25 para espécies de *Candida* onde 14 eram isolados de *C. albicans* e 4 de *C. tropicalis*. Os autores relataram que a taxa de mortalidade geral entre os pacientes foi alta, mas não informaram precisamente qual foi este valor.

Medrano et al. (2006), em uma análise retrospectiva de casos de candidemia em hospital brasileiro na cidade de Fortaleza no Ceará, analisaram um total de 50 hemoculturas de 40 pacientes com candidemia. As espécies mais frequentes foram *C. parapsilosis* (n = 18), seguida por *C. albicans* (n = 14), *C. tropicalis* (n = 8), *C. guilliermondii* (n = 6), *C. glabrata* (n = 2) e outras espécies de *Candida* (n = 2). Um estudo descritivo foi realizado com apenas 21 pacientes os quais possuíam dados clínicos completos. Observou-se que em 13 (>50%) dos 21 pacientes, com candidemia foram a óbito.

A Rede Nacional de Vigilância de Candidemia conduzido por Colombo et al. (2006) foi o primeiro estudo brasileiro multicêntrico, prospectivo com o objetivo de conhecer a epidemiologia das infecções fúngicas em 11 hospitais terciários de 9 cidades brasileiras com coletas que foram realizadas no período entre março de 2003 e dezembro de 2004. Este estudo possibilitou o conhecimento da incidência de candidemia, bem como da distribuição das espécies de *Candida* e porcentagem de resistência a antifúngicos, com mesmo padrão de coleta de dados para todos os centros

de importantes cidades brasileiras como por exemplo: São Paulo, Rio de Janeiro e Curitiba. Naquele estudo foi reportado 712 casos de candidemia resultando numa incidência de 2,49 casos por 1.000 admissões e 0,37 casos por 1.000 paciente/dia. *Candida albicans* foi a espécie isolada mais comum (41%) seguida por *C. tropicalis* (21%) e *C. parapsilosis* (20,5%). A mortalidade geral foi de 54%.

Colombo et al. (2007) realizaram um estudo multicêntrico de vigilância de candidemia em 4 hospitais terciários da cidade de São Paulo entre março de 2002 e fevereiro de 2003. O total de 7.038 episódios de infecção de corrente sanguínea foram reportados, sendo 282 casos (4%) causados por espécies de *Candida*. A incidência de candidemia foi de 1,66 episódios por 1.000 admissões hospitalares. *Candida albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada, mas 62% dos isolados eram de espécies de *Candida* não-*albicans* principalmente *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. A taxa de mortalidade geral foi de 61% dos pacientes.

Girão et al. (2008) caracterizaram 108 episódios de candidemia no período de sete anos em uma unidade de terapia intensiva (UTI) do Hospital das Clínicas em São Paulo. Foi descrito que a incidência de candidemia variou de 0,39 a 0,83 episódios por 1.000 paciente-dia. *C. albicans* foi a espécie mais comumente isolada naquele estudo e a mortalidade geral foi de 76% dos casos.

Hinrichsen et al. (2008) realizaram um estudo observacional, prospectivo, de base laboratorial entre setembro 2003 e março de 2004 para investigar a incidência de candidemia e distribuição de espécies em um hospital privado terciário em Recife. Foram observados 21 episódios de candidemia em 18 pacientes. A taxa de incidência de candidemia foi de 3,9 episódios por 1.000 admissões. Espécies de *Candida* não-*albicans* representaram mais de 50% dos casos, predominando *C. parapsilosis* (33%) e *C. tropicalis* (24%). Onze (61%) pacientes morreram durante o tratamento da candidemia.

Em uma análise retrospectiva de casos de infecção na corrente sanguínea por espécies do gênero *Candida* em um hospital terciário de ensino no Mato Grosso do Sul, Chang et al. (2008) identificaram 96 episódios de candidemia de janeiro de 1998 a dezembro de 2006. *Candida albicans* (45,8%) foi a espécie mais prevalente seguida por *C. parapsilosis* (34,4%), *C. tropicalis* (14,6%) e *C. glabrata* (5,2%). A mortalidade ocorreu em cinquenta e oito (60,4%) pacientes durante a hospitalização e oito (13,7%)

foram a óbito até 30 dias após o diagnóstico de candidemia totalizando mais de 74% de mortalidade geral.

França et al. (2008) apresentaram os resultados de um estudo transversal e observacional sobre candidemia realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2004 onde foram analisados 100 episódios de candidemia. A incidência observada foi de 1,27 por 1.000 internações, sendo espécies de *Candida*, o oitavo agente mais frequentemente isolado entre os microrganismos responsáveis por infecções da corrente sanguínea. *Candida albicans* foi a espécie mais frequente (59%), seguida por *C. tropicalis* (15%) e *C. parapsilosis* (9%). Os autores alertaram que na população estudada, embora 68% dos pacientes tenham recebido tratamento antifúngico, a mortalidade geral foi de 56%.

Os estudos descritos acima tiveram algumas vezes diferentes objetivos, mas fica evidente que a taxa de mortalidade foi elevadíssima de igual e muitas vezes superiores àquelas reportadas na América do Norte e Europa, mostrando a gravidade desta doença em nosso meio. Alguns estudos reportaram a taxa de incidência sendo sempre em níveis superiores àqueles vistos no hemisfério norte. Além disso, foi visto o aumento de isolados de *Candida* não-*albicans* nos últimos anos, embora *C. albicans* ainda seja a espécie mais frequentemente isolada em infecções de corrente sanguínea por este gênero no Brasil.

1.2 Características gerais de *C. albicans* e outras espécies geneticamente relacionadas

Na década de 60, cinco espécies do gênero *Candida* eram consideradas como sendo de importância clínica, incluindo *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Atualmente, existem mais de 17 espécies do gênero *Candida* reconhecidas como agentes de infecções em humanos (Hazen et al. 1995). Estes microrganismos causam, mais frequentemente, infecções superficiais de pele e mucosas, mas, em ocasiões específicas, podem disseminar-se e causar doença sistêmica com características mais graves.

Dentre as infecções de corrente sanguínea por espécies de *Candida* não-*albicans*, é importante destacar que algumas delas vêm apresentando aumento crescente na frequência de isolamento reportado em todo o mundo tais como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (Sobel, 2006). No entanto, a espécie *C.*

albicans, bem como a outra espécie geneticamente próxima recentemente denominada como *C. dubliniensis* ou a discutível variante *C. stellatoidea* merecem especial destaque dentre as infecções fúngicas causadas por este gênero.

1.2.1 *Candida albicans*

A despeito da importância clínica e inerente interesse dos microbiologistas, o entendimento da diversidade genética desta espécie é relativamente menor quando comparado a outros microrganismos tais como algumas espécies de bactérias. O interesse em *C. albicans* realmente existe, mas a dificuldade se dá na aplicação de ferramentas moleculares já que trata-se de um organismo eucarioto, diplóide e com ciclo sexual não completamente definido ainda (Noble, Johnson, 2007). No entanto, *C. albicans* é o patógeno humano mais conhecido e estudado entre os fungos servindo de modelo para aplicação de ferramentas moleculares em experimentação, antes de serem utilizadas em outras espécies ou outros gêneros fúngicos de relevância clínica (Noble, Johnson, 2007).

Descrito pela primeira vez em 1839, o ascomiceto hoje chamado de *C. albicans* possui algumas particularidades exclusivas desta espécie como, por exemplo, o fato de ao contrário da maioria dos fungos, não ser comumente encontrado no meio ambiente tais como em solo ou em detritos vegetais (Calderone, 2002). Este organismo é uma levedura comensal que faz parte da microbiota normal dos seres humanos e está muito bem adaptada ao trato gastrointestinal (TGI) dos mesmos, assim como de outros animais homeotermos tais como primatas ou outros mamíferos domesticados ou selvagens e aves (Odds, 1988; Jacobsen et al. 2008b). Os indivíduos são colonizados próximo ao nascimento, sendo a transmissão primária através de simples contato direto (Lott et al. 2005). Embora assintomática na maioria das vezes, *C. albicans* pode causar infecção até mesmo em pessoas saudáveis infectando pele, unha e mucosas (Noble, Johnson, 2007).

O gênero *Candida* tem papel importante como agente de infecções fúngicas invasivas e embora seja notável o aumento das infecções de corrente sanguínea por espécies de *Candida* não-*albicans* nos últimos 20 anos, *C. albicans* continua sendo a espécie mais frequentemente isolada do sangue, bem como em infecções superficiais, independente dos sítios anatômicos (Sobel, 2000; Sant'ana et al. 2002; Colombo, Guimarães, 2003). Este agente apresenta distribuição universal tendo grande potencial patogênico com facilidade em aderir-se a diferentes epitélios e mucosas. Apresenta

dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, termotolerância e produção de enzimas como proteinases e fosfolipases que completam o complexo arsenal de mecanismos de virulência, fazendo desta espécie a mais virulenta e invasiva dentre as mais de 150 espécies de *Candida* conhecidas na natureza (Naglik et al. 2003, Karkowska-Kuleta et al. 2009).

Esta espécie é intrinsecamente susceptível aos antifúngicos utilizados na terapêutica das infecções fúngicas, exceto pela apresentação de cepas resistentes a antifúngicos relacionadas a três circunstâncias. A primeira é a descrição de cepas menos susceptíveis ou resistentes a 5-fluorocitosina associadas ao subgrupo A clado1 desta espécie, como será visto com maiores detalhes durante o desenvolvimento desta dissertação. A segunda caracteriza-se pela apresentação de resistência deste patógeno em pacientes com AIDS após exposição prolongada frente a antifúngicos azólicos no tratamento da candidíase orofaríngea ou esofágica. E finalmente, resistência associada a fungemia limitada a pacientes imunossuprimidos com doenças hematológicas malignas que recebem profilaxia com altas doses de fluconazol (McCullough et al. 1999; Colombo, Guimarães, 2003).

Candida albicans possui 8 cromossomos e estudos sugerem que seu modo de reprodução é primariamente clonal, embora haja evidências que a recombinação sexual também esteja presente. Altas taxas de recombinação intracelular (mitótica), incluindo translocação cromossômica podem ocorrer (Lott et al. 1999). Evidências confirmam que a reprodução clonal possui tendência para ocasional variação genética que pode ocorrer devido a mecanismos como recombinação ou substituição gênica (Odds et al. 2006). A sequência genômica completa deste organismo revelou elevados níveis de heterozigidade (~4%) [Jones et al. 2004; Van Het Hoog et al. 2007], sendo observada uma grande variação populacional em estudos envolvendo isolados clínicos de *C. albicans* de diferentes continentes, regiões, hospitais e até mesmo de membros de mesma família (Bougnoux et al. 2006; Forche et al. 1999; Pujol et al. 2002).

1.2.2 *Candida dubliniensis*

Cepas do gênero *Candida* produtoras de clamidoconídios provenientes de pacientes com AIDS e com história de recorrência de candidíase orofaríngea, porém, não sendo possível identificá-las como *C. albicans* em decorrência de diferenças significantes no perfil bioquímico e, particularmente, no padrão genotípico foram notificadas nas últimas décadas (Williamson et al. 1987; Odds, 1988).

Sullivan et al. (1995) avaliaram 55 cepas com características atípicas, isoladas entre 1988 e 1994 em Dublin, na Irlanda. Seis outros isolados de cinco pacientes australianos com AIDS e 3 de irlandeses HIV negativos foram incluídos naquele estudo. Estes isolados foram avaliados quanto às suas características fenotípicas, genotípicas e filogenéticas em comparação com cepas referência de espécies de *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. kefyr* e *C. krusei*. Os resultados apontaram para uma nova espécie, para a qual foi proposto o nome de *C. dubliniensis*.

Posteriormente, foi aplicado “DNA fingerprinting” para esta espécie utilizando a sonda espécie-específica Cd25 para análise da sequência da região “internal transcribed spacer (ITS)” do gene ribossomal. Foi demonstrado que isolados de *C. dubliniensis* se enquadram em três grandes clados (Joly et al. 1999). O mesmo foi observado por McManus et al. (2008) utilizando o MLST. Além disso, os autores destacaram a menor divergência entre a população de *C. dubliniensis* estudada do que aquela vista na população de *C. albicans*. Foi descrito pelos autores que *C. dubliniensis* apresenta menor patogenicidade em comparação com *C. albicans*, sendo raro a descrição deste agente causando infecções em indivíduos saudáveis, podendo ser menor a pressão na adaptação a diferentes hospedeiros na natureza. Ainda, segundo estes autores, é possível que o reservatório natural de *C. dubliniensis* não seja os seres humanos.

Embora haja poucos dados epidemiológicos disponíveis a respeito de fungemias por *C. dubliniensis*, alguns estudos reportaram casos de candidemia causadas por esta espécie em alguns países da Europa, América do Norte, África e Chile (Méis et al. 1999; Brandt et al. 2000; Marriott et al. 2001; Silva et al. 2003; Jabra-Rizk et al. 2005; Mubareka et al. 2005; Tekeli et al. 2006; Metwally et al. 2007, van Hal et al. 2008). No Brasil, não há nenhum relato de fungemia por *C. dubliniensis* publicado na literatura até agosto de 2009, levantando uma dúvida se existe a preocupação na identificação para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis* ou se realmente esta espécie está ligada somente a candidíase esofágica em paciente HIV positivo, como visto em outros estudos no Brasil (Alves et al. 2001; Milan et al. 2001; Mariano et al. 2003).

1.2.3 *Candida stellatoidea*: autêntica *C. albicans*

Em 1917, Ashford notou a presença de cepas com tonalidade verde entre os isolados de *Monilia albicans* (*C. albicans*) cultivados em ágar sangue. Dentre as 6 espécies de *Monilia* (*Candida*) descritas posteriormente por Martin et al. (1937) e

Jones, Peck, (1940), *C. stellatoidea* era identificada exclusivamente pela produção de pigmento verde no meio de cultivo. Isto foi visto com especial interesse porque poderia ser mais uma característica fenotípica de fácil distinção entre os isolados de *C. albicans*.

Além disso, Martin, Jones, (1940) mostraram que, embora morfologicamente similares, *C. stellatoidea* podia ser facilmente diferenciada por suas diferenças biológicas, principalmente pela não utilização de sacarose como fonte de carbono e a formação de poucos clamidoconídios em agar fubá, bem como pela baixa patogenicidade quando infectava coelhos. Devido às evidências do alto grau de similaridade entre as duas espécies, alguns autores permaneceram classificando *C. stellatoidea* por décadas como uma variedade e não uma espécie separada da *C. albicans*.

Know-Chung et al. (1988) mostraram que isolados de *C. stellatoidea* poderia ser dividido em duas subespécies baseado no perfil dos cariótipos com diferenças fenotípicas importantes. Isolados classificados como tipo I seriam aqueles exemplos de cepas de *C. stellatoidea* autênticas com assimilação de sacarose negativa e baixa virulência, enquanto isolados tipo II seriam variantes de *C. albicans* com patogenicidade acentuada, mas apresentando-se como sacarose-negativas no perfil bioquímico. Um fato intrigante ocorreu quando foi demonstrado que o tipo II poderia ser induzido à reversão quando cultivado em presença de sacarose. Isto, e mais o fato da patogenicidade ser igual a *C. albicans* determinou *C. stellatoidea* tipo II como sendo uma legítima *C. albicans* (Know-Chung et al. 1990). O mesmo foi observado com isolados tipo I que também apresentaram reversão passando a assimilar sacarose igual ao tipo II mostrando a conspecificidade¹ da *C. stellatoidea* tipo I e *C. albicans*, diferenciando-se somente pelo fato de apresentar baixa patogenicidade.

Jacobsen et al. (2008a) utilizaram o MLST para investigar 35 isolados de *C. albicans* e 4 isolados originalmente identificados como *C. stellatoidea* tipo I. Os quatro isolados de *C. stellatoidea* tipo I foram agrupados junto com outros isolados sacarose-negativo em um grupo de cepas altamente distintas da maioria das cepas de *C. albicans*.

¹ Conspecificidade: pertencente a mesma espécie

Ainda, no estudo de Jacobsen et al. (2008a), foi visto que é possível aplicar o MLST convencional de *C. albicans* para *C. stellatoidea* com a única diferença vista na construção do dendrograma, onde observou-se o agrupamento de isolados de *C. stellatoidea* separadamente dos demais grupos de *C. albicans*. Foi observado que existem pequenas diferenças genotípicas entre *C. stellatoidea* tipo I e *C. albicans*, mas que trata-se apenas de variações em relação aos verdadeiros isolados de *C. albicans*. Portanto, cepas de *C. stellatoidea* deverão ser identificadas como *C. albicans* somente.

1.3 Aplicação da tipagem molecular em isolados de *C. albicans* relacionados a infecções invasivas

Os avanços na biologia molecular nas últimas 2 décadas corroborou para o desenvolvimento de técnicas moleculares de genotipagem em microbiologia clínica. Muitos estudos têm sido realizados para investigar ou confirmar surtos em determinados centros médicos, mas pouco se sabe sobre suas verdadeiras fontes e rotas de infecção. De maneira geral, também é escasso o conhecimento da prevalência de clones ou de agrupamentos de cepas de *Candida* provenientes de pacientes com candidemia de um ou mais centros médicos por todo o mundo (Trtkova, Raclavsky, 2006; Ásmundsdóttir et al. 2008).

O único estudo de nosso conhecimento a respeito da prevalência de clones em populações de espécies de *Candida* foi realizado por Ásmundsdóttir et al. (2008) que, avaliando os genótipos de isolados de fungemia de 1996 a 2006 na Islândia², mostraram através da técnica de “polymerase chain reaction (PCR)” a presença de 35 clones de *C. albicans*, 10 clones de *C. glabrata* e 4 clones de *C. parapsilosis* entre 217 isolados.

Os métodos de tipagem molecular contribuem para a distinção das cepas através dos estudos de polimorfismos presentes no genoma das espécies envolvidas na análise (Trtkova, Raclavsky, 2006). A confiabilidade dos métodos de tipagem molecular está relacionada com a reprodutibilidade e seu poder discriminatório. Atualmente, existem diversos métodos de tipagem molecular utilizados para caracterizar os isolados de *C.*

² A Islândia é uma ilha localizada ao norte da Europa com 307.000 habitantes em 2006 e extensão territorial de 313.000 km². O país possuía até a publicação do estudo, 2 hospitais universitários e 14 comunitários [Ásmundsdóttir et al. (2008)].

albicans em estudos epidemiológicos de pequena ou larga escala. Estes incluem principalmente o “restriction fragment length polymorphism (RFLP),” “Southern blot (SB)” com hibridização utilizando sondas espécie-específicas, “random amplification of polymorphic DNA (RAPD)” e cariotipagem eletroforética (Bougnoux et al. 2002). Não existe consenso sobre o melhor método de tipagem para *C. albicans* mas, independente da ferramenta molecular adotada, esta deveria fornecer uma visão global da dinâmica populacional e da epidemiologia das cepas que causam infecções nosocomiais (Pfaller, 2000).

Em se tratando de *C. albicans*, os primeiros estudos cladísticos realizados ainda na década de 80 foram conduzidos por Odds et al. (Odds, Abbott, 1980; Odds et al. 1983) onde, utilizando marcadores fenotípicos foi observado três grandes grupos de cepas. Posteriormente, foi utilizado a sonda da região repetitiva Ca3 para determinar os grupos denominados I, II e III (Soll, Pujol, 2003). Soll, Pujol, (2003) também observaram que parte dos isolados foram incluídos em dois grupamentos distintos de isolados provenientes da Europa e África do Sul chamados de grupo E (Pujol et al. 2002) e grupo SA (Blignaut et al. 2002) respectivamente. Recentemente, Odds et al. (2007a) aplicaram a metodologia do MLST em outra análise cladística com 1.391 cepas coletadas em todas as partes do planeta. Novamente, foi possível agrupar as cepas em grandes grupos denominados clado 1, clado 2 e clado 3. Em 97% de todas as cepas estudadas, estas foram assinaladas ao menos em um dos 17 cladados observados naquele estudo.

Embora haja esforços para discriminar grupamentos ou cladados entre as cepas de *C. albicans* provenientes de pacientes de diferentes regiões geográficas, também é importante a detecção de mínimas variações genéticas determinadas em múltiplas cepas de *C. albicans* de mesmo paciente, descrito previamente como microvariação (Lockhart et al. 1995; Odds et al. 2006) ou “genotípico shuffling” (Lockhart et al. 1996; Samaranayake et al. 2003).

Microvariações referem-se a pequenas mudanças detectáveis na sequência de DNA entre isolados obtidos longitudinalmente ou em clones de mesmo paciente separados individualmente. De forma geral, estas microvariações ocorrem em pacientes com infecções fúngicas persistentes ou recorrentes. A recorrência de infecção fúngica está relacionada, mais comumente, a infecções comunitárias tais como candidíase esofágica e vaginal, ceratites, endoftalmites e dermatofitoses, do que em infecções nosocomiais como aquelas vistas em corrente sanguínea (Ruhnke et al. 1994; Neofytos et al. 2006; Weinstein et al. 2007; Pagani et al. 2007; Gupta, Cooper, 2008;

Weissenbacher et al. 2009). Estudos descrevendo persistência ou recorrência de candidemia caracterizaram-se pela utilização de diferentes técnicas moleculares na tentativa de responder se a mesma cepa continuou infectando pacientes individualmente em diferentes períodos de tempo (Clancy et al. 2000; Shin et al. 2001; Shin et al. 2005; Neofytos et al. 2006; Shin et al. 2007).

No mesmo sentido, alguns estudos focaram seus objetivos para o melhor entendimento da relação de colonização versus infecção onde existe a tentativa de reconhecer se as mesmas cepas encontradas em diversos sítios como colonizantes da pele ou mucosas podem posteriormente infectar a corrente sanguínea dos pacientes (Kaufmann, Merz, 1989; Klemp-selb et al. 2000; Shin et al. 2004; Jacobsen et al. 2008c; Miranda et al. 2009). Recorrência em candidemia pode ser devido a reinfecção pela mesma cepa também chamada “relapse”, termo utilizado na infectologia e mais comumente em dermatologia devido a frequentes relatos de recorrência pelo mesmo agente relacionados a *tinea unguium* (onicomicosis) e *tinea capitis* (Gupta, Cooper, 2008). A infecção pode ser ainda por uma nova cepa ou outra espécie completamente diferente (Clancy et al. 2000; Neofytos et al. 2006; Chong et al. 2006).

1.3.1 Tipagem molecular por MLST: o conceito

A tipagem molecular por sequenciamento de multilocus (MLST) tem sido utilizada com sucesso entre bactérias e algumas espécies de *Candida*, tais como: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata*.

O método MLST é altamente resolutivo e baseia-se na análise dos polimorfismos dos nucleotídeos “single-nucleotide polymorphisms (SNPs)” em fragmentos internos de “housekeeping genes” de aproximadamente 400 a 500 pares de bases (pb) detectados através de sequenciamento molecular. Os “housekeeping genes” são conhecidos por serem expressos constantemente na célula e foram escolhidos por serem “neutros”, ou seja, não estão sofrendo pressões seletivas como aqueles genes que conferem resistência a antifúngicos por exemplo (Odds, Jacobsen, 2008).

Os sítios polimórficos do genoma são utilizados para diferenciar as cepas de *C. albicans*, assim como a identificação dos SNPs heterozigóticos. *Candida albicans* demonstra altos níveis de heterozigosidade e o seu genoma apresenta aproximadamente

62.000 SNPs, os quais são uma grande fonte de variabilidade populacional genética na relação das cepas e transmissão genética (Forche et al. 2004; Jones et al. 2004).

Para cada um dos sete fragmentos de genes analisados pelo MLST, a diferença na sequência dentro de uma espécie de microrganismos é assinalada como alelo distinto, e para cada isolado, a combinação dos alelos sequenciados define um perfil alélico ou tipo de sequência “sequence typing (ST)”. Cada isolado de uma espécie é, portanto, caracterizado por séries de sequências gênicas que correspondem aos alelos dos fragmentos estudados. Embora o MLST tenha sido originalmente desenvolvido para organismos haplóides, é possível utilizar-se esta ferramenta com sucesso para organismos diplóides como é a *C. albicans* (Bougnoux et al. 2002). Para organismos diplóides, ao invés de utilizar o termo ST, é utilizado com o mesmo princípio a denominação “diploid sequence typing (DST)”.

A princípio, a utilização de vários fragmentos do DNA aumentaria muito o poder discriminatório da metodologia, porém na prática é preciso utilizar o menor número possível de fragmentos para tornar o método mais barato e menos laborioso no momento da análise dos resultados (Bougnoux et al. 2003). Vale lembrar que o ideal seria se pudéssemos sequenciar o genoma completo de todos os isolados clínicos para depois compará-los observando todas as suas diferenças, mas do ponto de vista prático, isto seria impossível para ser feito com os recursos tecnológicos disponíveis nos dias de hoje, porém este procedimento deverá tornar-se comum num futuro muito próximo (Odds, Jacobsen, 2008).

Inicialmente dois estudos realizados por Bougnoux et al. (2002) e Tavanti et al. (2003) utilizaram o total de até 10 fragmentos quando aplicaram o MLST para seus respectivos isolados. Num consenso feito por Bougnoux et al. (2003) foi sugerido a utilização de 7 fragmentos de genes para a análise, os quais, seriam os mais discriminatórios. Neste consenso foram analisados 86 isolados de *C. albicans* com combinações de 5, 6, 7, 8 e 9 fragmentos de DNA. A menor e melhor combinação de fragmentos capaz de discriminar únicos genótipos foram os sete fragmentos de “housekeeping genes”: *AAT1* (*Asparato aminotransferase*), *ACC1* (*Acetil coenzima A carboxilase*), *ADP1* (*Permease ATP-dependente*), *MPIb* (*Manose fosfato isomerase*), *SYA1* (*Alanil-RNA sintetase*), *VPS13* (*Proteína vacuolar*) e *ZWF1* (*Glicose-6-fosfato desidrogenase*), os quais são utilizados atualmente em estudos envolvendo *C. albicans* e MLST com a possibilidade de comparação com a base de dados disponível no website do MLST (<http://calbicans.mlst.net>).

Para *C. albicans*, a maior vantagem do MLST sobre os outros métodos de tipagem é que os dados das sequências podem ser armazenados numa base de dados e facilmente comparados entre os laboratórios, permitindo assim o compartilhamento de dados através da internet num website de epidemiologia global desenvolvido por dois grupos europeus [<http://calbicans.mlst.net>] (Maiden et. al. 1998; Bougnoux et al. 2002, Tavanti et al. 2005). Além disso, esta metodologia pode caracterizar um grande número de isolados rapidamente e isto não requer a interpretação subjetiva do padrão de bandas após a corrida eletroforética (Chowdhary et al. 2006).

O poder discriminatório do MLST foi demonstrado em alguns estudos e todos foram unânimes na obtenção de resultados com elevado índice de discriminação superior a 95%, quando comparado com outras técnicas tais como RAPD, “multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)” e SB utilizando sonda Ca3. Foi observado que o poder discriminatório foi igual e às vezes superior às outras técnicas de tipagem molecular reconhecidamente útil para tal fim. Vale reforçar, como descrito anteriormente, que o valor do poder discriminatório em MLST está baseado no número de fragmentos escolhidos para diferenciar os isolados.

1.3.1.1 As etapas envolvidas na execução da metodologia do MLST: uma visão prática

Na prática, o MLST é uma ferramenta de tipagem molecular baseada em sequenciamento de múltiplos fragmentos de DNA de microrganismos como fungos e bactérias. Inicia-se o processo com a extração do DNA seguido da obtenção do produto da reação de PCR bidirecional (forward e reverse) dos fragmentos que se pretende estudar com a posterior purificação dos fragmentos de DNA amplificados até o sequenciamento automatizado dos mesmos. Todo este procedimento pode ser feito entre 12 e 24 horas, quando então os resultados poderão ser analisados através de cromatogramas obtidos com o programa Sequencer 4.8 (Genes Codes Corp, Ann Arbor, EUA).

A leitura das sequências nos cromatogramas é realizada visualmente identificando os SNPs heterozigóticos, o que leva aproximadamente mais 30 minutos para definição dos genótipos de cada isolado, verificando-se cuidadosamente os 7 fragmentos estudados. Cada sequência é comparada com a base de dados referência

onde é assinalado o número do alelo e, no caso de um novo alelo não existente na base de dados, pode ser solicitado um novo número do genótipo entrando-se em contato com os responsáveis através do website oficial do MLST para *C. albicans* (Bougnoux et al. 2002, Tavanti et al. 2005, Chowdhary et al. 2006, Odds, Jacobsen, 2008).

Ao final do processo, temos portanto o ST para organismos haplóides ou DST para organismos diplóides. Se os DSTs de 2 ou mais isolados de *C. albicans* diferem entre si, isto é uma evidência que as cepas são diferentes embora os DSTs não forneçam a real extensão destas diferenças a nível dos SNPs entre duas sequências. Para análise mais criteriosa destas diferenças é necessário a construção do dendrograma baseado no agrupamento estatístico algorítmico a partir do alinhamento e distinção das respectivas diferenças encontradas nas sequências dos DNAs das amostras em questão. Por outro lado, se as duas cepas possuem o mesmo DST é a prova de que elas são indistinguíveis por MLST, mas não necessariamente que elas são idênticas, porque esta técnica analisa aproximadamente 3.000 bases mas não o genoma inteiro do organismo.

Além da análise das distâncias genéticas entre os isolados verificada através da construção de um dendrograma é possível a utilização de outro programa chamado eBURST que identifica um ancestral comum conforme descrito a seguir (Bougnoux et al. 2002, Tavanti et al. 2005, Chowdhary et al. 2006, Odds, Jacobsen, 2008).

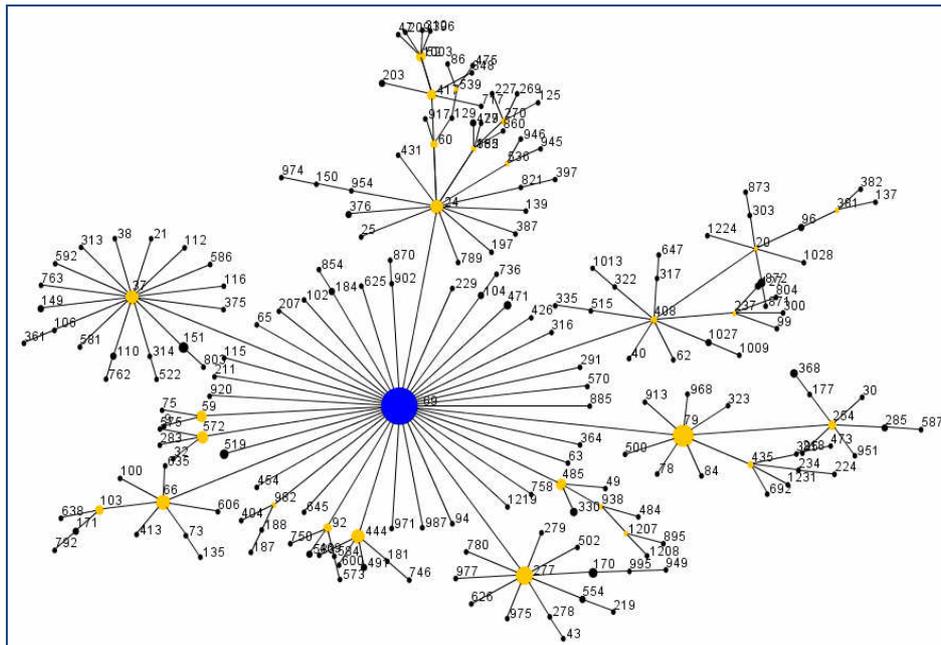
1.3.1.2 Interpretação dos resultados do MLST: construção do dendrograma e conceito do eBURST

Nos últimos anos têm aumentado com bastante ênfase o uso de programas de computador para auxiliar a caracterização molecular dos dados relacionados aos microrganismos patogênicos. Em MLST, a relação entre as cepas é tipicamente representada através de um dendrograma baseado nas diferenças dos perfis alélicos, os quais identificam as cepas similares em grupos "clusters". As sequências usadas em MLST também podem ser utilizadas para explorar as relações entre cepas já que, por exemplo, a recombinação pode ocorrer frequentemente em muitas espécies de microrganismos e o uso destes programas tem um impacto evidente na capacidade de discernir a verdadeira relação entre as cepas (Tavanti et al. 2005, Odds, Jacobsen, 2008).

O “unweight-pair group method with arithmetic mean (UPGMA)” é um método que tem sido usado amplamente na análise das distâncias genéticas de muitos microrganismos, inclusive *C. albicans*, para a metodologia do MLST. O UPGMA faz a análise das sequências a nível individual das diferenças dos SNPs e os maiores clados de *C. albicans* podem ser desta forma representados no dendrograma correlacionando-se perfeitamente com os clados previamente definidos, quando utilizada a técnica de SB com sonda Ca3 em outros estudos (Odds, Jacobsen, 2008).

Além do dendrograma, que somente calcula as distâncias genéticas aproximadas entre os isolados, recentemente, foi desenvolvido por Feil et al. (2004), um programa chamado eBURST que tem por objetivo identificar um provável ancestral comum dentro da coleção de isolados analisados, ilustrando através de um gráfico, as relações evolutivas de ancestralidade entre os genótipos fortemente relacionados, sendo que é impossível observar estas relações através de árvores filogenéticas. A partir do ancestral comum, observa-se a diversidade de outros grupos relacionados produzindo grupamentos clonais (“clonal clusters”). Os grupos de genótipos relacionados são geralmente referidos como um complexo clonal (“clonal complex”).

Em outras palavras, o complexo clonal é visto através do programa eBURST e definido como o agrupamento dos DSTs de uma população que compartilha a igualdade de 6 dos 7 genótipos estudados, inferindo qual é o DST “fundador ou ancestral” de cada complexo mostrando também este fundador como o provável descendente do ancestral comum dentre todos os DSTs analisados (Feil et al. 2004) [**Quadro 1**].



Quadro 1. eBURST do complexo clonal 1 construído a partir dos DSTs de isolados clínicos de todo o mundo, encontrados no banco de dados do website oficial do MLST. A ilustração mostra a figura gerada pelo programa eBURST 3.0 que faz uma ligação dos isolados a partir das diferenças nas sequências de nucleotídeos de somente um dos sete fragmentos de genes utilizados para MLST. O DST 69 na figura (círculo azul) é considerado o ancestral comum entre todos os isolados do complexo clonal 1.

Ao final das análises, estamos muitas vezes diante de um paradigma no momento de definir qual o verdadeiro significado clínico ou epidemiológico dos agrupamentos de microrganismos. Na literatura, por muitos anos para o gênero *Candida*, empregou-se a palavra clado para descrever os grupos de isolados geneticamente relacionados. Em sua essência clado deveria referir-se ao ancestral comum da espécie, assim como sua progenie evolutiva, portanto, este termo não é o mais apropriado para definir grupos de cepas geneticamente relacionadas. De qualquer forma, assim como Soll, Pujol (2003) utilizaremos o termo clado para definir o grupamento de cepas relacionadas entre si.

1.3.1.3 Aplicações do MLST no entendimento da epidemiologia envolvendo a espécie *C. albicans*

Vários autores têm mostrado que o MLST é um importante instrumento molecular utilizado para responder as questões relacionadas à epidemiologia das infecções fúngicas para isolados de *C. albicans*. Relacionamos a seguir, os estudos com a

aplicação desta potente ferramenta para diferentes objetivos de ordem clínica, epidemiológica ou comparativa com outras técnicas de tipagem molecular (Bougnoux et al. 2002; Robles et al. 2004; Chowdhary et al. 2006; Viviani et al. 2006; Bougnoux et al. 2006; Odds et al. (2006); Odds et al. 2007a; McManus et al. 2008; Jacobsen et al. 2008b; Wrobel et al. 2008).

O primeiro estudo testando a metodologia do MLST, com aplicação para leveduras do gênero *Candida* no mesmo modelo e essência que para bactérias, sendo as informações das sequências disponíveis para comparação numa base de dados, foi realizado por Bougnoux et al. (2002). Os autores selecionaram 6 “housekeeping genes” para o estudo em 40 isolados clínicos de *C. albicans*, sendo 26 não-relacionados epidemiologicamente e 14 fortemente relacionados. Foram encontrados 68 sítios polimórficos e 65 deles foram heterozigóticos para ao menos um isolado. Dos 26 isolados não relacionados e 2 cepas controles foi identificado 27 DSTs independentes demonstrando o poder discriminatório de 99,7%. Para as 14 cepas relacionadas recuperadas de pacientes internados na mesma unidade hospitalar num período de 3 meses foi observado DSTs específicos onde 73% dos isolados mostraram-se muito semelhantes geneticamente. Neste estudo, o MLST provou ser altamente discriminatório na caracterização de cepas clínicas de *C. albicans*.

Robles et al. (2004) utilizaram o MLST em 29 isolados de *C. albicans* previamente avaliados por outras técnicas de tipagem molecular identificando três grupos de isolados geneticamente relacionados. A concordância foi de 82,3% em comparação com o MLEE, 82,7% com RAPD e 86,2% com a técnica de SB com hibridização por sonda Ca3. Quando o MLST foi aplicado em 22 isolados de origem não-relacionada o MLST identificou 21 sequências diplóides independentes resultando num poder discriminatório de 99,6% contra 96,9% a 99,6% das outras técnicas. Estes autores demonstraram que este método foi altamente eficiente na tipagem de isolados de *C. albicans* quando comparado com outras técnicas de tipagem molecular.

Odds et al. (2006) aplicaram MLST para 165 isolados sequenciais de *C. albicans* estocados em um banco de microrganismo desde 1970 de pacientes de diferentes hospitais e origens biológicas tais como sangue, cateter, urina, fezes entre outras. Para um paciente foi evidenciado a substituição de cepas. A microvariação foi observada em alguns isolados pela perda de heterozigosidade em um ou mais fragmentos sequenciados.

Chowdhary et al. (2006) compararam as técnicas SB utilizando sonda Ca3 e MLST para discriminar 37 isolados de *C. albicans* provenientes de casos de recorrência em candidíase orofaríngea em 10 pacientes HIV+ da Índia e Estados Unidos. O MLST identificou 23 genótipos distintos enquanto SB discriminou 21 genótipos. Os autores destacaram que os resultados obtidos com MLST foram iguais ou melhores que SB para discriminar isolados sequenciais de *C. albicans* relacionados geneticamente em pacientes HIV+ com candidíase orofaríngea.

Viviani et al. (2006) descreveram retrospectivamente na Itália a primeira aplicação do método MLST para identificar um surto de *C. albicans* ocorrido entre os anos de 1987 e 1991 em pacientes com candidemia de uma unidade de enfermagem cirúrgica. Os autores concluíram que em 8 dos 16 pacientes a infecção deve ter sido causada pela mesma cepa de *C. albicans*, mas por ser uma análise retrospectiva, não foi possível determinar a fonte de infecção já que não foram coletadas amostras do ambiente hospitalar ou das mãos dos profissionais de saúde, quando ocorreu o surto alguns anos antes desta investigação.

Na Europa, Bougnoux et al. (2006) utilizando MLST, avaliaram a prevalência, diversidade e relação genética entre isolados de *C. albicans* recuperados a partir de colonização de trato digestivo de humanos. Isolados de espécies de *Candida* a partir de cavidade oral e fezes de 234 indivíduos de 25 famílias com casos de doença de Crohn (inflamação crônica do tubo digestivo) e 10 famílias controle foram incluídos no estudo. Não houve diferença na prevalência de *C. albicans* nas famílias com os casos e as famílias como controle. As pequenas diferenças detectadas entre os isolados relacionados foram causadas pela perda de heterozigidade, muito comum quando ocorre microvariação. A alta frequência de microvariação bem como a transmissão intrafamiliar sugeriu que o trato digestivo é um nicho natural de microvariação para *C. albicans* através para perda de heterozigidade (LOH).

Um dos mais importantes estudos utilizando a metodologia de MLST aplicado para *C. albicans* foi realizado em 2007 por Odds et al. (2007a). Estes autores analisaram os dados de 1.391 isolados de *C. albicans* incluindo o perfil de susceptibilidade a antifúngicos e tipagem molecular por MLST e Tipagem ABC. O grande mérito deste estudo foi ter sugerido o ponto de corte capaz de separar os clados 2 e SA (South Africa) visto em estudos anteriores. Estes autores substituíram a denominação clado SA para clado 4. Separando os isolados clado 2 e clado 4, foi possível assinalar 97% dos isolados em 17 diferentes clados restando alguns poucos

“singletons” que chamaremos de “solitários”, ou seja, isolados que não se enquadraram dentro dos 17 clados. Naquele estudo a análise do eBURST revelou 53 grupos clonais.

McManus et al. (2008) investigaram pela primeira vez a estrutura populacional de *C. dubliniensis* utilizando o MLST em comparação com isolados de *C. albicans*. Os autores analisaram uma combinação de 10 fragmentos de “housekeeping genes” em 50 cepas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* não-relacionadas epidemiologicamente e de origem geográfica diversas. Os resultados do MLST revelaram significativamente a menor divergência entre a população de *C. dubliniensis* do que a encontrada em *C. albicans*. Isto pode ser a prova de que no processo evolutivo, houve uma recente divergência de *C. dubliniensis* de seu ancestral *C. albicans* resultando na inclusão dos isolados de *C. dubliniensis* dentro de um clado principal com menor variabilidade.

Recentemente, dois curiosos estudos foram publicados por Wrobel et al. (2008) e Jacobsen et al. (2008b) referindo-se à aplicação de MLST para estudo populacional de cepas de *C. albicans* recuperadas de seres humanos e animais. No primeiro estudo foi aplicado MLST para 210 isolados de *C. albicans* de animais silvestres (aves, mamíferos e répteis) não imigratórios do estado de Illinois na região dos Grandes Lagos ao norte dos EUA. Este estudo mostrou que a distribuição dos clados entre seres humanos e animais silvestres foi significativamente diferente, mostrando que existe o isolamento populacional entre os grupos. Estas diferenças podem indicar limitada transferência de cepas entre os grupos ou seleção diferencial entre isolados recuperados de animais e humanos.

Conclusões parecidas foram referidas por Jacobsen et al. (2008b). Foi utilizado o MLST para comparar os 43 isolados de animais (mamíferos e aves) originários dos continentes africano e América do Sul, Bélgica, França, Escócia e EUA com 675 isolados recuperados de seres humanos (controles) das mesmas regiões dos animais. Assim como observado por Edelmann et al. (2005) que utilizaram DNA fingerprinting, Jacobsen et al. (2008b) também observaram que isolados de *C. albicans* recuperados de animais mostram uma tendência para separação genética quando comparados com isolados de seres humanos colonizados ou infectados por esta espécie de *Candida*, embora exista uma pequena relação entre as cepas recuperadas de humanos e animais. Com esta metodologia foi possível hipotetizar que algumas cepas de *C. albicans* parecem ser melhor adaptadas do que outras para colonizar ou infectar outras espécies de animais que não a *Homo sapiens*.

Algumas questões ainda podem ser melhor avaliadas e compreendidas utilizando o MLST tais como a diversidade genotípica entre cepas que colonizam os pacientes e aquelas que causam candidemia nos mesmos ou nas cepas recuperadas de hemocultura de pacientes com candidemia persistente ou recorrente, ou ainda, por exemplo se existe grandes diferenças entre isolados de *Candida* recuperados de diferentes regiões geográficas do planeta. O MLST parece ser uma boa opção de tipagem molecular aplicada a epidemiologia das infecções fúngicas e diante dos estudos já realizados foi por bem que resolvemos testar o valor desta metodologia para nossa realidade.

1.3.2 Caracterização genotípica de subgrupos A, B, C de *C. albicans* e subgrupo D para *C. dubliniensis*

A amplificação simples por PCR do fragmento de DNA que codifica para a região da subunidade 25S do ribossomo é uma boa opção simples e barata de tipagem molecular para cepas de *C. albicans*. A Tipagem ABC classifica os isolados em A, B, C e D, sendo o genótipo D determinante para identificação final de *C. dubliniensis*. O subgrupo genotípico A é definido quando é gerada uma banda de tamanho ~450pb e o subgrupo genotípico B quando amplifica uma banda de tamanho de ~840pb devido a presença de um íntron naquela região da subunidade 25S do ribossomo. Estudos recentes pela mesma metodologia mostraram a ocorrência de cepas com as duas bandas, uma de 450pb e a outra de 840 pb, sendo estas produto de heterozigose encontrada nos dois alelos. Estas cepas foram classificadas como subgrupo genotípico C. Subsequentemente, isolados com ausência de bandas tais como as vistas para as cepas subgrupos A, B e C mas que apresentam uma banda maior de tamanho ~1080pb, foram classificadas como subgrupo D e correspondem à espécie *C. dubliniensis* (Scherer, Stevens, 1987; McCullough et al. 1999). Esta banda é encontrada em isolados de *C. dubliniensis* devido a inserção de um íntron que possui ~300 nucleotídios a mais que aquele visto em isolados de *C. albicans* subgrupo B.

O reflexo das diferenças envolvendo os subgrupos de *C. albicans* pode ser notado em cepas de *C. albicans* do subgrupo A, que apresentam claramente susceptibilidade diminuída a 5-fluorocitosina, quando comparadas com aquelas de subgrupos B, C e subgrupo D para *C. dubliniensis*. A ausência do intron está relacionada com a menor susceptibilidade a 5-fluorocitosina em isolados do subgrupo A (McCullough et al. 1999).

Não existe nenhum estudo epidemiológico de nosso conhecimento que demonstrou a proporção entre os subgrupos de *C. albicans* nos isolados recuperados de hemocultura no Brasil.

1.3.3 Tipagem molecular de *C. albicans* a partir de isolamento de episódios de candidemia no Brasil

São poucos os estudos brasileiros que utilizaram alguma ferramenta molecular para tipagem de cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com candidemia. Para tal fim, alguns estudos brasileiros utilizaram as metodologias de RAPD ou cariotipagem por “Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)” para investigação da correlação de cepas de espécies de *Candida* em colonização e infecção de corrente sanguínea (Branchini et al. 1995; Valério et al. 2006; Binelli et al. 2006; Xavier et al. 2008; Miranda et al. 2009).

Branchini et al. (1995) utilizaram a cariotipagem eletroforética por PFGE em seis cepas de *C. albicans* de sangue e 2 de cateter venoso central. Naquele estudo, duas cepas de pacientes distintos apresentaram o mesmo perfil genotípico sugerindo transmissão nosocomial.

Em 2006, Valério et al. analisaram 13 cepas de espécies de *Candida* isoladas de cateter, urina e ferida cirúrgica de pacientes hospitalizados em dois hospitais na cidade de São Paulo e Minas Gerais. Foram encontradas dez cepas de *C. albicans*, que após serem submetidas ao RAPD, apresentaram baixo polimorfismo intraespecífico, parecendo esta técnica ser útil somente para diferenciar os isolados entre as espécies de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* neste estudo.

Binelli et al. (2006) desenharam um estudo caso-controle com 115 casos (candidemia) e 115 controles (bacteremia) para determinar se candidúria está associada com a ocorrência de candidemia. A tipagem molecular por RAPD, PFGE e cariotipagem eletroforética mostrou diferenças em dois dos 13 casos envolvendo a mesma espécie para ambos espécimes clínicos. Os autores não analisaram a variabilidade intra-específica de amostras de *Candida* isoladas apenas de infecção de corrente sanguínea. Foi observado, que em 52% dos pacientes que apresentaram, simultaneamente, candidúria e candidemia pela mesma espécie de levedura, houve envolvimento de isolados com perfil genotípico diferente, sugerindo que o trato urinário não é a fonte de candidemia em grande porcentagem dos casos.

Xavier et al. (2008) aplicaram a técnica de RAPD em 25 isolados clínicos de espécies de *Candida* associadas a candidemia em crianças hospitalizadas em uma unidade de terapia intensiva (UTI) neonatal de um hospital universitário no Mato Grosso entre os anos de 1997 e 2006. A análise molecular apresentou 11 perfis genéticos distintos. Somente em dois casos foi observado um perfil genotípico idêntico sugerindo uma fonte de infecção comum entre os isolados.

Miranda et al. (2009) conduziram um estudo para avaliar os sítios de colonização como potenciais fontes de candidemia. Sessenta e três pacientes com hemocultura positiva para espécies de *Candida* tiveram materiais biológicos coletados dos seguintes sítios: urina, reto, orofaringe, pele, ponta de cateter e pele próxima ao cateter. A tipagem molecular revelou que 6 das 10 cepas de *C. parapsilosis* isoladas de ponta de cateter foram indistinguíveis em relação às de sangue. As cepas de sangue foram indistinguíveis em relação às do TGI em 13 dos 26 pacientes e de ponta de cateter em dois pacientes. Os autores sugeriram que a colonização do TGI é a provável fonte de infecção da candidemia em infecções por *C. albicans*.

Apesar das contribuições apresentadas pelos autores mencionados, todos avaliaram número restrito de amostras de leveduras, particularmente em relação a *C. albicans*, sendo a casuística representativa de apenas um centro médico. Da mesma forma, as técnicas de tipagem utilizadas têm limitado poder discriminatório, particularmente quando comparadas a técnicas de sequenciamento ou SB com sonda Ca3, metodologias mais confiáveis na sua interpretação, reprodutibilidade e poder discriminatório. Não identificamos qualquer publicação de estudo brasileiro avaliando o comportamento do perfil genotípico de cepas de *C. albicans*, provenientes de pacientes com candidemia, utilizando as metodologias de MLST ou Tipagem ABC.

2.0 OBJETIVOS

I – Avaliar a diversidade genotípica de 74 isolados de *C. albicans*, provenientes de 61 pacientes com candidemia, através da tipagem molecular por “multilocus sequence typing (MLST)” e Tipagem ABC.

II – Analisar as diferenças genotípicas por técnica de MLST entre 21 isolados de *C. albicans* provenientes de 6 pacientes que tiveram episódios de candidemia persistente e 2 pacientes com candidemia recorrente.

III – Avaliar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos, na tentativa de correlacionar os genótipos obtidos com a tipagem molecular, com maior ou menor susceptibilidade aos antifúngicos testados.

IV – Avaliar o impacto de isolados de diferentes clados na taxa de mortalidade dos pacientes com candidemia.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes com candidemia e as respectivas amostras clínicas

Pacientes com candidemia: Foram incluídos 61 pacientes que tiveram ao menos um episódio de candidemia por *C. albicans*, cujas cepas foram submetidas a tipagem molecular por MLST e “ABC typing” ou “Tipagem ABC”. Estes pacientes representaram 21% de todos os pacientes infectados por *C. albicans* incluídos no estudo multicêntrico da Rede Nacional de Vigilância de Candidemia (RNVC) que tiveram coletas realizadas em 11 hospitais públicos terciários de 9 importantes cidades brasileiras das regiões sul, sudeste e centro oeste do país (**Tabela 1**) como publicado por Colombo et al. 2006.

Os 61 pacientes incluídos em nossa análise foram selecionados ao longo do estudo da RNVC e portanto, nenhuma coleta de dado clínico foi realizada no presente estudo. Deste modo, apresentamos as características clínicas gerais destes pacientes na **Tabela 2**.

3.2 Pacientes com candidemia persistente ou recorrente e as respectivas amostras clínicas

Para esta análise foram incluídos 8 dos 61 pacientes com candidemia, porém estes pacientes apresentaram episódios de candidemia persistente (6 casos) ou candidemia recorrente (2 casos) durante o estudo da RNVC.

Candidemia persistente foi definida como um episódio de fungemia com duas ou mais culturas positivas para *C. albicans*, em 2 ou mais dias diferentes, a despeito da contínua terapia antifúngica adotada.

Candidemia recorrente foi definida como um episódio de candidemia ocorrendo ao menos 1 mês após o episódio incidente e a negatização de duas hemoculturas sequenciais após a introdução da terapia antifúngica, envolvendo a mesma espécie de *Candida*, como sugerido por Clancy et al. (2000).

Portanto, foram incluídas 21 cepas de *C. albicans* de 8 pacientes com candidemia persistente ou candidemia recorrente que foram recuperadas em dias diferentes. Sete pacientes tiveram duas cepas de *C. albicans* sequencialmente

coletadas, e um deles (P5) apresentou 7 isolados sequenciais, conforme ilustrado na **Tabela 3**.

É importante observar que o paciente (P5), 45 anos, do sexo feminino, apresentou 7 amostras de fungemia por *C. albicans* a despeito da terapia antifúngica recebida. Este paciente em questão teve o cateter venoso central (CVC) removido, e foi submetido a diversas laparostomias entre os dias 07/06/2004 e 03/09/2004. Evoluiu com episódio de endoftalmite fúngica sem qualquer evidência de endocardite.

3.3 Armazenamento das amostras

Durante o estudo da RNVC, os espécimes foram encaminhados ao Laboratório Especial de Micologia (LEMI) da Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo pelos centros médicos que faziam parte deste estudo multicêntrico. As amostras foram armazenadas em um banco de microrganismos, congeladas à temperatura de – 70°C em meio YEPD (Yeast Extract 1%, Peptone 2% e Dextrose 2%) acrescido de 15% de glicerol.

Devido à colaboração existente entre o LEMI e o CDC e à falta de recursos tecnológicos para realização dos sequenciamento das amostras em larga escala em nosso laboratório, nossos isolados foram submetidos aos ensaios de tipagem molecular envolvendo as metodologias de MLST e Tipagem ABC no CDC. Os ensaios foram realizados nos laboratórios do departamento de doenças causadas por fungos e bactérias do CDC na cidade de Atlanta nos EUA, no período de 15 de agosto de 2007 a 31 de julho de 2008. Este estudo foi desenvolvido durante meu estágio nesta instituição com financiamento pelo CNPq dentro do programa de doutorado sanduíche. Todas as cepas de *C. albicans* dos 61 pacientes foram enviadas ao CDC e ficaram à disposição pelo tempo de duração dos ensaios laboratoriais.

3.4 Identificação das espécies de leveduras

Todas as cepas de *C. albicans* foram identificadas por análise do perfil bioquímico pelo método comercial manual ID 32 C (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), complementadas por análise de microcultivo para observação de presença de clamidoconídio.

3.5 Testes de susceptibilidade aos antifúngicos: microdiluição em caldo

O perfil de susceptibilidade a antifúngicos foi realizado frente a anfotericina B (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, EUA), 5-fluorocitosina (Acrós Organics, New Jersey – EUA), itraconazol (Janssen Pharmaceutica, Titusville, NJ, EUA), fluconazol e voriconazol (Pfizer Incorporated, New York, NY, EUA) em ensaios com período de tempo inferior a 3 meses, na tentativa de eliminar variações entre um ensaio e outro. O método utilizado foi a microdiluição em caldo, de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-A2 pelo CLSI (CLSI, 2002). Além dos isolados clínicos, foram incluídas em cada dia de ensaio, a cepa-controle de *C. parapsilosis* (ATCC 22019). Os critérios para definição de categorias de susceptibilidade para anfotericina B, 5-fluorocitosina, itraconazol, fluconazol e voriconazol foram aqueles previamente estabelecidos no documento M27-A2.

3.6 Extração do DNA das amostras estudadas

Para a extração do DNA de leveduras foi utilizado o kit FastDNA da Qbiogene (Irvine, CA, EUA).

3.6.1 Extração de DNA através do kit FastDNA da Qbiogene

Na extração do DNA foi utilizado o protocolo sugerido pelo fabricante e testado por Fredricks et al. (2005). Antes de iniciar extração do DNA utilizando o kit FastDNA da Qbiogene foi adicionado 100mL de etanol a 100% no tubo “SEWS-M Wash Solution” que continha 12mL de uma solução concentrada a ser utilizada durante os procedimentos.

A partir da cultura da *C. albicans* em placa de agar Sabouraud-dextrose com 24 horas de incubação, foi feita uma suspensão de células em 3mL de água esterilizada. Transferiu-se 200uL desta suspensão para o tubo denominado “Lysing Matrix A”. Neste tubo já estavam contidas as esferas de cerâmica para lise da parede celular de forma mecânica. A seguir adicionou-se 1mL da solução de lise “Cell Lysis Solution (CLS-Y)”.

A suspensão foi levada até o equipamento FastPrep (Qbiogene, Irvine, CA, EUA) onde as células foram lisadas por 40 segundos a velocidade de 6 unidades. Em

seguida, a suspensão foi centrifugada a velocidade de 14.000rpm por 5 minutos para separação dos restos celulares.

Foi transferido 600uL do sobrenadante para um tubo de microcentrifuga de 2.0mL e adicionado o volume de 600uL da solução "Binding Matrix" e invertido por 5 minutos gentilmente em um vortex de baixa velocidade.

Centrifugou-se os tubos a 14.000rpm por 10 segundos para obter-se o sedimento e descartou-se o sobrenadante. Foi adicionado 500uL do preparado SEWS-M e gentilmente resuspendido o sedimento utilizando somente o pipetador.

Centrifugou-se as amostras a 14.000rpm por 1 minuto e descartou-se o sobrenadante. Novamente centrifugou-se a 14.000rpm por 10 s para remover todo o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta de 20uL.

O precipitado contendo o DNA foi resuspendido com 100uL da solução Binding Matrix e incubado a 55°C em Banho-Maria por 5 minutos.

Centrifugou-se os tubos a 14.000rpm por 1 minuto e transferiu-se o sobrenadante de cada tubo contendo DNA eluído para tubos de microcentrifuga que foram armazenados em temperatura de 4°C até o uso.

A integridade do DNA genômico obtido foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2%. Os géis foram corados com brometo de etídio e as imagens foram visualizadas em um transiluminador de raios ultravioleta (UVP BioDoc it™ System, Cambridge, UK).

3.7 Amplificação dos fragmentos dos 7 genes selecionados para o estudo do MLST

Foram utilizados sete genes para análise do MLST de *C. albicans* descritos previamente por Bougnoux et al. (2003): *AAT1*, *ACC1*, *ADP1*, *MPIb*, *SYA1*, *VPS13*, e *ZWF1* (**Tabela 4**).

As sequências dos "primers" utilizados na amplificação de cada um dos fragmentos estão descritas na **Tabela 4**.

3.7.1 Amplificação dos fragmentos dos genes utilizados para MLST¹

A reação da PCR foi realizada conforme descrição abaixo para amplificação dos fragmentos de cada um dos sete “housekeeping genes” para o MLST e Tipagem ABC (amplificação de parte da região do DNA que codifica para a subunidade 25S do ribossomo).

A amplificação dos fragmentos pela PCR foi realizada com volume de 50µL contendo ~40ng do DNA genômico, 10mM de cada oligonucleotídio “forward” e “reverse”, 2,5U de Takara Ex Taq DNA polimerase (Takara Bio INC, Otsu, Japan), solução tampão (Takara Bio INC, Otsu, Japan) e 200nM de mix deoxinucleotídio trifosfatado (Takara Bio INC, Otsu, Japan).

A reação da PCR ocorreu no termociclador Gene Amp PCR system 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As condições da reação de PCR para todos os genes foram denaturação por 10 minutos a 94°C seguido de 25 ciclos de denaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização por 1 minuto a 52°C, alongação a 72°C por 1 minuto e extensão final por 10 minutos a 72°C.

3.7.2 Purificação do DNA para sequenciamento

Utilizando a placa de microtitulação Micro Amp 96, adicionou 2µL do ExoSAP-IT (GE HealthCare, Cleveland, OH, EUA) nos poços de acordo com o número de amostras a serem testadas. Transferiu-se 5µL do produto de PCR de cada amostra em 2 poços independentes, misturando os reagentes levemente com a mesma pipeta. Após um “spin²” de 1.400rpm na centrífuga refrigerada na placa de microtitulação, selou-se a placa com objetivo de evitar evaporação do conteúdo dos poços.

As amostras foram colocadas no termociclador onde criou-se um programa chamado ExoSAP em que foram selecionadas duas temperaturas diferentes. A primeira temperatura foi a 37°C por 15 minutos e a segunda a 80°C por mais 15 minutos.

¹A mesma reação do PCR foi realizada para a metodologia de Tipagem ABC utilizando os oligonucleotídios para amplificação da região do DNA que codifica para a subunidade 25S do ribossomo

² Centrifugação rápida em que a centrífuga vai de 0 até 1.400 rpm e retorna a 0 rpm novamente

Adicionou-se 5 µL dos primers com as direções “forward” e “reverse” de cada gene que se estava estudando em cada um dos dois poços de cada amostra de PCR para ser utilizado na reação do sequenciamento.

As placas de microtitulação contendo os produtos de PCRs já purificados e os “primers” adicionados, foram mantidas a 4°C até a sua utilização para sequenciamento dentro de no máximo 1 semana.

3.7.3 Reação de sequenciamento dos fragmentos dos genes escolhidos

Para o sequenciamento, foram utilizados os sete fragmentos descritos ítem 3.7, após a amplificação e purificação dos produtos de PCR.

O sequenciamento foi feito no aparelho ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando os terminadores de cadeia dideoxynucleotídeos fluorescentes BigDye™ Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Este procedimento foi feito na Unidade de Sequenciamento do departamento de doenças causadas por fungos e bactérias do CDC.

As sequências obtidas foram disponibilizadas na forma de cromatogramas. A análise das sequências foi realizada com o auxílio do programa Sequencher 4.8 (Genes Codes Corp, Ann Arbor, EUA), onde foi possível observar os cromatogramas gerados pelo processo de sequenciamento e fazer todas as correções das sequências quando necessárias.

3.7.4 Identificação dos sítios polimórficos ou “single nucleotide polymorphisms (SNPs)” heterozigóticos

O primeiro passo para realizar os alinhamentos das sequências obtidas foi verificar visualmente os cromatogramas quanto à identificação de heterozigoses que caracterizam-se pela presença de dois picos de quase mesmo tamanho, visto na mesma posição. Os sítios heterozigóticos foram substituídos pelas letras K, M, S, R, Y e W, de acordo com o sistema de código internacional IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Estas letras, segundo este código, correspondem a heterozigose nos SNPs a: K= G+T / M=A+C / S=C+G / R=A+G / Y=C+T / W=A+T.

Depois da detecção e identificação correta dos SNPs, as sequências dos fragmentos dos genes obtidos foram alinhadas utilizando-se o programa MEGA 4. Os SNPs encontrados nos sete fragmentos sequenciados foram concatenados em uma sequência simples e convertidos em duas bases conforme descrito em dois estudos (Tavanti et al. 2005, Odds et al. 2007a) num processo conhecido por análise haplótipa.

A construção da forma haplótipa é realizada a partir de cada par das sequências diplóides. As características de cada SNP puderam ser transformados em uma sequência homozigótica ou heterozigótica. Por exemplo, se em um SNP as sequências dos isolados possuem os nucleotídeos A, T ou a forma heterozigótica W, significa que na forma haplótipa estes podem ser representados por AA, TT ou AT respectivamente, sendo cada base proveniente de um dos alelos. Concatenando os dados de todos os SNPs dos sete genes de *C. albicans*, estes foram reescrito em duas letras transformando-se na forma haplótipa de A=A+A, C=C+C, G=G+G ou T=T+T, ou ainda, em relação às heterozigoses correspondentes a K=G+T; M=A+C; R=A+G; S=C+G, W= A+T e Y= C+T. Uma sequência "AYCR" traduzida para a forma haplótipa, seria lida como "AACTCCAG".

Este procedimento gerou sequências que puderam ser analisadas com o programa MEGA 4.0 já que este programa não consegue analisar as sequências modificadas contendo o código da IUPAC, utilizadas para determinar os polimorfismos heterozigóticos.

3.7.5 Introdução das sequências no website oficial do MLST para comparação com a base de dados e utilização do programa eBURST

Neste estudo, utilizamos o website do MLST para *C. albicans* (<http://calbicans.mlst.net>), onde foi possível introduzir a sequência de um determinado gene por vez, para cada isolado. Cada sequência submetida foi comparada com a base de dados do website, o qual forneceu o número do genótipo encontrado entre os diferentes alelos depositados (**Figuras 1, 2 e 3**).

A introdução das sequências no website foi feita após a detecção das heterozigoses. Nesta etapa, utilizou-se as sequências antes da transformação destas na forma haplótipa. Na **Figura 1**, está ilustrado o resultado do sequenciamento do isolado número 59 para o gene *AAT1* (forward) com a sequência incluindo os códigos IUPAC que sinalizam a presença de heterozigoses representadas pela cor vermelha e

pronta para ser analisada no webiste do MLST. A análise das sequências é feita pelo sistema Jalview (Clamp et al. 2004) do website que fornece o número do genótipo se a sequência corresponde a alguma já existente na base de dados de maneira idêntica ou fortemente relacionada a determinado perfil alélico. Desta maneira, se nosso alelo não for encontrado na base de dados do MLST para *C. albicans*, podemos retornar ao nosso cromatograma impresso para verificar se cometemos algum erro durante a análise da leitura visual ou se a diferença encontrada é real.

Os novos alelos encontrados puderam ser adicionados ao banco de dados do website depois do envio das sequências e cromatogramas aos responsáveis pela base de dados que assinalaram estas sequências como sendo novos genótipos.

A **Figura 2** ilustra o website do MLST para *C. albicans*, onde foi introduzido no campo indicado, cada uma das sequências que se pretendia analisar. Foi fornecido pelo website, o número do genótipo que correspondeu à sequência em análise, se outra idêntica já havia sido depositada previamente por outros grupos de pesquisadores.

A **Figura 3** mostra como são adicionados no website do MLST os genótipos obtidos, o que leva a uma combinação de números que gera um número de DST quando este corresponde a uma combinação de genótipos já existente na base de dados.

O DST é determinado pela combinação dos genótipos que são definidos para cada tipo de alelo encontrado para cada gene analisado. É importante notar que no caso da descoberta de novos DSTs ou de uma nova combinação de genótipos que gera um novo DST, é preciso o contato imediato com os responsáveis pela base de dados para obter-se os novos números de DSTs.

O programa do eBURST, que está disponível no website eburst.mlst.net, foi utilizado para identificar o provável ancestral comum entre os complexos clonais na tentativa de estabelecer possíveis relações evolutivas entre as cepas de *C. albicans* incluídas neste estudo, o que é impossível observar através de dendrogramas. O gráfico do eBURST foi gerado simplesmente introduzindo os números de genótipos no website e fornecendo as informações sobre o número de genes a serem avaliados.

3.7.6 Análise dos dados de MLST e definição de clados de *C. albicans*

A análise filogenética dos alinhamentos obtidos foi realizada utilizando o “unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA)” e “neighbor-joining algoritmos” no programa MEGA 4 (Kumar et al. 2008). As análises filogenéticas foram baseadas somente nos SNPs para aumentar ao máximo o poder discriminatório entre os isolados. Os clados foram numerados para serem consistentes com aqueles utilizados em algumas publicações sobre distribuição populacional de cepas de *C. albicans* (Tavanti et al. 2005; Odds et al. 2007a).

Após a obtenção das sequências na forma haplótipa, foi feito o delineamento dos clados de *C. albicans* que foram determinados com o mesmo princípio do estudo realizado por Odds et al. (2007a), simplesmente traçando um ponto de corte no dendrograma no menor ponto “p distance” capaz de separar de maneira consistente os clados 2 e 4. A determinação do clado 2, do clado 4 e todos os outros clados foi feita após utilização de sequências-referência correspondentes a cada um destes clados obtidas no website oficial do MLST (<http://calbicans.mlst.net>) e introdução destas na análise filogenética juntamente com as nossas sequências. Portanto, estas sequências-referência foram utilizadas como controle para definição dos clados neste estudo.

3.8 Metodologia para Tipagem ABC (“ABC typing”)

Este método foi utilizado para identificação de subgrupos de *C. albicans* por PCR. Os nossos isolados foram submetidos à Tipagem ABC para identificação de genótipos A, B, C e D. Esta classificação em subgrupos genotípicos, foi utilizada para aumentar a confiabilidade nos resultados obtidos com a técnica de MLST.

Neste ensaio, o DNA genômico das cepas de *C. albicans* foram amplificados utilizando os oligonucleotídios IPPO-F (GGG AAT CTG ACT GTC TAA TTA A) e IPPO-R (CTT GGC TGT GGT TTC GCT AGA T) que têm como alvo a sequência 25S do rDNA. A reação da PCR, utilizando estes oligonucleotídios, foi realizada nos mesmos padrões que aqueles descritos para os fragmentos do MLST, exatamente como mencionado no item 3.7.1. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,2%) para determinação do respectivo genótipo.

Após coloração do gel com brometo de etídio, os padrões de bandas foram visualizados em um transiluminador de raios ultravioleta (UVP BioDoc itTM System, Cambridge, UK). As bandas de DNA visualizadas no gel de agarose podem ser de 4 padrões diferentes (A,B,C ou D). O subgrupo A apresenta uma banda com ~450 pb. O subgrupo B apresenta um fragmento maior de ~840 pb devido à inserção de um íntron de 379 nucleotídios naquela região do gene 25S rDNA. O subgrupo C apresenta as duas bandas de aproximadamente 450 pb e 840 pb. As cepas de *C. albicans* incluindo a variante *C. stellatoidea*, são classificadas de A até C. Os isolados que apresentam um íntron na mesma região porém com 300 nucleotídios a mais que aquele visto na banda do genótipo B, são denominados subgrupo D e correspondem a espécie *C. dubliniensis*. Portanto, esta espécie apresenta uma banda única de ~1080 pb. A presença ou ausência de íntrons, bem como os seus tamanhos, faz desta metodologia um excelente instrumento para diferenciação molecular destas espécies.

4.0 RESULTADOS

4.1 Resultados da análise de tipagem molecular de 61 pacientes com candidemia

Foram analisados por técnica de MLST e Tipagem ABC o total de 74 isolados de *C. albicans* de 61 pacientes totalizando 21% dos pacientes com cepas de *C. albicans* incluídas no estudo multicêntrico de vigilância de candidemia realizado pelo grupo RNVC, conforme publicado por Colombo et al. (2006). Em primeira análise, foi estudada uma cepa de cada paciente com episódios de candidemia simples.

Dentre os 61 pacientes estudados, oito deles apresentaram candidemia persistente ou recorrente e, portanto, tiveram mais de uma cepa analisada, como será apresentado no **item 4.2** destes resultados. A **Tabela 1** apresenta os centros médicos e as respectivas cidades, assim como o número de pacientes com candidemia e cepas de *C. albicans* incluídas neste estudo. Todos os isolados estudados foram sequencialmente obtidos e identificados por métodos clássicos de identificação antes de serem submetidos à tipagem molecular.

4.1.1 Tipagem molecular por MLST

O tamanho dos fragmentos de DNA obtidos para cada um dos 7 genes estudados apresentavam variações entre 373pb e 491pb resultando no total de 2.883 nucleotídios analisados para cada isolado incluído no estudo. O total de nucleotídios sequenciados e analisados dos 74 isolados dos 61 pacientes foi de 213.342. Entre os 7 fragmentos sequenciados, foram identificados 73 sítios polimórficos variando entre 5 e 13 sítios polimórficos para cada um dos genes

analisados dos 74 isolados estudados. Os fragmentos de genes que apresentavam polimorfismos, tiveram variação de 5 SNPs para *ACC1*, 9 para *ADP1*, 11 para *MPIb*, *SYA1* e *ZWF1* e 13 SNPs para *AAT1* e *VPS13*, como pode ser visto na **Tabela 5**. A porcentagem de sítios variáveis, analisando todos os isolados deste estudo frente aos fragmentos sequenciados, foi 2,63% (73 de 2883 nucleotídios). A análise das sequências obtidas de todas as cepas e fragmentos mostraram que todas as sequências puderam ser alinhadas sem nenhuma interferência de qualquer inserção ou gap.

A **Tabela 6** mostra a diversidade dos genótipos detectada nos sete fragmentos dos genes estudados frente aos isolados de *C. albicans* dos 61 pacientes com candidemia mostrando os respectivos DSTs, genótipos, resultados de Tipagem ABC e clados identificados. Os pacientes com candidemia persistente ou recorrente tiveram mais de um isolado coletado em dias diferentes. Nesta tabela também foi informado se o paciente foi a óbito ou não durante o episódio da candidemia.

4.1.1.1 Diploid Sequence Typing (DST)

Foi observado o total de 48 DSTs entre as amostras dos 61 pacientes, incluindo 10 novos genótipos e 32 novos DSTs que foram inseridos no banco de dados oficial do MLST.

O DST mais comumente isolado entre os pacientes foi o DST 69. Cepas de *C. albicans* DST 69 foram encontradas em 10 (16,5%) pacientes de 6 cidades incluídas no estudo, sendo estas provenientes de Brasília (3 cepas), Curitiba (2), UFRJ no Rio de Janeiro (2), Ribeirão Preto (1), São José do Rio Preto (1) e HSPE em São Paulo (1). O DST 24 foi o segundo mais frequentemente isolado, respondendo a 4 (6,5%) pacientes, sendo 2 do Hospital de Base de Brasília, 1 de Campinas e 1 do HSPE de São Paulo.

Alguns isolados foram encontrados em dois pacientes de cidades diferentes. Dois isolados apresentando DST 601 foram responsáveis por episódios de candidemia em pacientes do Hospital de Clínicas de Curitiba e HSP em São Paulo. O mesmo aconteceu para os isolados DST 277 encontrados na UFRJ no Rio de Janeiro e HSPE em São Paulo. Curiosamente, o DST 1186 foi identificado como novo DST e isolado de pacientes no HSPE em São Paulo e no hospital de Ribeirão Preto. Apesar de termos encontrado os mesmos DSTs em pacientes de diferentes cidades, a grande distância entre estas e a ausência de correlação temporal dos isolamentos, parece improvável que estas cepas tenham a mesma origem clonal.

A **Tabela 7** ilustra a diversidade de DSTs encontrados entre cepas isoladas em diferentes centros médicos. Foram identificados 13 DSTs entre 11 pacientes internados no HSPE, 7 DSTs entre 7 pacientes do Hospital São Paulo, 6 entre 6 pacientes de Campinas, 5 entre 5 pacientes dos hospitais de Ribeirão Preto, São José do Rio Preto e Santa Maria, 4 entre 5 pacientes de Curitiba, 2 entre 5 pacientes de Brasília, 4 entre 4 pacientes de Vitória e Hospital da Lagoa no Rio de Janeiro e 3 entre 4 pacientes da UFRJ no Rio de Janeiro.

Os isolados dos hospitais da Lagoa no Rio de Janeiro, Vitória no Espírito Santo e Santa Maria no Rio Grande do Sul tiveram todos os isolados como sendo novos DSTs quando comparados com as sequências do banco de dados do MLST.

Por outro lado, o Hospital de Base do Distrito Federal em Brasília apresentou 3 isolados DST 69 e 2 isolados DST 24 sendo o único hospital sem nenhum isolado incluído como novo DST na base de dados. Interessante notar que os dois únicos DSTs encontrados nos pacientes em Brasília foram DST 69 e DST 24. Existem somente 5 sítios polimórficos diferentes entre estes DSTs observados no fragmento VPS13, revelando que as cepas de *C. albicans* isoladas naquele centro médico são relativamente próximas, ainda que elas tenham sido coletadas com diferença de 8 meses entre os pacientes. Por outro

lado, estas cepas apresentam os DSTs mais frequentemente encontrados em diferentes regiões do planeta.

Não foi observado nenhuma tendência na obtenção de DSTs exclusivos no Brasil ou mesmo por região geográfica do país.

4.1.1.2 Genótipos do MLST

Foram identificados o total de 101 genótipos entre os 7 fragmentos dos genes de isolados de 61 pacientes incluídos no estudo. Todos os isolados apresentaram no mínimo um sítio heterozigótico.

A heterozigose a partir do produto do PCR do genoma de *C. albicans* pode ser visto a partir de dois picos de quase mesmo tamanho representados nas sequências observadas nos cromatogramas da **Figura 4**. A ocorrência de picos “confundidores” de menor tamanho, pode levar a erros na análise das sequências verdadeiramente heterozigóticas. Entretanto estes erros podem ser minimizados verificando-se a qualidade dos cromatogramas.

Cada SNP dos fragmentos dos genes estudados, pode apresentar numa sequência diplóide, apenas 3 alternativas: por exemplo, homozigose para C (CC), ou para T (TT) ou ainda heterozigose com C e T para cada um dos alelos. Não foi visto nenhuma poliploidia nestes fragmentos durante o nosso estudo, o que poderia ser evidenciado na leitura dos cromatogramas onde seria notado mais de dois picos para a mesma posição no gene. Em *C. albicans*, já foi descrito o fenômeno da aneuploidia que trata-se da perda ou ganho de fragmentos do cromossomo ou do cromossomo inteiro (Selmecki et al. 2005).

O número de genótipos únicos encontrados para os isolados deste estudo variou de 12 a 18 para cada gene totalizando 101, como dito anteriormente. Foram encontrados 12 genótipos únicos para os fragmentos *ACC1*, *ADP1* e *MPIb*, 14 para *SYA*, 15 para *ZWF1* e 18 para os fragmentos *AAT1* e *VPS13*. Portanto, os fragmentos mais discriminatórios foram *AAT1* e *VPS13*.

Foram detectados 855 heterozigoses, como as apresentadas na ilustração da **Figura 4**. A heterozigose mais comum ocorreu pela presença de **Y=C+T** com 352 vezes (41%), **R=A+G** com 275 (32,2%), **W=A+T** com 120 (14%), **M=A+C** com 63 (7,5%) e **K=G+T** com 45 (5,3%). Não foi detectada nenhuma heterozigose por **S=C+G**.

Os 10 novos genótipos foram encontrados nos fragmentos dos genes *AAT1* (2), *ACC1* (1), *ADP1* (1), *VPS13* (1) e *ZWF1* (5) conforme representado na **Tabela 8**. Nenhum novo genótipo foi observado para os genes *MPIb* ou *SYA*. Estes novos genótipos foram provenientes de isolados de pacientes dos hospitais de Santa Maria (3), Vitória (2), Ribeirão Preto (2), da Lagoa (1) no Rio de Janeiro, e Hospital São Paulo (1) e HSPE (1) na cidade de São Paulo. Não foi observado nenhum novo genótipo nos hospitais da cidade Brasília, Curitiba, Campinas, São José do Rio Preto ou na UFRJ no Rio de Janeiro.

As figuras do **Anexo 1** ilustram todos os 73 sítios polimórficos dos sete fragmentos dos “housekeeping genes” estudados. Foi possível verificar nestes sítios, as variações homozigóticas representadas pelas letras A, C, T, e G, ou heterozigóticas pelas letras Y, R, W, M e K.

4.1.1.3 Classificação dos clados, resultado dos dendrogramas e aplicação do conceito do eBURST

De maneira geral, os isolados deste estudo foram enquadrados em nove clados: 1, 2, 3, 4, 8, 9, 12, 16, 17 e um “solitário” de acordo com a classificação sugerida por Odds et al. (2007a). Ainda seguindo este critério, não houve representantes dos clados 5, 6, 7, 10, 11, 13, 14 e 15. Estes achados podem ser confirmados através da **Tabela 9** e **Figura 5**.

No presente estudo, a maioria dos isolados foram enquadrados como pertencentes ao clado 1 com o total de 34 cepas (56%) de *C. albicans*. O clado 3 e clado 8 foram os cladros com maior número de isolados depois de clado 1, totalizando seis isolados (10%) cada um. Os quatro isolados do clado 9 e clado 17 responderam por 6,5% cada um. Três isolados foram apontados com pertencentes ao clado 12 (5%). Foi isolada uma única cepa (1,5%) do clado 2, clado 4, clado 16 e um isolado categorizado como “solitário”.

O isolado identificado como “solitário” não se enquadrou dentro dos 17 cladros classificados por Odds et al. (2007a), sendo este dado confirmado pelo próprio grupo escocês liderado por Dr. Frank Odds.

A distância genética entre as cepas de *C. albicans* incluídas neste estudo foram representadas pela construção de um dendrograma UPGMA utilizando o programa MEGA 4.0 como demonstrado na **Figura 5** e **Anexo 2^a**. Juntamente com nossos isolados foram introduzidas cepas representantes dos 17 cladros segundo Odds et al. (2007a). Foi traçado aleatoriamente um ponto de corte capaz de separar os isolados previamente descritos como pertencentes ao clado 2 e clado 4 o qual também separa os demais cladros. Em nosso estudo, o ponto de corte utilizado foi de 0,1.

A **Figura 6** mostra 8 dendrogramas UPGMA com cepas de *C. albicans* referentes a 61 pacientes incluídos no estudo. No **dendrograma A** estão representadas as distâncias genéticas entre os isolados baseados nos SNPs dos 7 fragmentos estudados. Marcamos arbitrariamente 4 isolados (isolado 18, 131, 228 e 371) pertencentes ao clado 3 com um círculo vermelho. Os **dendrogramas** seguintes de **B** até **H** foram construídos para cada fragmento de gene individualmente onde também estão marcadas as localizações dos 4

^a No **Anexo 2** é possível ver mais claramente o dendrograma da **Figura 6**, de forma ampliada para facilitar a visualização de todos os isolados.

isolados selecionados no dendrograma A. Pudemos perceber que estes isolados somente puderam ser agrupados no **dendrograma A** que analisa a combinação dos 7 fragmentos de genes.

Utilizando o programa eBURST (www.eburst.mlst.net) foi possível definir um ancestral comum entre as cepas do maior complexo clonal visto nesta análise. A **Figura 7** mostra o complexo clonal 1 que incluiu 15 DSTs, onde a base da ancestralidade foi o DST69. Todos os DSTs deste complexo foram enquadrados como pertencentes ao clado 1. Este complexo clonal reúne os DSTs que possuem ao menos 6 dos 7 genótipos idênticos, como descrito anteriormente no **item 3.7.5** do Material e Métodos desta dissertação.

A **Figura 8** foi construída extrapolando a análise da **Figura 7** onde os DSTs incluídos possuem ao menos um genótipo igual a outro DST. Observamos a presença do complexo clonal 1 ao centro e a disposição espacial de todos os outros DSTs e pequenos complexos (às vezes apenas 2 DSTs conectados) mostrando a baixa similaridade entre eles. Os complexos e DSTs que não puderam ser enquadrados no complexo 1 foi em decorrência da apresentação de 2 ou mais fragmento gênicos diferentes. Os DSTs que apresentam-se conectados entre si são aqueles que possuem apenas um dos fragmentos diferente.

4.1.2 Análise molecular por Tipagem ABC

As cepas de *C. albicans* provenientes de 61 pacientes com candidemia foram submetidas a análise molecular utilizando a metodologia de Tipagem ABC. Os resultados estão descritos na **Tabela 10**.

A **Figura 9** mostra um gel de eletroforese com fragmentos provenientes da amplificação da região do DNA que codifica para a subunidade 25S do ribossomo para alguns isolados deste estudo. Aqueles isolados definidos como

tipo A apresentaram bandas contendo ~450 pb. As cepas tipadas como tipo B apresentaram bandas maiores de tamanho ~840 pb devido à presença de um íntron naquela região. Cepas tipo C são aquelas que apresentam as duas bandas (450 pb e 840 pb) devido à heterozigose vista no par de alelos. As cepas tipo D não possuem nenhuma destas duas bandas, porém a presença de um íntron homólogo com aproximadamente 300 nucleotídeos a mais que a banda típica do tipo B, gera uma banda maior com ~1080 pb.

Foram encontradas 50 cepas pertencentes ao tipo A correspondendo a 82% dos isolados. Dez cepas foram tipadas como tipo B (16,5%) e apenas um único isolado como tipo C (1,5%). Não foi isolada nenhuma cepa tipo D que corresponderia à espécie *C. dubliniensis*.

Ainda na **Tabela 10**, é possível verificar a quais clados correspondem as respectivas cepas analisadas por Tipagem ABC no presente estudo. Aqueles isolados enquadrados como Tipo A estão distribuídos nos clados 1, 2, 3, 8, 9, 17 e um isolado como “solitário”. Cepas Tipo B foram representadas nos clados 1, 3, 4, 8, 12 e 16. O único isolado tipado como tipo C pertence ao clado 1.

4.1.3 Análise da tipagem molecular versus hospitais e regiões geográficas do país

A **Tabela 11** mostra a baixa correlação entre os resultados obtidos com a Tipagem ABC e clados de MLST nos diferentes centros médicos. Não foi observada nenhuma tendência de correlação entre os isolados tipados pelas duas metodologias moleculares provenientes de diferentes pacientes, hospitais, cidades ou regiões brasileiras.

4.1.4 Análise do perfil de susceptibilidade a antifúngicos

O **Anexo 3** apresenta as CIMs de todos os 74 isolados de *C. albicans* provenientes dos 61 pacientes incluídos no estudo da RNVC frente a cinco antifúngicos.

Foram analisados 370 resultados de CIMs referentes a 5 antifúngicos testados contra todas as cepas de *C. albicans* dos 61 pacientes com candidemia sendo a análise completa dos dados, inseridas na **Tabela 12**. Em todos os dias de ensaio foram incluídos entre as amostras a serem testadas um organismo-controle da ATCC (American Type Culture Collection), representado pela *C. parapsilosis* ATCC 22019. A variação dos valores de CIMs da ATCC 22019 foi entre 0,25 a 1,0 μ g/mL para anfotericina B, 1,0 a 4,0 μ g/mL para fluconazol, 0,03 a 0,125 μ g/mL para itraconazol, 0,125 a 0,5 μ g/mL para 5-fluorocitosina e 0,03 a 0,06 μ g/mL para voriconazol. Estes valores são compatíveis com aqueles estabelecidos pela metodologia do CLSI (CLSI, 2002).

Em relação aos isolados clínicos, as variações das CIMs para as cepas de *C. albicans* estudadas foi de 0,125 μ g/mL a 1,0 μ g/mL para anfotericina B, 0,125 μ g/mL a 64,0 μ g/mL para fluconazol, 0,125 μ g/mL a \geq 64,0 μ g/mL para 5-fluorocitosina, 0,03 μ g/mL a 0,5 μ g/mL para itraconazol e 0,03 μ g/mL a 4,0 μ g/mL para voriconazol.

Foi observada alta susceptibilidade para os 5 antifúngicos testados na maior parte das amostras (**Tabela 12**). Nenhuma amostra apresentou valores de CIM para anfotericina B superiores a 1,0 μ g/ml mostrando alta susceptibilidade frente a este antifúngico. Um único isolado (1,5%) foi resistente a fluconazol e voriconazol apresentando susceptibilidade dose dependente a itraconazol com CIMs de 64,0 μ g/mL 4,0 μ g/mL e 0,5 μ g/mL, respectivamente. Um isolado (1,5%) foi resistente a 5-fluorocitosina e dois (3%) apresentaram susceptibilidade intermediária a este antifúngico.

Todos os isolados de *C. albicans* (n = 23 / 31%) que apresentaram CIMs $\geq 1,0 \mu\text{g/mL}$ para 5-fluorocitosina foram tipadas como pertencentes ao tipo A clado 1. Portanto nenhuma cepa tipo B ou C apresentou CIMs maiores que $0,5\mu\text{g/mL}$ para 5-fluorocitosina. A **Tabela 13** mostra a forte tendência entre a diminuída susceptibilidade a 5-fluorocitosina e genótipos tipo A clado 1.

4.1.5 Mortalidade entre os pacientes e resultados da tipagem molecular

Dentro desta análise, os pacientes que foram a óbito no espaço de 30 dias depois da primeira hemocultura positiva representaram 60,7% (n=37) da nossa coleção estudada.

Embora o tamanho amostral seja limitado, notamos a maior ocorrência de óbitos nos pacientes infectados por cepas de clado 3 (5 dos 7 pacientes morreram) e clado 8 (6 de 6 pacientes morreram) do que em pacientes infectados por isolados clado 1 que respondeu pela maioria dos casos (21 de 34 pacientes morreram). Em relação à Tipagem ABC, não foi visto qualquer aumento na distribuição das taxas de óbito.

Não pudemos estabelecer relação causal entre o clado 3 e clado 8 de *C. albicans* e o número de óbitos, pois outras variáveis de relevante poder prognóstico em candidemia não foram avaliadas na presente casuística.

4.2 Resultados da análise de tipagem molecular de 8 pacientes com candidemia persistente ou candidemia recorrente

Dentro do contexto deste estudo, selecionamos 21 cepas de *C. albicans* de 8 pacientes com candidemia persistente (6) ou recorrente (2) em que testamos a reprodutibilidade da metodologia do MLST e Tipagem ABC nas amostras sequenciais e fortemente relacionadas destes pacientes individualmente, além de investigar possíveis microvariações entre as cepas dos mesmos pacientes, ou ainda, se os pacientes foram infectados por uma nova cepa de *C. albicans*.

Os sete fragmentos dos genes sequenciados para as 21 cepas estudadas identificaram o total de 63 sítios variáveis ou polimórficos quando utilizado o programa MEGA 4 para alinhar somente as sequências deste grupo de isolados. A **Tabela 3** apresenta os resultados da tipagem molecular tanto por Tipagem ABC quanto por MLST. Dois genótipos e três DSTs foram incluídos como sendo inéditos na base de dados do website oficial do MLST para *C. albicans*, tendo sido encontrados os genótipos 185 para o fragmento VPS13 e 156 para o *ZWF1*. Os três novos DSTs foram: DST 1168, 1175 e 1192. Os 21 isolados obtidos de 8 pacientes geraram 10 DSTs únicos. Três pacientes de diferentes instituições tiveram isolados classificados como DST 69.

Um paciente (P5 conforme **Tabela 3**), hospitalizado no Hospital do Servidor Público Estadual com candidemia persistente, teve 7 cepas de *C. albicans* coletadas sequencialmente em 10 dias apresentando 3 DSTs distintos (DST 24, 1175 e 1192). Os isolados deste paciente foram distintos e assinalados para 3 diferentes clados. As primeiras 4 amostras foram incluídas no clado 1, a quinta e a sexta amostras foram assinaladas para o clado 3. Significativamente, a cepa da sétima e última coleta foi a única assinalada como clado 2.

A **Figura 10** ilustra o dendrograma UPGMA dos 21 isolados construído a partir das sequências concatenadas dos SNPs.

A **Tabela 3** também mostra as CIMs de 3 agentes antifúngicos frente aos isolados de *C. albicans* dos pacientes com candidemia persistente ou recorrente, assim como os resultados dos DSTs e Tipagem ABC.

Todas as cepas provenientes de pacientes com persistência ou recorrência em candidemia foram sensíveis aos três antifúngicos testados. Os pacientes com candidemia persistente ou recorrente exibiram pouca variabilidade nas CIMs com os isolados sequenciais. Os isolados dos 8 pacientes permaneceram susceptíveis a todos os antifúngicos testados.

Tabelas de 1 a 14

Tabela 1. Apresentação dos centros médicos e suas respectivas cidades, número de pacientes com candidemia e cepas de *C. albicans* incluídas na análise deste estudo.

No. do centro ^a	Centro Médico ^b	Cidade/Estado (sigla)	No. de Pacientes	No. de Cepas
1	Hospital de Clínicas – UFSM	Santa Maria/RS	5	6
2	Hospital de Clínicas – UFPR	Curitiba/PR	5	5
3	Hospital São Paulo – UNIFESP	São Paulo/SP	7	8
4	Hospital de Clínicas – UNICAMP	Campinas/SP	6	6
5	Hospital das Clínicas – USP Ribeirão Preto	Ribeirão Preto/SP	5	5
6	Hospital Universitário – UFRJ	Rio de Janeiro/RJ	4	4
8	Hospital de Clínicas – UFES	Vitória/ES	4	4
9	Hospital de Base do Distrito Federal	Brasília/DF	5	6
12	Hospital do Servidor Público Estadual – HSPE	São Paulo/SP	11	20
13	Hospital da Lagoa	Rio de Janeiro/RJ	4	4
14	Hospital de Base de São José do Rio Preto	São J. do Rio Preto/SP	5	6

^a Os centros 07, 10 e 11 foram excluídos do estudo RNVC, por isto o número de centros não segue uma ordem sequencial

^b Siglas dos centros médicos: UFSM = Universidade Federal de Santa Maria; UFPR = Universidade Federal do Paraná; UNIFESP = Universidade Federal de São Paulo; UNICAMP = Universidade Estadual de Campinas; USP = Universidade de São Paulo; UFRJ = Universidade Federal do Rio de Janeiro; UFES = Universidade Federal do Espírito Santo e HSPE = Hospital do Servidor Público Estadual

Tabela 2. Características clínicas de 61 pacientes com episódios de candidemia por *C. albicans*.^a

Variáveis	Dados para 61 pacientes
Medida da idade (variação)	42 anos (0 a 83)
No. de homens (%)	32 (52,5)
No. de casos por doença de base (%)	
Câncer	13 (21,3)
Insuficiência Cardíaca	14 (23)
Insuficiência Respiratória	13 (21,3)
Insuficiência Hepática	5 (8,2)
Doença Neurológica	14 (23)
Diabetes	13 (21,3)
Insuficiência Renal	16 (26,2)
Transplante de órgão	5 (8,1)
Infecção por HIV ^b	1 (1,6)
No. de pacientes com características específicas (%)	
Uso de corticóides	20 (32,8)
Neutropenia	2 (3,3)
Ventilação Mecânica	25 (41)
Diálise	13 (21,3)
Cirúrgia prévia	33 (54,1)
Cirúrgia abdominal	23 (37,7)
Presença de cateter venoso central	40 (65,6)
Nutrição parenteral	26 (42,7)
Terapia antibiótica prévia	58 (95,1)
Uso prévio de antifúngico	10 (16,4)
Mortalidade Geral	37 (60,7)

^a Estes dados foram gerados fazendo a análise estatística utilizando o programa SPSS versão 15.0.

^b Vírus da Imunodeficiência Adquirida

Tabela 3. Resultados de tipagem molecular por MLST, Tipagem ABC e CIMs dos antifúngicos de 21 cepas de 8 pacientes que apresentaram episódios de candidemia persistente ou candidemia recorrente.

No. do paciente (CP or CR) ^a	isolado n°	Centro Médico ^b	Data da coleta	Genes do MLST ^c							DST	Tipagem ABC	Clado	MIC (µg/mL)		
				<i>AAT1</i>	<i>ACC1</i>	<i>ADP1</i>	<i>MPIb</i>	<i>SYA1</i>	<i>VPS13</i>	<i>ZWF1</i>				Fluconazol	5-Fluorocitosina	Voriconazol
P1 (CP)	1	Santa Maria	14/03/2003	54	31	10	36	66	185 ^c	111	1168 ^d	B	16	0,125	0,125	0,03
	2	Santa Maria	01/04/2003	54	31	10	36	66	185 ^c	111	1168 ^d	B	16	0,125	0,125	0,03
P2 (CP)	77	HSP	09/04/2003	21	17	21	19	27	83	22	601	B	12	0,125	0,125	0,03
	78	HSP	11/04/2003	21	17	21	19	27	83	22	601	B	12	0,125	0,125	0,03
P3 (CP)	192	R, Preto	06/10/2003	8	5	5	2	2	6	5	572	A	1	0,25	2	0,03
	193	R, Preto	09/10/2003	8	5	5	2	2	6	5	572	A	1	0,125	2	0,03
P4 (CP)	306	HSPE	15/06/2004	2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	0,25	2	0,06
	307	HSPE	19/06/2004	2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	0,25	1	0,03
P5 (CP)	314	HSPE	20/07/2004	2	5	5	2	2	24	5	24	A	1	0,25	2	0,03
	315	HSPE	22/07/2004	2	5	5	2	2	24	5	24	A	1	0,125	2	0,03
	316	HSPE	23/07/2004	2	5	5	2	2	24	5	24	A	1	0,125	2	0,03
	317	HSPE	25/07/2004	2	5	5	2	2	24	5	24	A	1	0,125	2	0,03
	318	HSPE	26/07/2004	13	7	15	6	7	55	156 ^d	1175 ^d	B	3	0,125	2	0,03
	319	HSPE	28/07/2004	13	7	15	6	7	55	156 ^d	1175 ^d	B	3	0,125	2	0,03
	320	HSPE	29/07/2004	35	2	4	4	36	4	4	1192 ^d	A	2	0,5	2	0,03
P6 (CP)	378	SJRP	15/03/2004	2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	0,5	2	0,03
	379	SJRP	25/03/2004	2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	0,5	2	0,06
P7 (CR)	349	HSPE	01/11/2004	2	2	5	2	2	6	5	277	A	1	0,125	0,125	0,03
	350	HSPE	06/12/2004	2	2	5	2	2	6	5	277	A	1	0,125	0,125	0,03
P8 (CR)	275	Brasília	09/08/2004	2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	0,5	2	0,03
	276	Brasília	28/10/2004	2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	0,125	2	0,03

^a CP: Candidemia Persistente – CR: Candidemia Recorrente

^b HSP = Hospital São Paulo; R, Preto = Ribeirão Preto; HSPE = Hospital do Servidor Público Estadual; SJRP = São José do Rio Preto

^c Fragmentos dos “housekeeping genes” estudados por MLST

^d Novos genótipos ou novos “diploid sequence typings” (DSTs)

Tabela 4. Lista de fragmentos de genes amplificados no ensaio do MLST para *C. albicans* com as seqüências dos respectivos primers.

Gene	Produto do Gene	Primers ^a	Fragmentos sequenciados (pb)	5' seqüência inicial	3' seqüência inicial
<i>AAT1</i>	<i>Asparato aminotransferase</i>	Fwd 5'-ACTCAAGCTAGATTTTTGGC-3' Rev 5'-CAGCAACATGATTAGCCC-3'	373	ATTGAA	CGTTTC
<i>ACC1</i>	<i>Acetil coenzima carboxilase A</i>	Fwd 5'-GCAAGAGAAATTTAATTCATG-3' Rev 5'-TTCATCAACATCATCCAAGTG-3'	407	TTTTGAGGTCA	TTCCACAAGA
<i>ADP1</i>	<i>Permease ATP-dependente</i>	Fwd 5'-GAGCCAAGTATGAATGATTTG-3' Rev 5'-TTGATCAACAAACCCGATAAT-3'	443	CACGTTGCAA	GGAAATCCAA
<i>MPIb</i>	<i>Manose fosfato isomerase</i>	Fwd 5'-ACCAGAAATGGCCATTGC-3' Rev 5'-GCAGCCATGCATTCATTAT-3'	375	TTTAAACC	GGGAAGCA
<i>SYA1</i>	<i>Alanil-RNA sintetase</i>	Fwd 5'-AGAAGAATTGTTGCTGTTACTG-3' Rev 5'-GTTACCTTTACCACCGCTTT-3'	391	TAAATCTAAA	AGCTGTATCA
<i>VPS13</i>	<i>Proteína Vacuolar</i>	Fwd 5'-TCGTTGAGAGATAATCGACTT-3' Rev 5'-ACGGATGGATCTCCAGTCC-3'	403	CTTGATATG	CAAATCATGG
<i>ZWF1</i>	<i>Glicose-6-fosfato desidrogenase</i>	Fwd 5'-GTTTCATTTGATCCTGAAGC-3' Rev 5'-GCCATTGATAAGTACCTGGAT-3'	491	AAACCAGG	TTGAATTAC

^aPara as direções "Forward (Fwd)" ou "Reverse (Rev)"

Tabela 5. Apresentação dos resultados de sete fragmentos de "housekeeping genes" com o número de pares de bases sequenciados, número de genótipos e número de sítios polimórficos identificados durante o estudo.

Gene	Tamanho em pares de bases (pb)	No, de genótipos identificados	Número de sítios polimórficos
<i>AAT1</i>	373	18	13
<i>ACC1</i>	407	12	5
<i>ADP1</i>	443	12	9
<i>MPIb</i>	375	12	11
<i>SYA1</i>	391	14	11
<i>VPS13</i>	403	18	13
<i>ZWF1</i>	491	15	11
Total	2,883	101	73

Tabela 6. Tabela geral dos isolados de 61 pacientes com episódios de candidemia por *C. albicans* com as informações do centro médico ou cidade de isolamento, tipagem molecular por Tipagem ABC e MLST incluindo todos os genótipos, DSTs e clados em que as cepas foram categorizadas. Foi informado se o paciente foi ou não a óbito.

Paciente	No. CDC	Centro	Genes do MLST ^a							DST ^b	Tipagem ABC	Clado	Óbito
			AAT1	ACC1	ADP1	MPIb	SYA1	VPS 13	ZWF1				
1	1		54	31	10	36	66	185	111	1168	B	16	Não
	2		54	31	10	36	66	185	111	1168	B	16	
2	13		55	14	4	54	6	6	15	1177	A	8	Sim
3	18		13	13	85	6	50	32	15	1169	B	3	Não
4	32	Santa Maria	20	3	6	2	51	36	5	1178	A	1	Não
5	38		2	5	5	12	2	6	154	1170	A	1	Sim
6	42		25	7	6	3	34	24	37	1179	A	8	Sim
7	50		70	14	6	4	35	10	8	1180	B	4	Sim
8	59		2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	Sim
9	65		21	17	21	19	27	83	22	601	B	12	Não
10	76	Curitiba	2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	Sim
11	77		21	17	21	19	27	83	22	601	B	12	Não
	78		21	17	21	19	27	83	22	601	B	12	Não
12	82		2	5	5	2	2	6	16	104	A	1	Sim
13	93		2	8	2	2	2	6	5	1181	A	1	Sim
14	102		42	5	5	19	2	6	5	1182	A	1	Sim
15	108		2	5	5	2	2	6	154	1171	A	1	Não
16	118	HSP ^c (São Paulo)	2	5	6	2	2	20	5	515	A	1	Não
17	130		13	10	15	2	2	37	15	1183	B	3	Sim
18	131		13	10	15	6	7	37	15	344	B	3	Sim
19	132		33	14	38	2	78	122	5	1184	B	8	Sim
20	148		2	3	5	9	2	6	5	435	A	1	Sim
21	160		2	5	5	2	2	24	5	24	A	1	Sim
22	172		2	2	6	2	2	6	5	1185	A	1	Sim
23	173	Campinas	108	5	5	2	2	6	5	1172	A	1	Sim
24	181		60	3	3	3	3	39	95	1186	A	9	Sim
25	192		8	5	5	2	2	6	5	572	A	1	Não
	193		8	5	5	2	2	6	5	572	A	1	
26	205		2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	Não
27	225	Ribeirão Preto	47	14	57	28	44	30	136	1173	A	17	Não
28	228		13	7	15	6	7	32	15	957	B	3	Sim
29	233		2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	Sim
30	235		47	14	57	28	44	30	5	1187	A	17	Sim
31	244	UFRJ ^d (Rio de Janeiro)	2	2	5	2	2	6	5	277	A	1	Sim
32	245		2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	Não
33	248		60	3	3	3	3	39	3	1188	A	9	Não
34	249		2	5	2	4	2	24	5	1189	A	1	Não
35	250		109	7	10	4	65	110	155	1174	A	solitário	Sim
36	261	Vitória	2	5	5	27	2	71	5	1190	A	1	Sim
37	265	Brasília	2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	Não
38	266		2	5	5	2	2	24	5	24	A	1	Não
39	272		2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	Não
40	275		2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	Não

TABELAS

41	276		2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	
	283		2	5	5	2	2	24	5	24	A	1	Sim
42	286		2	2	5	4	2	6	5	1191	A	1	Sim
43	299		2	5	6	2	2	6	5	519	A	1	Sim
44	305		2	5	5	4	2	6	5	444	A	1	Sim
45	306		2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	Não
	307		2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	
46	314		2	5	5	2	2	24	5	24	A	1	Não
	315		2	5	5	2	2	24	5	24	A	1	
	316		2	5	5	2	2	24	5	24	A	1	
	317		2	5	5	2	2	24	5	24	A	1	
	318		13	7	15	6	7	55	156	1175	B	3	
	319		13	7	15	6	7	55	156	1175	B	3	
	320		35	2	4	4	36	4	4	1192	A	2	
47	321		2	7	6	3	6	27	37	1193	A	8	Sim
48	328		8	2	5	2	2	6	5	1047	A	1	Sim
49	331		21	17	21	19	27	27	22	1194	B	12	Não
50	337		62	3	3	3	3	39	95	918	A	9	Sim
51	349		2	2	5	2	2	6	5	277	A	1	Sim
	350	HSPE ^e	2	2	5	2	2	6	5	277	A	1	
	361	(São Paulo)	60	3	3	3	3	39	95	1186	A	9	Sim
53	363		31	5	6	2	2	6	5	1195	C	1	Sim
54	364	Hospital	13	74	15	6	7	37	5	1176	A	3	Sim
55	366	Lagoa	47	14	52	28	44	30	6	1196	A	17	Não
56	370	(Rio de Janeiro)	8	5	2	2	2	24	5	1197	A	1	Não
57	371		13	11	15	15	50	37	15	1198	A	3	Sim
58	372		47	3	52	28	44	4	6	1199	A	17	Não
59	378		2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	Não
	379		2	5	5	2	2	6	5	69	A	1	
60	384	S, José	55	14	4	3	6	45	15	365	A	8	Sim
61	386	Rio Preto ^f	25	7	6	3	6	27	37	90	A	8	Sim

^a Fragmentos dos "housekeeping genes" estudados por MLST

^b DST: Diploid sequence typing

^c HSP: Hospital São Paulo

^d UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

^e HSPE: Hospital do Servidor Público Estadual

^f S, José Rio Preto: São José do Rio Preto

Tabela 7. Número de DSTs únicos por centro médico definidos pela metodologia de MLST entre as cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com candidemia.

No. centro	Centros médicos ou cidade	No. de isolados	No. de DSTs únicos por centro
01	Santa Maria	5	5
02	Curitiba	5	4
03	HSP – São Paulo	7	7
04	Campinas	6	6
05	Ribeirão Preto	5	5
06	UFRJ – Rio de Janeiro	4	3
08	Vitória	4	4
09	Brasília	5	2
12	HSPE – São Paulo	11	13 ^a
13	Lagoa – Rio de Janeiro	4	4
14	São José do Rio Preto	5	5

^a um paciente apresentou três cepas distintas de *C. albicans* durante um único episódio de candidemia

Tabela 8. Número de novos genótipos encontrados entre as cepas de *C. albicans* de pacientes com episódios de candidemia.

No. centro	Centro ou Cidade	Genes do MLST ^a						
		AAT1	ACC1	ADP1	MPIb	SYA1	VPS13	ZWF1
01	Santa Maria			1			1	1
02	Curitiba							
03	HSP – São Paulo							1
04	Campinas							
05	Ribeirão Preto	1						1
06	UFRJ – Rio de Janeiro							
08	Vitória	1 ^b						1 ^b
09	Brasília							
12	HSPE – São Paulo							1
13	Lagoa – Rio de Janeiro		1					
14	São José do Rio Preto							
	Total	2	1	1			1	5

^a Fragmentos dos "housekeeping genes" estudados por MLST

^b cepa isolada de um único paciente

Tabela 9. Porcentagem de cepas de *C. albicans* categorizadas nos 17 clados conhecidos.

total ^a	Clados %																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	"solitário"
61	56	1,5	10	1,5	0	0	0	10	6,5	0	0	5	0	0	0	1,5	6,5	1,5

^a Foi analisada somente 1 cepa por paciente para a construção desta tabela

Tabela 10. Distribuição e porcentagem dos genótipos por Tipagem ABC dos isolados de 61 pacientes incluídos no estudo.

Subgrupo ABCD	(n)	%	Clados
Tipo A	50	82	1, 2, 3, 8, 9, 17, "solitário"
Tipo B	10	16,5	1, 3, 4, 8, 12, 16
Tipo C	1	1,5	1
Tipo D ^a	0	0	-

^a Genótipo tipo D define a identificação como *C. dubliniensis*

Tabela 11. Correlação entre a Tipagem ABC e clados definidos por MLST de acordo com cada centro médico.

Centro médico ou cidade	Tipagem ABC (n)	Clados
01 – Santa Maria	A (3)	1, 8
	B (2)	3, 16
02 – Curitiba	A (3)	1, 8
	B (2)	4, 12
03 – HSP ^a	A (5)	1
	B (2)	1,12
04 – Campinas	A (4)	1
	B (2)	3, 8
05 – Ribeirão Preto	A (4)	1, 9, 17
	B (1)	3
06 – UFRJ ^b	A (4)	1, 17
08 – Vitória	A (4)	1, 9, "solitário"
09 – Brasília	A (5)	1
12 – HSPE ^c	A (10)	1, 2, 8, 9
	B (1)	12
13 – Lagoa ^d	A (3)	1, 3, 17
	C (1)	1
14 – São José do Rio Preto	A (5)	1, 3, 8, 17

^a HSP: Hospital São Paulo

^b UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

^c HSPE: Hospital do Servidor Público Estadual

^d Hospital da Lagoa

Tabela 12. Variação de valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM), CIM₅₀, CIM₉₀ e porcentagem de resistência frente aos antifúngicos testados para isolados de *C. albicans* em 61 pacientes com candidemia.

Antifúngicos	Variação das CIMs ^a (µg/mL)	CIM ₅₀ ^b (µg/mL)	CIM ₉₀ ^c (µg/mL)	%R ^d (n) (µg/mL)
Anfotericina B	0,125 – 1,0	0,5	1,0	0
Fluconazol	0,125 – 64	0,25	0,5	1,5 (1)
Itraconazol	0,03 – 0,5	0,03	0,03	0
5-fluorocitosina	0,125 – ≥64	0,25	2	1,5 (1)
Voriconazol	0,03 – 4	0,03	0,03	1,5 (1)

^a Variação dos valores, representando os limites inferior e superior das CIMs de cada antifúngico

^b CIM₅₀, definida como a concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas

^c CIM₉₀, definida como a concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas

^d Porcentagem de resistência

Tabela 13. Correlação de CIMs elevadas para 5-fluorocitosina e fluconazol versus genótipos e clados de MLST e genótipos de Tipagem ABC.

Nº CDC	Centro Médico	CIM 5FC ^b (µg/mL)	DST	Clado (MLST)	Tipagem ABC
59	Curitiba	4	69	1	A
102	HSP ^a	>64	1182	1	A
148	Campinas	4	435	1	A
266	Brasília	8	24	1	A
328	HSPE ^a	4	1047	1	A
370	Lagoa ^a	4	1197	1	A
372	SJ Rio Preto ^a	16	1199	1	A

Nº CDC	Centro Médico	CIM Fluco ^c (µg/mL)	DST	Clado (MLST)	Tipagem ABC
305	HSPE ^a	64	444	1	A

^a Centros médicos: HSP = Hospital São Paulo – HSPE = Hospital do Servidor Público Estadual – Lagoa = Hospital da Lagoa – SJ Rio Preto = São José do Rio Preto

^b 5FC: 5-fluorocitosina

^c Fluco: fluconazol

Tabela 14. Variação no número de genótipos e sítios polimórficos dos fragmentos de genes analisados entre estudos que utilizaram MLST.

Estudos^a (ano)	No. de genes avaliados	No. de isolados	Variação no No. de genótipos^b	No. de sítios polimórficos^c sobre o total de pb sequenciadas (%)
Bougnoux et al, (2002)	6	42	10 a 24	68 de 2354 (2,9%)
Tavanti et al, (2003)	8	75	6 a 16	87 de 3131 (2,8%)
Robles et al, (2004)	7	29	5 a 12	61 de 2834 (2,1%)
Tavanti et al, (2005)	7	416	10 a 21	109 de 2883 (3,8%)
Chen et al, (2006)	7	51	6 a 16	83 de 2883 (2,9)
Chowdhary et al, (2006)	7	37	7 a 12	70 de 2883 (2,4%)
Presente estudo (2009)	7	74	12 a 18	76 de 2883 (2,6%)

^a Após o ano de 2006, nenhum outro estudo descreveu estas informações talvez devido a estabilidade na proporção, variação de genótipos e número de sítios polimórficos,

^b Variação no número de genótipos em MLST

^c Número de sítios polimórficos para metodologia de MLST

Figuras de 1 a 10

Sequência obtida do isolado 59 para o gene *AAT1* (Forward)

```
ATTGAARTGGAATGATATTCCATTGGCTCCACCAGACAARTTTTTGGGTATTTCTGAAGCTT  
ATAACAATGATTCTAACCCCTCAAAAARTCAATTTGGGGTTGGTGCTTATAGAGATAATTCY  
GGTAAACCAATTATTTTCCCATCAGTTAAAAAAGCTGAAGAAATTTTATTGGGTAAAGAACT  
GAAAAGGAATATACTGCCATTGTTGGTTCCAAAAATTTCCAATCAATTGTGAAAAATTTTATT  
TTCAACAATTCTAATAAAGATGCCAATGGTAAACAATTAATTGATGATGGTAGAATTGTTACT  
GCTCAAACCATCTCTGGTACTGGATCACTTAGAGTTATCGCTGATTTCTTGAATCGTTTC
```

Figura 1. Produto do sequenciamento do fragmento do gene *AAT1* (forward) do isolado 59 para definição do número do genótipo utilizando o website do MLST para *C. albicans*. As letras em vermelho significam a presença de heterozigose naqueles SNPs específicos.

The figure displays two sequential screenshots of the MLST (Multi Locus Sequence Typing) website interface for *Candida albicans*. The top screenshot shows the 'Single Locus Sequence Query' page. The user has selected the 'AAT1a' allele from a dropdown menu. A text area contains a DNA sequence: ATTGAARTGGAATGATATTCCATTGGCTCCACCAGACAARATTTGGGTATTCTGAAGC TTATAACAATGATTCTAACCCCTCAAAAARTCAATTTGGGGTTGGTGCTTATAGAGATAA TTCYGGTAAACCAATTTTCCCATCAGTTAAAAAGCTGAAGAAATTTATTGGGTAAGRAACTGAAAAGGAATATACTGCCATTGTTGGTCCRAAAATTTCCAATCAATTGTGAA AAATTTCAATTTCAACAATCTAATAAAGATGCCAATGGTAAACAATTAATTGATGATGG TAGAATTGTTACTGCTCAAACCATCTCTGGTACTGGATCACTTAAAGTTATCGCTGATTT CTTGAATCGTTTC. Below the sequence, there are two buttons: 'Simple Results' and 'View mismatches(BETA)'. A red arrow points from the 'Simple Results' button to the bottom screenshot. The bottom screenshot shows the same page after a search. A search bar at the top of the main content area displays 'SEARCH RESULTS :YOUR ALLELE NUMBER IS 2'. The 'AAT1a' allele is still selected in the dropdown menu. The 'Simple Results' button is now highlighted, and the 'View mismatches(BETA)' button is also visible. The left sidebar contains a list of databases with checkboxes next to various species names, including *B. burgdorferi*, *B. cereus*, *B. pseudomallei*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. jejuni*, *C. neoformans var grubii*, *E. coli*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *H. influenzae*, *H. pylori*, *Leptospira spp.*, *M. catarrhalis*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *S. enterica*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. suis*, and *V. vulnificus*. The top navigation bar includes the MLST logo, a 'Policy Document' link, and the date 'Tuesday 16th June 2009'.

Figura 2. Website oficial do MLST (<http://calbicans.mlst.net/>) para comparação da sequência do fragmento do gene à qual se pretende obter um número de genótipo.

MLST Multi Locus Sequence Typing

Policy Document Friday 26th June 2009

DATA ANALYSIS

DATABASES

- B.burgdorferi*
- B.cereus*
- B.pseudomallei*
- C.albicans*
- C.glabrata*
- C.krusei*
- C.tropicalis*
- C.jejuni*
- C.neoformans var grubii*
- E.coli*
- E.faecalis*
- E.faecium*
- H.influenzae*
- H.pylori*
- Leptospira spp.*
- M.catarrhalis*
- N.meningitidis*
- S.agalactiae*
- S.aureus*
- S.enterica*
- S.epidermidis*
- S.pneumoniae*
- S.pyogenes*
- S.suis*

Candida albicans - consensus - Allelic Profile Query

Please enter your query below (the figure below each box represents the number of unique alleles in the current database for that locus)-

AAT1a	ACC1	ADP1	MP1b	SYA1	VPS13	ZWF1b
<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="5"/>	<input type="text" value="5"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="6"/>	<input type="text" value="5"/>
119	79	97	99	150	194	198

Please select Query type:

Please choose which dataset to interrogate:
 or

Profile Query **Locus Query**

MLST Multi Locus Sequence Typing

Policy Document Friday 26th June 2009

DATA ANALYSIS

DATABASES

- B.burgdorferi*
- B.cereus*
- B.pseudomallei*
- C.albicans*
- C.glabrata*

Candida albicans - consensus - Allelic Profiles query results:

Your sequence type is 69

Strain	ST	Serotype	AAT1a	ACC1	ADP1	MP1b	SYA1	VPS13	ZWF1b
			2	5	5	2	2	6	5
81/090	69		2	5	5	2	2	6	5

Figura 3. Adição dos genótipos encontrados para a determinação do DST. Esta figura mostra como são adicionados os genótipos obtidos, levando a uma combinação que gera o DST, quando este corresponde a uma combinação de genótipos já existente na base de dados.

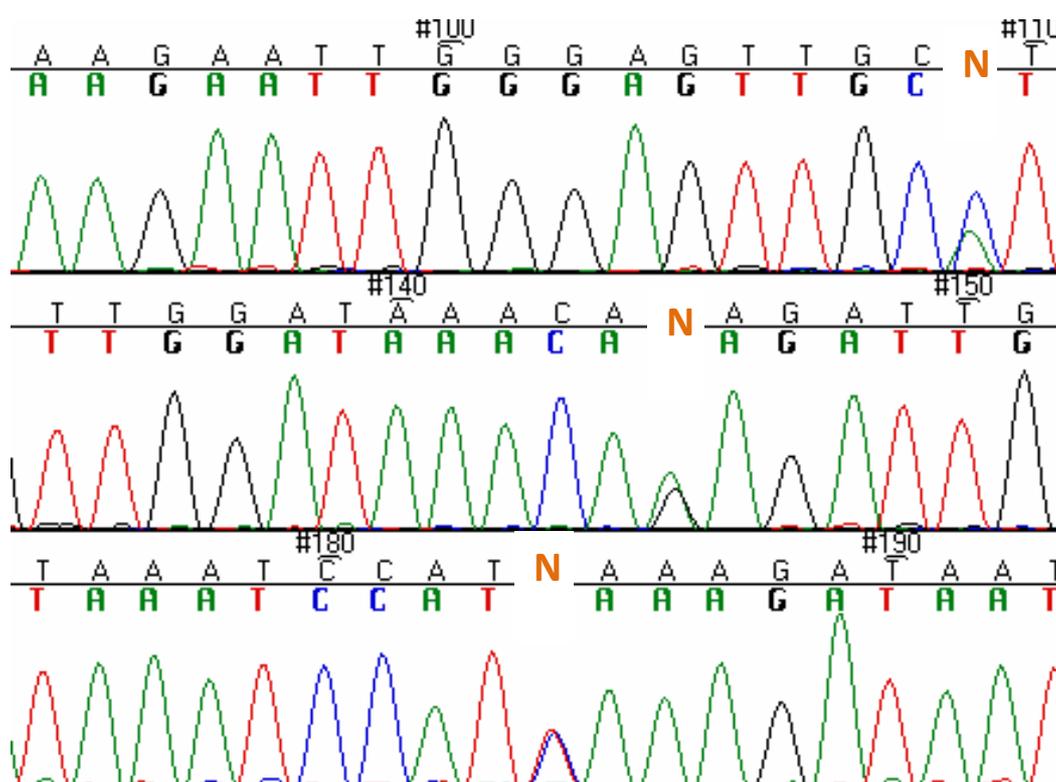


Figura 4. A figura ilustra um cromatograma parcial de um dos isolados para o fragmento *SYA1*. Os sítios heterozigóticos estão representados pela presença de dois picos em uma determinada posição e detectados visualmente, pois os programas de computadores não são capazes de detectar a presença de mais de um nucleotídeo para cada posição. Na figura existem três sítios heterozigóticos sendo eles vistos em cada uma das linhas e representados pela letra N (em cor laranja). Nas linhas próximas às posições 110, 150 e 190 nota-se a presença destes picos A/C, A/G e C/T, respectivamente. Utilizando o sistema de código internacional IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) substituímos por letras que indiquem que existe polimorfismo naquele sítio. A seguir estão os códigos do IUPAC: A+C=M / C+G=S / A+G=R / C+T=Y / A+T=W / G+T=K.

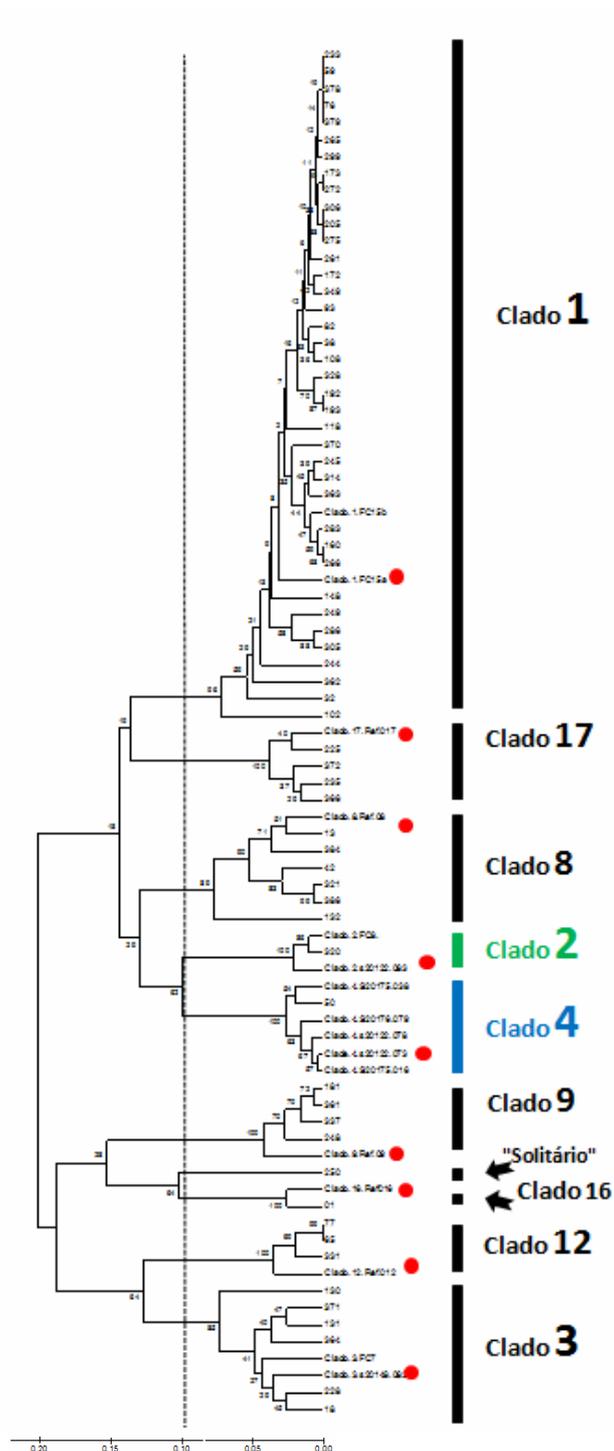


Figura 5. Dendrograma UPGMA mostrando a distância genética entre as cepas de *C. albicans* de pacientes com candidemia tipadas por MLST. A linha tracejada mostra o ponto de corte igual a 0,1 que foi utilizado para estabelecer a distância genética que auxilia no delineamento dos clados. Os círculos vermelhos representam as cepas controle de cada clado. Este dendrograma pode ser visualizado com maiores detalhes no **Anexo 2**.

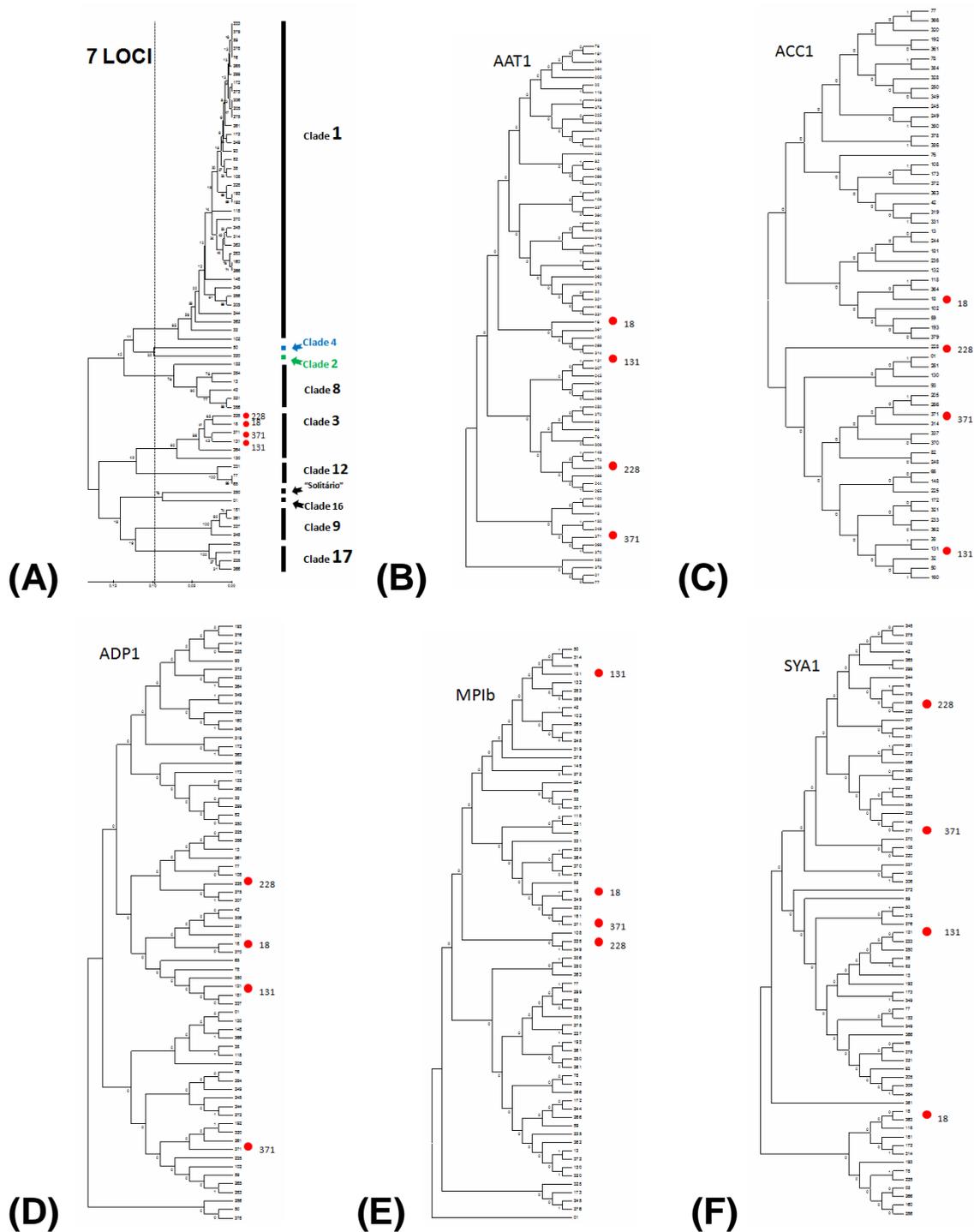


Figura 6. Representação dos diferentes dendrogramas UPGMA mostrando as distâncias genéticas entre as cepas nos diferentes fragmentos de genes estudados. Em (A) estão todos os sete fragmentos, (B) o fragmento *AAT1*, (C) o *ACC1*, (D) o *ADP1*, (E) o *MPIb*, (F) o *SYA1*, (G) o *VPS13* e (H) o fragmento *ZWF1*. No dendrograma (A) estão marcadas com um círculo vermelho 4 das 7 cepas classificadas no clado 3. Nos dendrogramas posteriores é possível identificar a disposição destas cepas em diferentes agrupamentos. Podemos observar que não existe nenhuma correlação entre os dendrogramas de cada fragmento individualmente.

(Continuação Figura 6.)

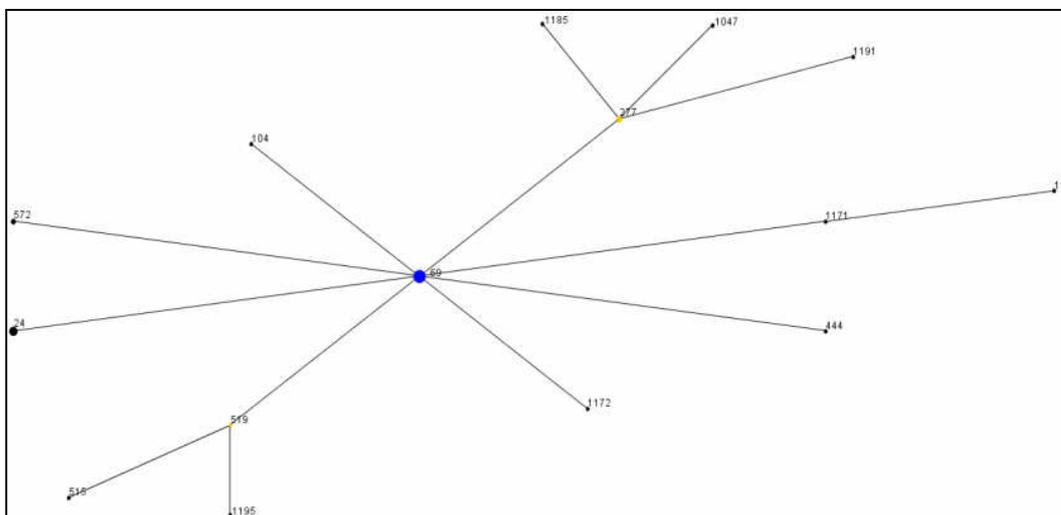
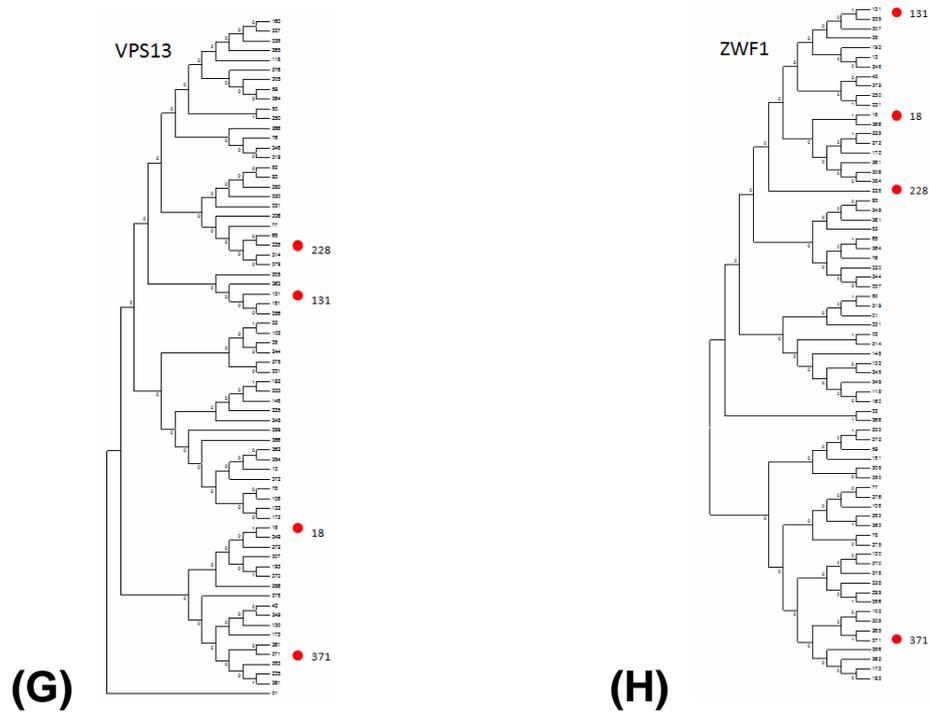


Figura 7. A ilustração mostra a figura gerada pelo programa eBURST 3.0 apresentando o complexo clonal 1 que agrupou 15 DSTs entre todos os outros analisados neste estudo.

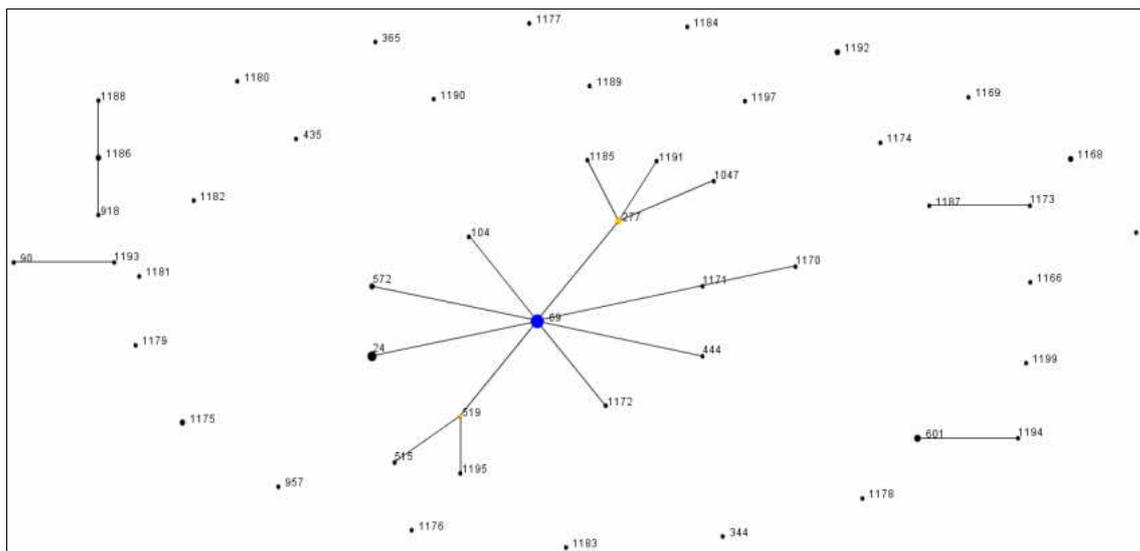


Figura 8. A ilustração mostra a figura gerada pelo programa eBURST 3.0 mostrando a presença do complexo clonal 1 ao centro e a disposição espacial de todos os outros DSTs, que foram representados quando estabelecemos que todos eles deveriam ter ao menos 1 dos 7 genótipos iguais. Os DSTs que apresentam-se conectados entre si são aqueles que possuem 6 genótipos iguais entre eles.

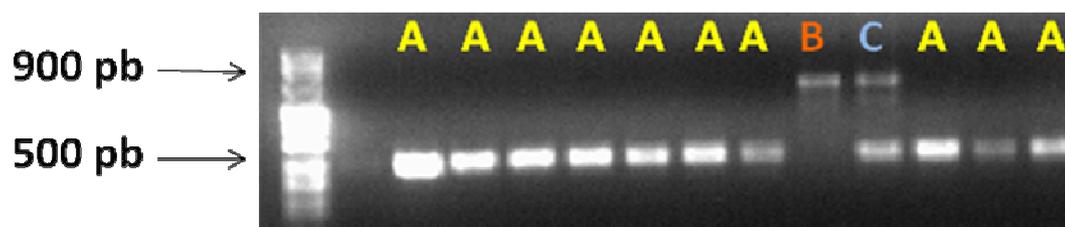


Figura 9. Gel de eletroforese do produto de PCR utilizado para tipagem molecular por Tipagem ABC para identificação de bandas de tamanho ~450 pb para genótipos A e 840 pb para genótipos B. Genótipo C é definido com a presença de ambas as bandas.

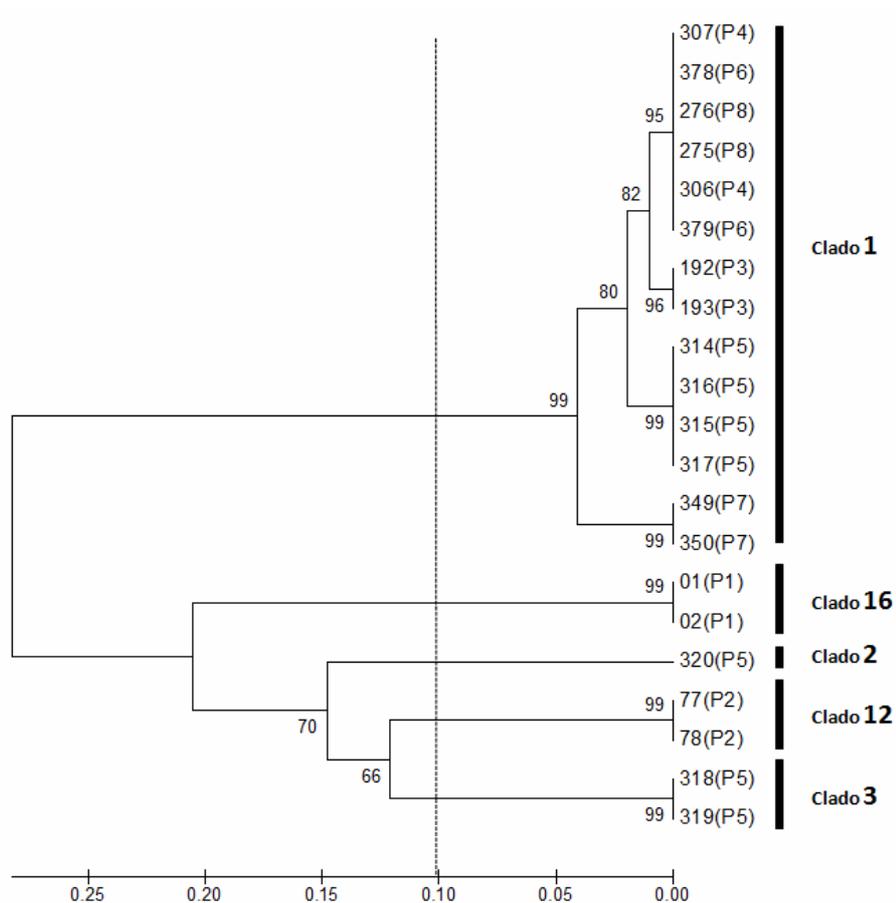


Figura 10. Apresentação do dendrograma UPGMA construído a partir da metodologia do MLST, mostrando a distância genética entre 21 cepas de *C. albicans* de 6 casos de pacientes com episódios de candidemia persistente e 2 casos de pacientes com candidemia recorrente. A linha tracejada mostra o ponto de corte para cálculo da distância igual a 0,1 que foi utilizada para auxiliar no delineamento dos clados. O paciente P5 apresentou três isolados distintos distribuídos no clado 1, clado 2 e clado 3.

5.0 DISCUSSÃO

A tipagem molecular baseada em Multilocus Sequence Typing (MLST) é uma ferramenta muito útil no entendimento de epidemiologia, filogenia e distinção intra-específica de isolados de bactérias e fungos provenientes de infecções invasivas. O MLST foi desenvolvido por Maiden et al. (1998) primeiramente para a espécie de bactéria *Neisseria meningitidis*, e posteriormente aplicado para outras espécies de bactérias e adaptado para *C. albicans* por Bougnoux et al. (2002), sendo esta a primeira aplicação deste método para um microrganismo diplóide. Hoje, esta metodologia também é utilizada para *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans* variedade *grubii* com a vantagem de ter disponível uma base de dados para comparação e compartilhamento dos resultados.

A metodologia do MLST apresenta elevado grau de resolução podendo caracterizar grande número de isolados rapidamente. Não há nenhuma subjetividade na análise do sequenciamento como ocorre comumente na interpretação das técnicas baseadas em padrões de bandas de fragmentos de DNA. Além disso, todos os resultados do sequenciamento podem ser armazenados em uma base de dados global disponível na internet oferecendo fácil acesso a grupos de pesquisa de todo mundo (Chowdhary et al. 2006; Odds et al. 2007a; Odds, Jacobsen, 2008). Talvez a única ressalva que devemos salientar é que a leitura visual dos cromatogramas para detecção das heterozigoses pode ser cansativa e passível de erros quando se analisa um grande número de amostras.

No presente estudo, as cepas de *C. albicans* foram caracterizadas genotipicamente pelas metodologias do MLST e Tipagem ABC, sendo os isolados clínicos proveniente de pacientes com candidemia de 11 hospitais públicos de 9 cidades brasileiras. Este é o primeiro estudo brasileiro de nosso conhecimento a aplicar estas técnicas para tipagem molecular em amostras clínicas de leveduras provenientes de infecção de corrente sanguínea coletadas em diferentes centros médicos. O grupo escocês liderado por Odds et al. (2007a) publicou um artigo onde foram analisadas cepas da América do Sul, incluindo cepas isoladas no Brasil. A origem geográfica e material clínico de isolamento das leveduras não foram bem caracterizados, dificultando uma análise mais apurada relacionada a frequência de genótipos de *C. albicans* no continente sul americano.

Até o mês de agosto de 2009, o site oficial do MLST <http://calbicans.mlst.net/> incluía na base de dados o total de 1.791 isolados do mundo inteiro, com 1422 DSTs

distintos para *C. albicans*. Para o Brasil, estão depositados somente os dados de 39 isolados de *C. albicans* com 25 DSTs distintos. Os dados desta estatística ainda não incluem os achados apresentados neste presente estudo. Em nossa coleção foram tipados por MLST o total de 74 isolados de 61 pacientes com candidemia. Nossas informações contribuirão para elevar a mais de 100 o número de isolados de *C. albicans* presentes na base de dados do MLST incluindo os 32 novos DSTs. Os novos DSTs mencionados foram observados em mais de 50% do total de pacientes incluídos nesta casuística, embora ainda não se saiba qual é o real valor destes achados no cenário nacional ou dentro do contexto mundial.

Cada DST é determinado pela combinação de 7 diferentes genótipos correspondentes a 7 fragmentos de “housekeeping genes” estudados. Embora tenha sido encontrado um grande número de novos DSTs neste estudo, a taxa de novos genótipos foi muito menor, apenas 10 novos genótipos. De acordo com Odds, Jacobsen, (2008) a taxa de novos genótipos vem diminuindo para *C. albicans* em descompasso com o maior número de isolados sequenciados, como é evidenciado na base de dados do MLST. Parece claro que existe uma tendência na conservação destes genótipos dentro da população havendo mudanças somente nas combinações entre estes possíveis genótipos. Por outro lado, diferentes combinações de genótipos podem gerar novos DSTs, mesmo na ausência de novos polimorfismos, fato que explica a discrepância entre a inclusão de inúmeros DSTs inéditos apesar dos genótipos conservados.

Na **Tabela 14** é possível verificar em 7 estudos, incluindo a presente casuística, o número de variações de genótipos que no geral foi de 5 a 24 independente do fragmento analisado. Estes valores alteram de acordo com o número de isolados e pares de bases dos fragmentos de genes sequenciados. Nesta tabela, os polimorfismos encontrados entre os isolados mostram que aproximadamente 97% do genoma de fragmentos de “housekeeping genes” para *C. albicans* é altamente similar, sendo o número de sítios polimórficos encontrados variando de 61 a 109 (2,1 a 3,8%) entre 2354 e 3131 bases sequenciadas.

A determinação das diferenças entre genótipos e DSTs dos isolados por MLST é importante, mas isto não evidencia quais são as verdadeiras distâncias genéticas que agrupam ou separam os isolados de uma população de *C. albicans*. Por isso, faz-se necessário a aplicação de uma análise estatística para definição de grupamentos

que pontuam qual o grau de similaridade e diferenças entre os grupos estudados. Estes agrupamentos são visualizados em análises de MLST com a construção de dendrogramas que medem a distância genética entre eles. Uma questão para ser investigada é qual o significado biológico das diferenças encontradas nas sequências dos fragmentos de genes dos isolados clínicos (Odds, Jacobsen, 2008).

Estes agrupamentos podem ser distribuídos em clados. Como dito na introdução desta dissertação, o termo clado é utilizado erroneamente na tipagem molecular em espécies de *Candida* para definir grupos e não para ancestralidade como seria o mais correto de se utilizar (Soll, Pujol, 2003).

Utilizamos em nossa análise o programa eBURST, que definiu o complexo 1 como o principal agrupamento do nosso estudo reunindo somente alguns DSTs de isolados clado 1. Este programa parece ser melhor empregado quando aplicado para um grande número de isolados e não em pequenas populações amostrais como a do presente estudo (Odds et al. 2006). O eBURST é útil como ferramenta para agrupar os isolados, mas pouco eficiente na análise filogenética para espécies de *Candida* (Odds et al. 2007a).

Cepas de *C. albicans* clado 1 são as cepas mais comumente encontradas em todo o mundo (Soll, Pujol, 2003; Odds et al. 2007a; Odds et al. 2007b; MacCallum et al. 2009). Alguns estudos sugerem que isolados clado 1 podem ser melhor adaptados do que outras cepas de outros clados para colonizar ou infectar hospedeiros humanos (Odds et al. 2007a; Odds, Jacobsen 2008).

No presente estudo, a maioria dos isolados foram pertencentes ao clado 1 (56%). Foi encontrado um único isolado (1,5%) representante do clado 2 e clado 4. Seis isolados foram pertencentes ao clado 3 (10%). Resultados parecidos obtiveram Soll, Pujol, (2003) e Odds et al. (2007a) quando reuniram cepas de *C. albicans* de diferentes sítios biológicos provenientes do continente sul americano nas respectivas proporções: clado 1 com 54% / 39,5%; clado 2 com 0% / 0%; clado 3 com 23% / 3,7%; e clado 4 com ~5% para cada estudo.

Takakura et al. (2008) aplicaram o MLST para 217 cepas de *C. albicans* recuperadas de sangue e secreção vaginal de amostras do Japão, Inglaterra/País de Gales e EUA. Os autores encontraram a prevalência dos principais clados entre os

países, variando de 35% a 49% dos isolados como pertencentes ao clado 1; 5% a 29% como clado 2; 4% a 26,5% como clado 3; e 7,5% a 10% como clado 4.

Um único estudo de vigilância de candidemia realizado na Escócia por Odds et al. (2007b) aplicou a metodologia do MLST para 128 isolados de pacientes com infecção de corrente sanguínea por *C. albicans* encontrando 27% dos isolados classificados como clado 1; 23% como clado 2; 9,5% como clado 3; e 12% como clado 4.

Está evidente que clado 1, clado 2, clado 3 e clado 4 representam a maioria das cepas de *C. albicans* de importância clínica em todo o mundo (Soll, Pujol, 2003; Odds et al. 2007a; Odds et al. 2007b; Takakura et al. 2008). Entretanto, vale ressaltar que as cepas clado 2 parecem ser muito raras na América do Sul, não tendo sido achado nenhum isolado clado 2 em nenhum dos dois estudos que incluíram cepas da América do Sul (Soll, Pujol, 2003; Odds et al. 2007a). Em nosso estudo, foi encontrado um único isolado clado 2. Não há nenhuma hipótese que indique qual é o fator envolvido para a escassez de cepas de *C. albicans* clado 2 no continente sul americano, a não ser especular sobre a barreira geográfica natural.

Um único isolado clado 4 foi encontrado em nossa coleção de cepas. Blignaut et al. (2002) denominaram grupo SA para discriminar cepas comuns da África do Sul. Soll, Pujol, (2003) descreveram que 50% das cepas de *C. albicans* isoladas na África foram pertencentes ao grupo SA. Recentemente, Odds et al. (2007a) determinaram que as cepas grupo SA se enquadram no clado 4. Além da classificação como clado 4, estes autores ainda observaram que este clado é mais comum na Inglaterra e Escócia (~30%) do que no continente africano (~25%).

Pujol et al. (2002) sugeriram a denominação de grupo E para os isolados, aparentemente comuns somente no continente europeu. Odds et al. (2007a) observaram que as cepas classificadas como grupo E poderiam ser enquadradas no clado 4 e clado 11.

Exceto pelo grande número de isolados clado 1, os únicos isolados que representaram 10% da nossa coleção foi o clado 3 e clado 8. Isolados clado 8 representaram 16% na América do Sul dentre as cepas de *C. albicans* tipadas por Odds et al. (2007a). Além dos cladros citados, nossos isolados se enquadraram dentro

de mais 6 clados (clado 2, clado 4, clado 9, clado 12, clado 16 e clado 17) além do isolado categorizado como “solitário”.

Odds et al. (2007a) constataram que 3% das cepas de *C. albicans* da coleção deles não se enquadravam dentro dos 17 clados estabelecidos denominando-os “solitários”. No presente estudo, um único isolado foi classificado como “solitário”.

Em nosso estudo procuramos observar a distribuição das cepas de *C. albicans* nos diferentes centros médicos. Na maioria dos centros médicos estudados, a diversidade genotípica notada entre os isolados foi grande, não havendo prevalência de nenhum dos DSTs encontrados. Observamos que no Hospital de Base do Distrito Federal em Brasília, as cinco cepas estudadas foram categorizadas em 2 DSTs: 3 isolados DST 69 e 2 isolados DST 24. Todas as cepas deste hospital foram categorizadas em um único clado, tendo seus 5 isolados inseridos como clado 1. Interessante notar que os dois únicos DSTs encontrados nos pacientes deste hospital apresentam apenas 5 nucleotídios de diferença em um único fragmento do gene *VPS13*, revelando que as cepas de *C. albicans* dos isolados estudados naquele centro são relativamente próximas, ainda que estas tenham sido coletadas com diferença de 8 meses entre os pacientes. Na tentativa de esclarecer esta pequena diversidade de genótipos encontrada no Hospital de Base de Brasília, hipotetizamos 2 situações (i) trata-se de 2 cepas endêmicas naquele hospital proveniente de mesma de fonte, causando candidemia ou (ii) pode tratar-se de uma situação de evolução convergente em que cepas não-relacionadas estão sujeitas a pressões de seleção similares, a qual pode resultar em genótipos semelhantes. Entretanto, não podemos confirmar nenhuma destas hipóteses porque o número de isolados estudados é limitado e estes DSTs são muito comuns em todas as partes do planeta, sendo descritos em vários estudos (Tavanti et al. 2005; Odds et al. 2007a; Takakura et al. 2008; Wrobel et al. 2008).

Sabendo-se que a grande maioria das cepas de *C. albicans* com distribuição mundial se enquadram em 4 clados principais, a pergunta que se faz atualmente é quais são os fatores envolvidos na persistência destes principais clados na população de *C. albicans* relacionada a infecção em seres humanos? Não há como responder a esta questão nos dias de hoje, mas será muito importante compreender as particularidades dos isolados pertencentes a estes clados na epidemiologia das infecções fúngicas por *C. albicans*.

Seguindo esta tendência, recentemente MacCallum et al. (2009) selecionaram 43 isolados de *C. albicans* escolhidos como sendo representantes dos 4 maiores clados para verificar entre estes as diferenças na virulência utilizando modelos animais. Infelizmente, os autores não encontraram nenhuma associação entre cepas dos 4 clados com maior ou menor virulência em cobaias. Também não foi observada nenhuma diferença significativa nas taxas de mortalidade dos isolados classificados nos respectivos clados.

Outra tentativa em estabelecer padrões de comportamento entre os isolados de cada clado foi através da realização de estudos comparando as populações de *C. albicans* recuperadas de seres humanos e animais. Wrobel et al. (2008) e Jacobsen et al. (2008b) mostraram que as cepas que infectam animais parecem se comportar diferente daquelas encontradas em seres humanos. Em ambos estudos, os isolados provenientes de animais foram distribuídos em sua grande maioria nos clados que não correspondiam os clados de 1 a 4, sugerindo que as cepas de *C. albicans* que infectam animais e seres humanos são diferentes.

A Tipagem ABC classifica as cepas de *C. albicans* em somente três genótipos distintos, o que torna esta metodologia limitada para distinção entre os isolados clínicos de um surto ou da prevalência de algum clone dentro de um centro médico, por exemplo. Não existem estudos sobre a frequência destes genótipos em infecções de corrente sanguínea por *C. albicans*, mas de forma geral, a grande maioria dos isolados são do tipo A, seguido por tipo B e menos comum o tipo C.

Segundo alguns estudos, a variação nas taxas de distribuição dos genótipos para o tipo A é de 43% a 62%, tipo B de 20% a 45% e tipo C de 9% a 13%. (McCullough et al. 1999; Tavanti et al. 2005; Chen et al. 2006). No presente estudo foram achados os genótipos da tipagem ABC em sua maioria tipo A (82%) seguido por tipo B (16,5%) e apenas um isolado tipo C (1,5%). Não foi encontrando nenhum isolado com genótipo tipo D o que corresponderia a espécie *C. dubliniensis*. Não há nenhum estudo brasileiro reportando episódio de candidemia por *C. dubliniensis*.

A mortalidade geral ou atribuída a candidemia no Brasil apresenta índices muito elevados de acordo com alguns estudos nacionais (Colombo et al. 1999, Costa et al. 2000, Aquino et al. 2005, Colombo et al. 2006, Colombo et al. 2007, Girão et al. 2008, França et al. 2008). Não foi possível relacionar a taxa de mortalidade com genótipos provenientes da tipagem molecular porque o número de isolados para

determinados genótipos foi baixo. De qualquer forma, vale a pena salientar que 58% dos pacientes infectados com isolados clado 1 evoluíram para óbito. Em contrapartida, foi observado que cinco dos seis pacientes infectados com isolados clado 3 e os seis pacientes infectados por isolados clado 8 foram a óbito. Mais estudos são necessários para avaliar se isolados clado 3 e clado 8 são mais virulentos que isolados clado 1.

Parece haver estreita relação entre CIMs a antifúngico e determinados genótipos identificados por tipagem molecular por MLST e Tipagem ABC. Por exemplo, foi observado por Blignaut et al. (2005) que a maioria dos isolados resistentes a anfotericina B são do grupo SA (clado 4). Isolados clado 1 são achados frequentemente como menos susceptíveis a 5-fluorocitosina (Pujol et al. 2004). Os isolados clado 1 apresentam um mecanismo de resistência comum a este antifúngico, baseado na troca de aminoácidos (R101C) no produto do gene *FUR1*, uma enzima ribosiltransferase. Esta mutação não é encontrada em isolados resistentes a 5-fluorocitosina de outros clados (Dodgson et al. 2004; Hope et al. 2004, Odds, Jacobsen, 2008; MacCallum et al. 2009). Todos os sete isolados encontrados em nosso estudo provenientes de diferentes cidades brasileiras que apresentaram CIMs $\geq 4\text{ug/mL}$ a 5-fluorocitosina eram pertencentes ao clado 1 tipo A.

Não foi o objetivo deste estudo verificar o papel da resistência aos antifúngicos e a tipagem molecular dentro do contexto epidemiológico das infecções de corrente sanguínea, até porque a taxa de resistência a azólicos é muito baixa no Brasil, como já foi apresentado na introdução desta dissertação. Já citamos a correlação de isolados clado 1 tipo A à diminuída susceptibilidade a 5-fluorocitosina. O único isolado resistente a azólicos neste estudo foi por uma cepa classificada como clado 1 tipo A. O paciente infectado por esta cepa foi a óbito.

Alguns isolados em nosso estudo foram provenientes de pacientes com candidemia persistente ou candidemia recorrente. Candidemia persistente foi observado em 6 pacientes e os isolados de 5 deles exibiram o mesmo genótipo na primeira e última coleta durante o episódio da candidemia. Em outro estudo realizado por Shin et al. (2005) foi observado em 11 pacientes com candidemia que as cepas de *C. albicans* coletadas sequencialmente apresentavam o mesmo padrão quando utilizada a técnica do PFGE.

Shin et al. (2007) examinaram as mudanças no genótipos de 41 isolados sequenciais de *C. glabrata* de 15 pacientes no período superior a 36 dias utilizando as

metodologia de PFGE e MLST. Os isolados sequenciais de cada paciente apresentaram pequenas diferenças no cariótipo em 40% dos pacientes por PFGE, porém exatamente o mesmo genótipo por MLST. O MLST detecta pequenas mudanças de nucleotídios mas uma limitação deste método é que ele analisa somente alguns fragmentos do DNA e não o genoma completo. A expectativa é que dentro de alguns anos será possível analisar o genoma inteiro de microrganismos de interesse médico (Odds, Jacobsen, 2008).

As pequenas mudanças entre os nucleotídios são vistas com o MLST e denominadas microvariações que estão relacionadas ao ganho ou perda de heterozigiosidade (LOH) em um ou mais genes estudados por esta metodologia (Forche et al. 2005; Odds et al. 2006; Jacobsen et al. 2008c). Não foi observado nenhuma microvariação entre os isolados sequenciais de pacientes incluídos neste estudo.

É importante notar que foi documentado um episódio de candidemia persistente em um paciente que apresentou 3 cepas de *C. albicans* distintas (entre sete cepas) coletadas de amostras de sangue no período de 10 dias. Para este paciente (I) podemos dizer que este achado não foi decorrente de microvariação entre as cepas porque existem grandes diferenças em todos os genes estudados para o MLST e para a Tipagem ABC claramente observadas na construção do dendrograma enquadrando as cepas em 3 diferentes clados; (II) não há evidências de troca de amostras porque mais de uma amostra idêntica foi obtida para cada cepa, exceto pela última amostra; (III) embora não seja definitivo, é possível que o paciente tenha sido realmente infectado por 3 cepas distintas de *C. albicans* durante a internação.

Após detectar a diversidade destas cepas, nós tentamos hipotetizar quais as variáveis relacionadas à infecção por múltiplos isolados. Este paciente foi exposto a procedimentos invasivos quando submetido a algumas cirurgias abdominais no trato gastrointestinal em um curto espaço de tempo e talvez o fenômeno da translocação microbiana possa ter ocorrido.

Outra questão interessante envolvendo este paciente é que o único isolado clado 2 deste estudo foi recuperado de sua sétima e última coleta. Este é o primeiro estudo brasileiro descrevendo a infecção de corrente sanguínea por uma cepa de *C. albicans* clado 2.

Candidemia recorrente foi definida como um episódio ocorrendo ao menos um mês após a última negativação da hemocultura. Dois pacientes com candidemia recorrente mostraram sólida evidência de que a mesma cepa foi envolvida nos diferentes episódios de cada um deles. Estes achados também foram vistos em outros estudos, onde isolados idênticos de várias espécies de *Candida* foram responsáveis por diferentes episódios de candidemia, o que foi confirmado com alguma ferramenta molecular (Clancy et al. 2000; Neofytos et al. 2006). Neofytos et al. (2006) reportou 3 episódios de candidemia recorrente causados por *C. parapsilosis* em um paciente com câncer. A tipagem molecular confirmou que todos os episódios ocorridos no período de 8 meses foi causado pela mesma cepa. Clancy et al. (2000) investigaram 5 pacientes com candidemia recorrente e as cepas foram caracterizadas por “restriction enzyme analysis of genomic DNA (REAG)” e “inter-repeat PCR (IR-PCR)”. Cada episódio de candidemia foi causado pela mesma cepa da espécie de *Candida* inicial, exatamente como no episódio inicial.

Em controvérsia com alguns achados, determinados estudos envolvendo candidemia recorrente descreveram diferentes cepas relacionadas a diferentes episódios de candidemia (Shin et al. 2001; Shin et al. 2007). Shin et al. (2001) aplicaram a cariotipagem eletroforética em isolados sequenciais de *C. parapsilosis* de pacientes com candidemia recorrente. Foi observado que os episódios de candidemia recorrente foram causados por cepas diferentes em 6 dos 17 pacientes envolvidos naquele estudo. Vale lembrar que o fenômeno da microvariação pode ter ocorrido dentro daquelas casuísticas.

Por fim, nossa experiência com a metodologia do MLST mostrou que esta ferramenta, quando aplicada em isolados provenientes de candidíase invasiva por *C. albicans*, apresenta elevado poder discriminatório exceto pela persistência dos DSTs de *C. albicans* mais comum em alguns centros médicos como aqueles isolados no Hospital de Base de Brasília. De acordo com os nossos achados, mais de 50% dos DSTs foram definidos como novos, sugerindo que pode haver particularidades genéticas entre as cepas de *C. albicans* isoladas de infecções de corrente sanguínea no Brasil e na América do Sul. Confirmamos que isolados clado 2, ao contrário de países de outros continentes, é raro no Brasil. A alta taxa de mortalidade vista no clado 3 e clado 8 é intrigante e precisa ser melhor investigado já que nenhum estudo conseguiu correlacionar os agrupamentos genéticos de *C. albicans* versus virulência e mortalidade associadas a infecção por este agente.

6.0 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

1. A tipagem molecular por MLST mostrou que os isolados deste estudo foram distribuídos em nove clados: 1, 2, 3, 4, 8, 9, 12, 16 e 17, além do isolado categorizado como “solitário”. Houve predomínio de isolados clado 1 que incluiu 56% das amostras. Diferente de outras regiões geográficas do planeta, cepas classificadas como clado 2 são raras no Brasil.
2. Observou-se alta frequência de novos DSTs em nossa casuística onde mais de 50% dos pacientes foram infectados por DSTs de *C. albicans* nunca reportados antes.
3. A Tipagem ABC confirmou que tipo A é o mais frequente em nosso meio correspondendo a 82% dos isolados.
4. Foi documentado caso raro de um paciente com candidemia persistente infectado por 3 cepas de *C. albicans* distintas, recuperadas em um curto período de internação (10 dias).
5. Foi possível observar que isolados clado 1 tipo A relacionaram-se a CIMs elevadas para 5-fluorocitosina.
6. Observou-se maiores taxas de mortalidade em pacientes infectados com cepas de *C. albicans* clado 3 (80%) e clado 8 (100%) quando comparada com isolados clado 1. A relação causal entre estes achados devem ser confirmados em outras investigações.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A; 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 Microbiol. 2005; 43: 1829-1835.

Alonso-Valle H, Acha O, García-Palomo JD, Fariñas-Alvarez C, Fernández-Mazarrasa C, Fariñas MC. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003; 22(4): 254-257.

Alves SH, Milan EP, Branchini ML, Nishimura K, Fukushima K, Oliveira LO, Costa JM, Colombo AL. First isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2001; 39:165-168.

Aquino VR, Lunardi LW, Goldani LZ, Barth AL. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. Braz J Infect Dis. 2005; 9: 411-418.

Ashford BK. The etiology of sprue. Am. J. Med. Sci. 1917; 154: 157-176.

Ásmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Haraldsson G, Guo H, Xu J, Gottfredsson M. Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. Clin Infect Dis. 2008; 47: 17-24.

Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, Edwards JR, Tolson J, Henderson T, Martone WJ. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. Am J Med. 1991; 91: 86S-89S.

Barberino MG, Silva N, Rebouças C, Barreiro K, Alcântara AP, Netto EM, Albuquerque L, Brites C. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. Braz J Infect Dis. 2006; 10: 36-40.

Binelli CA, Moretti ML, Assis RS, Sauaia N, Menezes PR, Ribeiro E, Geiger DC, Mikami Y, Miyaji M, Oliveira MS, Barone AA, Levin AS. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12: 538-543.

Blignaut E, Pujol C, Lockhart S, Joly S, Soll DR. Ca3 fingerprinting of *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive and healthy individuals reveals a new clade in South Africa. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 826-836.

Blignaut E, Molepo J, Pujol C, Soll DR, Pfaller MA. Clade-related amphotericin B resistance among South African *Candida albicans* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005; 53: 29-31.

Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1290-1297.

Bougnoux ME, Tavanti A, Bouchier C, Gow NA, Magnier A, Davidson AD, Maiden MC, D'Enfert C, Odds FC. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 5265-5266.

Bougnoux ME, Diogo D, François N, Sendid B, Veirmeire S, Colombel JF, Bouchier C, Van Kruiningen H, 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: 1810-1820.

Branchini ML, Geiger DC, Fischman O, Pignatari AC. Molecular typing of *Candida albicans* strains isolated from nosocomial candidemia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1995; 37:483-487.

Brandt ME, Harrison LH, Pass M, Sofair AN, Huie S, Li RK, Morrison CJ, Warnock DW, Hajjeh RA. *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6: 46-49.

Calderone, R. A. 2002. *Candida* and candidiasis. ASM Press, Washington, D.C.

Chang MR, Correia FP, Costa LC, Xavier PC, Palhares DB, Taira DL, Paniago AM, Pontes ER, Machado VE. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008; 50: 265-268.

Chong PP, Chieng DC, Low LY, Hafeez A, Shamsudin MN, Seow HF, Ng KP. Recurrent candidaemia in a neonate with Hirschsprung's disease: fluconazole resistance and genetic relatedness of eight *Candida tropicalis* isolates. J Med Microbiol. 2006; 55:423-428.

Chowdhary A, Lee-Yang W, Lasker BA, Brandt ME, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Comparison of multilocus sequence typing and Ca3 fingerprinting for molecular subtyping epidemiologically-related clinical isolates of *Candida albicans*. Med Mycol. 2006; 44:405-417.

Clamp M, Cuff J, Searle SM, Barton GJ. The Jalview Java alignment editor. Bioinformatics. 2004;220: 426-427.

Clancy CJ, Barchiesi F, Falconi DiFrancesco L, Morris AJ, Snyderman DR, Yu VL, Scalise G, Nguyen MH. Clinical manifestations and molecular epidemiology of late recurrent candidemia, and implications for management. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000; 19: 585-592.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002 Villanova, Pa

Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A, Wey SB. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999; 34: 281-286.

Colombo AL, Guimarães T. [Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp]. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36: 599-607.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, 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: 2816-2823.

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: 570-576.

Costa SF, Marinho I, Araújo EA, Manrique AE, Medeiros EA, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *J Hosp Infect.* 2000; 45: 69-72.

Costa-de-Oliveira S, Pina-Vaz C, Mendonça D, Gonçalves Rodrigues A. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008; 27: 365–374.

Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA Pfaller MA. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:1298-1302.

Dóczi I, Dósa E, Hajdú E, Nagy E. Aetiology and antifungal susceptibility of yeast bloodstream infections in a Hungarian university hospital between 1996 and 2000. *J Med Microbiol.* 2002; 51: 677-681.

Dodgson AR, Dodgson KJ, Pujol C, Pfaller MA, Soll DR. Clade-specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the *FUR1* gene of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2223-2227.

Edelmann A, Krüger M, Schmid J. Genetic relationship between human and animal isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 6164-6166.

Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.* 2004; 186: 1518-1530.

Flórez C, Martín-Mazuelos E, Ruiz M, Miguel Cisneros J, Herrero M, Victoria García MA, Márquez M, Porrás J, Martín P, Gamero C, José Castón J; Grupo de Estudio de las Candidemias en Andalucía (Andalusian Study Group for Candidemia). In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* spp.: results from a multicenter active surveillance program in Andalusia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009. (em processo de publicação)

Forche A, Schönian G, Gräser Y, Vilgalys R, Mitchell TG. Genetic structure of typical and

atypical populations of *Candida albicans* from Africa. Fungal Genet Biol. 1999;28: 107-125.

França JC, Ribeiro CE, Queiroz-Telles F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41: 23-28.

Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. J Clin Microbiol. 2005; 43: 5122-5128.

Girão E, Levin AS, Basso M, Gobara S, Gomes LB, Medeiros EA, Costa SF. Seven-year trend analysis of nosocomial candidemia and antifungal (fluconazole and caspofungin) use in Intensive Care Units at a Brazilian University Hospital. Med Mycol. 2008; 46: 581-588.

Gupta AK, Cooper EA. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. Mycopathologia. 2008; 166: 353-367.

Hinrichsen SL, Falcão E, Vilella TA, Colombo AL, Nucci M, Moura L, Rêgo L, Lira C, Almeida L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41: 394-398.

Hope WW, Taberner L, Denning DW, Anderson MJ. Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 4377-4386.

Hsueh PR, Chen ML, Sun CC, Chen WH, Pan HJ, Yang LS, Chang SC, Ho SW, Lee CY, Hsieh WC, Luh KT. Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan, 1981-1999. Emerg Infect Dis. 2002; 8: 63-68.

Jabra-Rizk MA, Johnson JK, Forrest G, Mankes K, Meiller TF, Venezia RA. Prevalence of *Candida dubliniensis* fungemia at a large teaching hospital. Clin Infect Dis. 2005; 41:1064-1067.

Jacobsen MD, Boekhout T, Odds FC. Multilocus sequence typing confirms synonymy but highlights differences between *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*. FEMS Yeast Res.

2008a; 8: 764-770.

Jacobsen MD, Bougnoux ME, d'Enfert C, Odds FC. Multilocus sequence typing of *Candida albicans* isolates from animals. *Res Microbiol.* 2008b; 159: 436-440.

Jacobsen MD, Duncan AD, Bain J, Johnson EM, Naglik JR, Shaw DJ, Gow NA, Odds FC. Mixed *Candida albicans* strain populations in colonized and infected mucosal tissues. *FEMS Yeast Res.* 2008c; 8: 1334-1338.

Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin Infect Dis.* 1995; 20: 1526-30.

Joly S, Pujol C, Rysz M, Vargas K, Soll DR. Development and characterization of complex DNA fingerprinting probes for the infectious yeast *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1035-1044.

Jones CP, Martin DS. Identification of yeastlike organisms isolated from the vaginal tracts of pregnant and non-pragnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1938; 35: 98-106.

Jones CP, Peck RL. A green pigment from *Candida stellatoidea* and *Candida albicans*. *J. Bact.* 1940; 39: 605-608.

Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW, Scherer S. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 7329-7334.

Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol.* 2009; 56: 211-224

Kaufmann CS, Merz WG. Electrophoretic karyotypes of *Torulopsis glabrata*. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 2165-2168.

Klemp-Selb B, Rimek D, Kappe R. Karyotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* from patients with *Candida* sepsis. *Mycoses*. 2000; 43:159-163.

Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Merz WG. Association of electrophoretic karyotype of *Candida stellatoidea* with virulence for mice. *Infect Immun*. 1988; 56: 1814-1819.

Kwon-Chung KJ, Hicks JB, Lipke PN. Evidence that *Candida stellatoidea* type II is a mutant of *Candida albicans* that does not express sucrose-inhibitable alpha-glucosidase. *Infect Immun*. 1990; 58: 2804-2808.

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*. 2008; 9: 299-306.

Lagrou K, Verhaegen J, Peetermans WE, De Rijdt T, Maertens J, Van Wijngaerden E. Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007; 26: 541-547.

Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross T, Elsayed S. Invasive *Candida* species infections: a 5 year population-based assessment. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56: 532-537.

Lockhart SR, Fritch JJ, Meier AS, Schröppel K, Srikantha T, Galask R, Soll DR. Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 1501-1509.

Lockhart SR, Reed BD, Pierson CL, Soll DR. Most frequent scenario for recurrent *Candida* vaginitis is strain maintenance with "substrain shuffling": demonstration by sequential DNA fingerprinting with probes Ca3, C1, and CARE2. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 767-777.

Lott TJ, Holloway BP, Logan DA, Fundyga R, Arnold J. Towards understanding the evolution of the human commensal yeast *Candida albicans*. *Microbiology*. 1999; 145): 1137-1143.

Lott TJ, Fundyga RE, Kuykendall RJ, Arnold J. The human commensal yeast, *Candida*

albicans, has an ancient origin. Fungal Genet Biol. 2005; 42: 444-451.

MacCallum DM, Castillo L, Nather K, Munro CA, Brown AJ, Gow NA, Odds FC. Property differences among the four major *Candida albicans* strain clades. Eukaryot Cell. 2009; 8: 373-387.

Macphail GL, Taylor GD, Buchanan-Chell M, Ross C, Wilson S, Kureishi A. Epidemiology, treatment and outcome of candidemia: a five-year review at three Canadian hospitals. Mycoses. 2002; 45: 141-145.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95: 3140-3145.

Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, Calandra T, Glauser MP, Täuber MG, Pittet D; Fungal Infection Network of Switzerland. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. Clin Infect Dis. 2004; 38:311-320.

Mariano Pde L, Milan EP, da Matta DA, Colombo AL. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98: 533-538.

Markogiannakis H, Pachylaki N, Samara E, Kalderi M, Minettou M, Toutouza M, Toutouzas KG, Theodorou D, Katsaragakis S. Infections in a surgical intensive care unit of a university hospital in Greece. Int J Infect Dis. 2009; 13: 145-153.

Marriott D, Laxton M, Harkness J. *Candida dubliniensis* candidemia in Australia. Emerg Infect Dis. 2001; 7: 479.

Martin DS, Jones CP, Yao KF, Lee LE. A practical classification of the Monilias. J. Bact. 1937; 34: 99-128.

Martin, D. S. and Jones, C. P.: Further studies on the practical classification of the Monilias. J.

Bact., 39: 609–630, 1940

McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 417-421.

McManus BA, Coleman DC, Moran G, Pinjon E, Diogo D, Bougnoux ME, Borecká-Melkusova S, Bujdákova H, Murphy P, d'Enfert C, Sullivan DJ. Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 652-664.

Medrano DJ, Brilhante RS, Cordeiro Rde A, Rocha MF, Rabenhorst SH, Sidrim JJ. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006; 48: 17-20.

Meis JF, Ruhnke M, De Pauw BE, Odds FC, Siegert W, Verweij PE. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5: 150-153.

Metwally L, Walker MJ, Coyle PV, Hay RJ, Hedderwick S, McCloskey BV, O'Neill HJ, Webb CH, McMullan R. Trends in candidemia and antifungal susceptibility in a university hospital in Northern Ireland 2001-2006. *J Infect.* 2007; 55: 174-178.

Milan EP, de Laet Sant' Ana P, de Azevedo Melo AS, Sullivan DJ, Coleman DC, Lewi D, Colombo AL. Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001; 41: 29-35.

Miranda LN, van der Heijden IM, Costa SF, Sousa AP, Sienna RA, Gobara S, Santos CR, Lobo RD, Pessoa VP Jr, Levin AS. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect.* 2009; 72: 9-16.

Mubareka S, Vinh DC, Sanche SE. *Candida dubliniensis* bloodstream infection: a fatal case in a lung transplant recipient. *Transpl Infect Dis.* 2005; 7: 146-149.

Neofytos D, Pfaller MA, Diekema DJ, Horn D. A case of recurrent episodes of *Candida parapsilosis* fungemia. *Mycopathologia*. 2006; 162: 295-298.

Noble SM, Johnson AD. Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen. *Annu Rev Genet*. 2007; 41: 193-211.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 67: 400-428

Odds FC, Abbott AB. A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. *Sabouraudia*. 1980; 18: 301-317.

Odds FC, Abbott AB, Stiller RL, Scholer HJ, Polak A, Stevens DA. Analysis of *Candida albicans* phenotypes from different geographical and anatomical sources. *J Clin Microbiol*. 1983; 18: 849-857.

Odds, F.C. Ecology of *Candida* and epidemiology of candidosis. (1988) In F.C. Odds (Ed.), *Candida and Candidosis* (pp. 68e92). London: Baillie`re Tindall.

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: 3647-3658.

Odds FC, Bougnoux ME, Shaw DJ, Bain JM, Davidson AD, Diogo D, Jacobsen MD, Lecomte M, Li SY, Tavanti A, Maiden MC, Gow NA, d'Enfert C. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2007a; 6: 1041-1052.

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*. 2007b; 56: 1066-1075.

Odds FC, Jacobsen MD. Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida* species. Eukaryot Cell. 2008; 7: 1075-1084.

Pagani L, Spoladore G, Mian P, Vedovelli C. Managing *Candida* endophthalmitis (Recurrent *Candida albicans* endophthalmitis in an immunocompromised host). Can J Ophthalmol. 2007; 42: 876-877.

Pfaller MA. Epidemiology of nosocomial candidiasis: the importance of molecular typing. Braz J Infect Dis. 2000; 4: 161-167.

Pittet D, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality, and contribution to total hospital deaths. Arch Intern Med. 1995; 155: 1177-1184.

Pujol C, Pfaller M, Soll DR. Ca3 fingerprinting of *Candida albicans* bloodstream isolates from the United States, Canada, South America, and Europe reveals a European clade. J Clin Microbiol. 2002; 40: 2729-2740.

Pujol C, Pfaller MA, Soll DR. Flucytosine resistance is restricted to a single genetic clade of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 262-266.

Quindós G, Sánchez-Vargas LO, Villar-Vidal M, Eraso E, Alkorta M, Hernández-Almaraz JL. Activities of fluconazole and voriconazole against bloodstream isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*: a 14-year study in a Spanish tertiary medical centre. Int J Antimicrob Agents. 2008; 31: 266-271.

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: 781-788.

Richet H, Roux P, Des Champs C, Esnault Y, Andremont A; French Candidemia Study Group. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. Clin Microbiol Infect. 2002; 8: 405-412.

Robles JC, Koreen L, Park S, Perlin DS. Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2004; 42: 2480-2488.

Ruhnke M, Eigler A, Tennagen I, Geiseler B, Engelmann E, Trautmann M. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. J Clin Microbiol. 1994; 32: 2092-2098.

Samaranayake YH, Samaranayake LP, Dassanayake RS, Yau JY, Tsang WK, Cheung BP, Yeung KW. 'Genotypic shuffling' of sequential clones of *Candida albicans* in HIV-infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. J Med Microbiol. 2003; 52: 349-359.

San Miguel LG, Cobo J, Otheo E, Sánchez-Sousa A, Abaira V, Moreno S. Secular trends of candidemia in a large tertiary-care hospital from 1988 to 2000: emergence of *Candida parapsilosis*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2005; 26: 548-552.

Sant'Ana Pde L, Milan EP, Martinez R, Queiroz-Telles F, Ferreira MS, Alcântara AP, Carvalho MT, Colombo AL. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97: 253-257.

Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. J Clin Microbiol. 1987; 25: 675-679

Shin JH, Shin DH, Song JW, Kee SJ, Suh SP, Ryang DW. Electrophoretic karyotypes analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. J Clin Microbiol. 2001; 39: 1258-1263.

Shin JH, Park MR, Song JW, Shin DH, Jung SI, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. J Clin Microbiol. 2004; 42: 4025-4031.

Shin JH, Og YG, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Molecular epidemiological analysis of bloodstream isolates of *Candida albicans* from a university hospital over a five-year period. J Microbiol. 2005; 43: 546-554.

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: 2385-2391.

Silva V, Cabrera M, Díaz MC, Abarca C, Hermosilla G. [Prevalence of *Candida albicans* serotypes in blood isolates in Chile, and first report of *Candida dubliniensis* candidemia]. Rev Iberoam Micol. 2003; 20: 46-51.

Sobel JD. Management of Infections Caused by *Candida glabrata*. Curr Infect Dis Rep. 2000; 2: 424-428.

Sobel JD. The Emergence of Non-*albicans* *Candida* Species as Causes of Invasive Candidiasis and Candidemia. Curr Infect Dis Rep. 2006; 8: 427-433.

Soll DR, Pujol C. *Candida albicans* clades. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 39: 1-7.

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology. 1995; 141: 1507-1521.

Takakura S, Ichiyama S, Bain JM, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw DJ, Gow NA, Odds FC. Comparison of *Candida albicans* strain types among isolates from three countries. Int J Med Microbiol. 2008; 298: 663-668.

Tavanti A, Gow NA, Senesi S, Maiden MC, Odds FC. Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2003; 41: 3765-3776.

Tavanti A, Davidson AD, Fordyce MJ, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2005; 43: 5601-5613.

Tekeli A, Koyuncu E, Dolapci I, Guven GS, Sahin GO, Uzun O. Detection of *Candida*

dublinsiensis in oropharyngeal samples of Turkish HIV-positive patients. *Mycoses*. 2005; 48: 197-201.

Tortorano AM, Biraghi E, Astolfi A, Ossi C, Tejada M, Farina C, Perin S, Bonaccorso C, Cavanna C, Raballo A, Grossi A; FIMUA Candidemia Study Group. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) prospective survey of candidaemia: report from one Italian region. *J Hosp Infect*. 2002; 51: 297-304.

Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R; ECMM Working Group on Candidaemia. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23: 317-322.

Trtkova J, Raclavsky V. Molecular-genetic approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006; 150 :51-61.

Valério HM, Weikert-Oliveira Rde C, Resende MA. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39: 174-178.

van Hal SJ, Stark D, Harkness J, Marriott D. *Candida dubliniensis* meningitis as delayed sequela of treated *C. dubliniensis* fungemia. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 327-329.

van het Hoog M, Rast TJ, Martchenko M, Grindle S, Dignard D, Hogues H, Cuomo C, Berriman M, Scherer S, Magee BB, Whiteway M, Chibana H, Nantel A, Magee PT. Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome Biol*. 2007; 8: R52.

Viudes A, Pemán J, Cantón E, Ubeda P, López-Ribot JL, Gobernado M. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002; 21: 767-774.

Viviani MA, Cogliati M, Esposto MC, Prigitano A, Tortorano AM. Four-year persistence of a single *Candida albicans* genotype causing bloodstream infections in a surgical ward proven by

multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2006; 44: 218-221.

Weinstein O, Levy J, Lifshitz T. Recurrent *Candida albicans* endophthalmitis in an immunocompromised host. Can J Ophthalmol. 2007; 42: 154-155.

Weissenbacher T, Witkin SS, Ledger WJ, Tolbert V, Gingelmaier A, Scholz C, Weissenbacher ER, Friese K, Mylonas I. Relationship between clinical diagnosis of recurrent vulvovaginal candidiasis and detection of *Candida* species by culture and polymerase chain reaction. Arch Gynecol Obstet. 2009; 279: 125-129.

Williamson MI, Samaranayake LP, MacFarlane TW. A new simple method for biotyping *Candida albicans*. Microbios. 1987;51(208-209):159-67

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: 309-317.

Wrobel L, Whittington JK, Pujol C, Oh SH, Ruiz MO, Pfaller MA, Diekema DJ, Soll DR, Hoyer LL. Molecular phylogenetic analysis of a geographically and temporally matched set of *Candida albicans* isolates from humans and nonmigratory wildlife in central Illinois. Eukaryot Cell. 2008; 7: 1475-1486.

Xavier PC, Chang MR, Nunes MO, Palhares DB, Silva RA, Bonfim GF, Almeida Júnior NF. [Neonatal candidemia in a public hospital in Mato Grosso do Sul]. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41: 459-463.

Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. Clin Infect Dis. 2005; 41: 1232-1239.

Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH. Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States, 2000-2005. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008; 29: 978-980.

7.0 ANEXOS

Anexo 1. Posições dos sítios polimórficos e genótipos identificados para (A) *AAT1*, (B) *ACC1*, (C) *ADP1*, (D) *MPIb*, (E) *SYA1*, (F) *VPS13* e (G) *ZWF1*. Na primeira linha, estão demonstrados os nucleotídeos do DST 69 (que foi escolhido por ser o DST mais encontrado e para servir de controle) A seguir, os sítios polimórficos dos DSTs representativos das cepas de *C. albicans* de 61 pacientes que diferem do DST controle. O ponto simples significa que os nucleotídeos dos DSTs dos pacientes foram idênticos ao DST controle.

A) Fragmento do gene *AAT1*

DSTs (n)	Posição do nucleotídeo												
	7	19	28	40	70	89	124	300	325	336	352	361	373
69	A	A	T	R	T	R	Y	G	C	C	C	C	G
24 (4)
69 (10)
90 (1)	.	.	Y	G	.	A	T
93 (1)
104 (1)
277 (2)
344 (1)	.	.	.	A	.	A	C	R
365 (1)	.	.	C	G	.	A
435 (1)
444 (1)	A
515 (1)
519 (1)	A
572 (1)	.	.	.	G	.	G	T
601 (2)	.	.	.	A	Y	A	C
918 (1)	R	.	Y	.	.	A	.	.	.	Y	.	Y	.
957 (1)	.	.	.	A	.	A	C
1047 (1)	.	.	.	G	.	G	T
1168 (1)	.	.	.	G	.	A	T	.	Y	.	.	.	R
1169 (1)	.	.	.	A	.	A	C	A
1170 (1)
1171 (1)
1172 (1)	R
1173 (1)	.	.	Y	.	Y	A	.	.	Y
1174 (1)	.	.	Y	.	.	A	.	.	Y
1175 (1)	.	.	.	A	.	A	C
1176 (1)	.	.	.	A	.	A	C	R
1177 (1)	.	.	C	G	.	A
1178 (1)	R	.	.	A	Y	A
1179 (1)	.	.	Y	G	.	A
1180 (1)	.	.	Y	G	Y
1182 (1)	.	.	.	G	.	G	C
1183 (1)	.	.	.	A	.	A	C	R
1184 (1)	.	.	C	G	.	A	T
1185 (1)
1186(2)	.	.	Y	.	.	A	.	.	.	Y	.	Y	.
1187 (1)	.	.	Y	.	Y	A	.	.	Y
1188 (1)	.	.	Y	.	.	A	.	.	.	Y	.	Y	.
1189 (1)
1190 (1)
1191 (1)
1192 (1)	.	.	.	A	C	A	C	.	.	.	Y	.	.
1193 (1)
1194 (1)	.	.	.	A	Y	A	C
1195 (1)	G
1196 (1)	.	C	Y	.	Y	A	.	.	Y
1197 (1)	.	.	.	G	.	G	T
1198 (1)	.	.	.	A	.	A	C	A
1199 (1)	.	.	Y	.	Y	A	.	.	Y

Os sítios heterozigóticos estão representados nestas tabelas pelas letras K, M, S, R, Y e W, de acordo com o sistema de código internacional IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). A seguir estão as letras que correspondem a sítios polimórficos com o código IUPAC: G+T=K / A+C=M / C+G=S / A+G=R / C+T=Y / A+T=W.

B) Fragmento do gene *ACC1*

DSTs (n)	Posição do nucleotídeo				
	7	210	280	316	391
69	M	C	Y	C	R
24 (4)
69 (10)
90 (1)	A	T	C	.	A
93 (1)	A	.	T	.	G
104 (1)
277 (2)	C	.	T	.	.
344 (1)	A	Y	C	Y	A
365 (1)	A	Y	C	.	A
435 (1)	A	.	C	.	.
444 (1)
515 (1)	A
519 (1)	A
572 (1)
601 (2)	.	.	T	.	A
918 (1)	A	.	C	.	A
957 (1)	A	T	C	.	A
1047 (1)	C	.	T	.	.
1168 (1)	A	.	C	.	A
1169 (1)	A	.	C	T	A
1170 (1)
1171 (1)
1172 (1)
1173 (1)	A	Y	C	.	A
1174 (1)	A	T	C	.	A
1175 (1)	A	T	C	.	A
1176 (1)	A	T	C	Y	A
1177 (1)	A	Y	C	.	A
1178 (1)	A	.	C	.	A
1179 (1)	A	T	C	.	A
1180 (1)	A	Y	C	.	A
1182 (1)
1183 (1)	A	Y	C	Y	A
1184 (1)	A	Y	C	.	A
1185 (1)	C	.	T	.	A
1186(2)	A	.	C	.	A
1187 (1)	A	Y	C	.	A
1188 (1)	A	.	C	.	A
1189 (1)	G
1190 (1)
1191 (1)	C	.	T	.	.
1192 (1)	C	.	T	.	A
1193 (1)	A	T	C	.	A
1194 (1)	.	.	T	.	A
1195 (1)	A
1196 (1)	A	Y	C	.	A
1197 (1)	G
1198 (1)	A	Y	C	Y	A
1199 (1)	A	.	C	.	A

C) Fragmento do gene *ADP1*

DSTs (n)	Posição do nucleotídeo								
	35	40	46	109	125	166	205	225	232
69	C	C	A	A	G	G	T	C	R
24 (4)
69 (10)
90 (1)	A
93 (1)
104 (1)
277 (2)
344 (1)	Y	Y	R	G	R	R	W	Y	G
365 (1)	.	.	.	R	A
435 (1)	A
444 (1)	G
515 (1)
519 (1)
572 (1)
601 (2)	Y	Y	R	R	R	R	W	Y	G
918 (1)	T	T	G	.	A	A	A	T	A
957 (1)	Y	Y	R	G	R	R	W	Y	G
1047 (1)
1168 (1)	T	T	G	G	A	A	A	T	G
1169 (1)	Y	T	R	G	R	R	W	Y	G
1170 (1)	G
1171 (1)
1172 (1)
1173 (1)	Y	Y	R	G	A	A	A	T	.
1174 (1)	T	T	G	G	A	A	A	T	G
1175 (1)	Y	Y	R	G	R	R	W	Y	G
1176 (1)	Y	Y	R	T	R	R	W	Y	G
1177 (1)	.	.	.	R	A
1178 (1)
1179 (1)	A
1180 (1)	G
1182 (1)	G
1183 (1)	Y	Y	R	G	R	R	W	Y	.
1184 (1)
1185 (1)
1186(2)	T	T	G	R	A	A	A	T	A
1187 (1)	Y	Y	R	G	A	A	A	T	.
1188 (1)	T	T	G	R	A	A	A	T	A
1189 (1)	G
1190 (1)	A
1191 (1)	G
1192 (1)	.	.	.	R	G
1193 (1)	A
1194 (1)	Y	Y	R	.	R	R	W	Y	G
1195 (1)
1196 (1)	.	.	.	T	A	A	A	T	.
1197 (1)
1198 (1)	Y	Y	R	T	R	R	W	Y	G
1199 (1)	.	.	.	T	A	A	A	T	.

D) Fragmento do gene *MPIb*

DSTs (n)	Posição do nucleotídeo										
	27	34	36	66	72	88	234	237	238	276	289
69	R	Y	K	W	R	A	C	A	G	G	A
24 (4)
69 (10)
90 (1)	G	T	T	A
93 (1)
104 (1)
277 (2)
344 (1)	A	C	G	T	G	.	M	R	.	R	R
365 (1)	G	T	T	A
435 (1)	G	T	T	A	A
444 (1)	A	C	G	T	G
515 (1)
519 (1)
572 (1)
601 (2)	A	C	G	T	G	.	A	G	.	A	G
918 (1)	G	T	T	A
957 (1)	A	C	G	T	G	.	M	R	.	R	R
1047 (1)
1168 (1)	A	C	G	T	G	.	A	G	C	.	.
1169 (1)	A	C	G	T	G	.	M	R	.	R	R
1170 (1)
1171 (1)
1172 (1)
1173 (1)	G
1174 (1)	A	C	G	T	G
1175 (1)	A	C	G	T	G	.	.	R	.	R	R
1176 (1)	A	C	G	T	G	.	.	R	.	R	R
1177 (1)	G	T	T	A	.	M
1178 (1)
1179 (1)	G	T	T	A
1180 (1)	A	C	G	T	G
1182 (1)	A	C	G	T	G	.	A	G	.	A	G
1183 (1)
1184 (1)
1185 (1)
1186(2)	G	T	T	A
1187 (1)	G
1188 (1)	G	T	T	A
1189 (1)	A	C	G	T	G	.	A
1190 (1)
1191 (1)	A	C	G	T	G	.	A
1192 (1)	A	C	G	T	G	.	M
1193 (1)	G	T	T	A
1194 (1)	A	C	G	T	G	.	.	G	.	A	G
1195 (1)
1196 (1)	G
1197 (1)
1198 (1)	A	C	G	T	G	.	M	R	.	R	R
1199 (1)	G

E) Fragmento do gene *SYA1*

DSTs (n)	Posição do nucleotídeo										
	1	25	61	100	142	160	185	186	307	351	352
69	T	A	G	C	A	T	G	C	C	C	C
24 (4)
69 (10)
90 (1)	Y	C	R	T	G	G	.	.	.	T	.
93 (1)
104 (1)
277 (2)
344 (1)	.	M	R	Y	R	Y	.	.	.	Y	.
365 (1)	Y	C	R	T	G	G	.	.	.	T	.
435 (1)
444 (1)
515 (1)
519 (1)
572 (1)
601 (2)	.	M	A	T	G	C	.	.	A	.	.
918 (1)	Y	C	R	Y	R	Y
957 (1)	.	M	R	Y	R	Y	.	.	.	Y	.
1047 (1)
1168 (1)	Y	M	R	Y	R	C	K
1169 (1)	.	M	R	Y	R	Y
1170 (1)
1171 (1)
1172 (1)
1173 (1)	.	.	R	Y	.	.	.
1174 (1)	Y	M	.	Y	R	Y	.	.	.	T	.
1175 (1)	.	M	R	Y	R	Y	.	.	.	Y	.
1176 (1)	.	M	R	Y	R	Y	.	.	.	Y	.
1177 (1)	Y	C	R	T	G	C	.	.	.	T	.
1178 (1)	Y	M	.	Y	R	Y
1179 (1)	.	C	A	T	G	C	.	Y	.	T	.
1180 (1)	.	M	R	Y	R	C	.	.	.	Y	.
1182 (1)
1183 (1)
1184 (1)	.	M	A	T	G	C	.	.	M	Y	y
1185 (1)
1186(2)	Y	C	R	Y	R	Y
1187 (1)	.	.	R	Y	.	.	.
1188 (1)	Y	C	R	Y	R	Y
1189 (1)
1190 (1)
1191 (1)
1192 (1)	.	M	A	Y	R	C	K	.	.	T	.
1193 (1)	Y	C	R	T	G	C	.	.	.	T	.
1194 (1)	.	M	A	T	G	C	.	.	A	.	.
1195 (1)
1196 (1)	.	.	R	Y	.	.	.
1197 (1)
1198 (1)	.	M	R	Y	R	Y
1199 (1)	.	.	R	Y	.	.	.

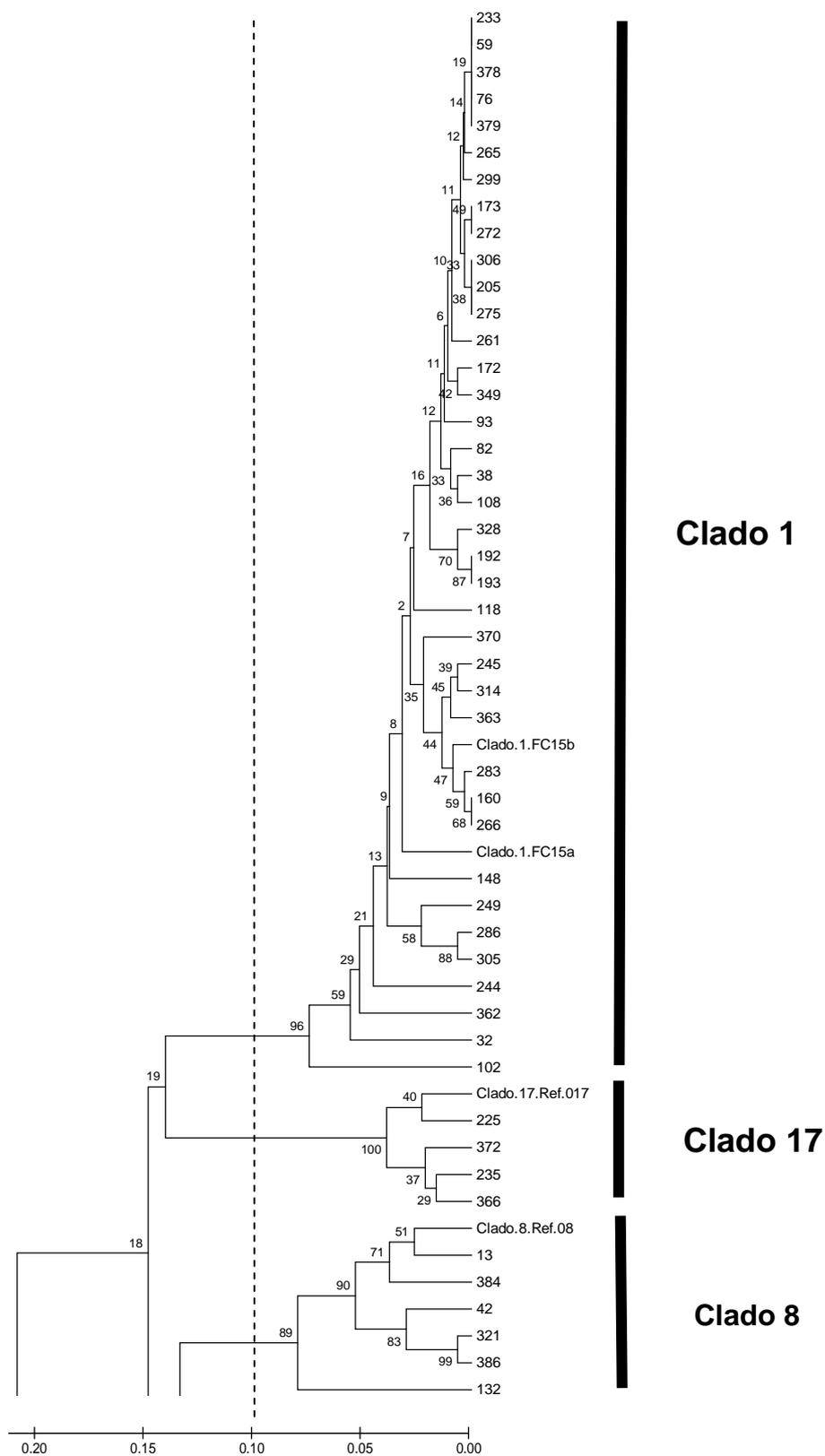
F) Fragmento do gene *VPS13*

DSTs (n)	Posição do nucleotídeo													
	49	134	212	217	241	281	282	320	322	326	328	370	375	
69	C	A	G	Y	A	R	G	G	K	G	G	W	Y	
24 (4)	.	.	.	T	.	A	.	.	G	.	.	T	T	
69 (10)	
90 (1)	C	
93 (1)	
104 (1)	
277 (2)	.	.	.	T	.	G	.	.	G	.	.	T	T	
344 (1)	.	.	.	T	G	G	A	A	T	.	.	T	C	
365 (1)	.	.	.	T	.	A	.	.	G	.	.	T	C	
435 (1)	
444 (1)	
515 (1)	.	.	.	C	.	G	.	.	T	.	.	A	C	
519 (1)	
572 (1)	
601 (2)	M	W	.	T	.	.	.	R	T	.	.	.	C	
918 (1)	M	.	.	T	T	.	.	.	C	
957 (1)	A	.	.	T	.	G	.	A	T	.	.	A	C	
1047 (1)	
1168 (1)	.	.	A	T	.	G	.	.	T	.	.	A	C	
1169 (1)	A	.	.	T	.	G	.	A	T	.	.	A	C	
1170 (1)	
1171 (1)	
1172 (1)	
1173 (1)	R	G	.	.	T	.	.	.	C	
1174 (1)	M	T	R	.	.	C	
1175 (1)	.	.	.	T	G	G	A	.	T	.	.	T	C	
1176 (1)	M	.	.	T	R	G	R	R	T	.	.	.	C	
1177 (1)	
1178 (1)	.	.	.	T	.	G	
1179 (1)	.	.	.	T	.	A	.	.	G	.	.	T	T	
1180 (1)	.	W	.	T	.	A	.	.	T	.	.	T	C	
1182 (1)	
1183 (1)	M	.	.	T	R	G	R	R	T	.	.	.	C	
1184 (1)	T	R	R	.	C	
1185 (1)	
1186(2)	M	.	.	T	.	.	.	R	T	.	.	.	C	
1187 (1)	R	G	.	.	T	.	.	.	C	
1188 (1)	.	.	.	T	.	G	.	A	T	.	.	A	C	
1189 (1)	.	.	.	T	.	A	.	.	G	.	.	T	T	
1190 (1)	.	.	.	T	
1191 (1)	
1192 (1)	.	.	.	T	G	G	.	.	T	.	.	T	C	
1193 (1)	C	
1194 (1)	C	
1195 (1)	.	.	.	T	.	G	.	.	G	.	.	T	T	
1196 (1)	R	G	.	.	T	.	.	.	C	
1197 (1)	.	.	.	T	.	A	.	.	G	.	.	T	T	
1198 (1)	M	.	.	T	R	G	R	R	T	.	.	.	C	
1199 (1)	.	.	.	T	G	G	.	.	T	.	.	T	C	

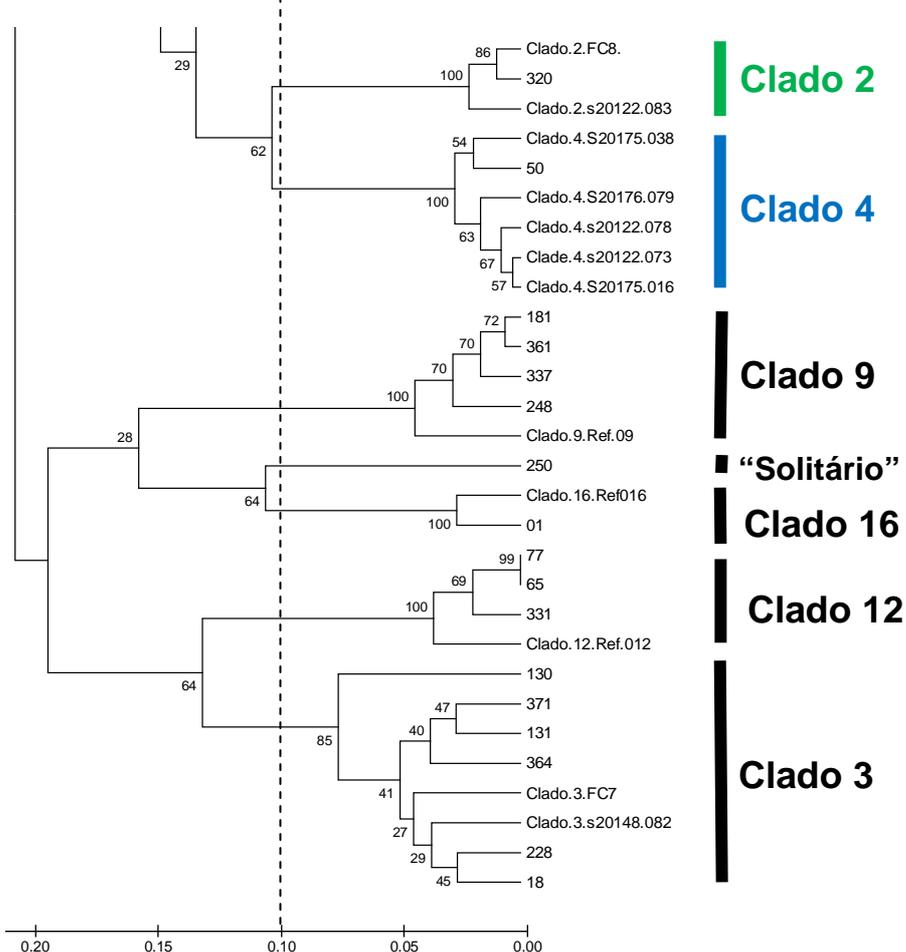
G) Fragmento do gene *ZWF1*

DSTs (n)	Posição do nucleotídeo										
	23	31	43	49	55	262	274	337	379	439	482
69	A	Y	W	T	T	C	A	Y	Y	A	W
24 (4)
69 (10)
90 (1)	M	C	.	Y	C	.	R	.	T	.	A
93 (1)
104 (1)	C	C	.	T
277 (2)	.	T	T	C	C	.	A
344 (1)	M	.	T	Y	Y	.	.	.	T	.	A
365 (1)	M	.	T	Y	Y	.	.	.	T	.	A
435 (1)
444 (1)
515 (1)
519 (1)
572 (1)
601 (2)	C	C	T	C	C	.	.	C	T	.	A
918 (1)	.	.	.	Y	Y	M	R	.	T	.	A
957 (1)	M	.	T	Y	Y	.	.	.	T	.	A
1047 (1)
1168 (1)	M	C	A	C	C	M	R	C	T	R	A
1169 (1)	M	.	T	Y	Y	.	.	.	T	.	A
1170 (1)	C	C	.	.
1171 (1)	C	C	.	.
1172 (1)
1173 (1)	.	C	A	.	C	.	G	T	T	.	A
1174 (1)	.	C	A	Y	C	M	R	C	T	R	A
1175 (1)	C	C	T	C	.	.	.	C	T	.	A
1176 (1)
1177 (1)	M	.	T	Y	Y	.	.	.	T	.	A
1178 (1)
1179 (1)	M	C	.	Y	C	.	R	.	T	.	A
1180 (1)	M	C	.	C	C	.	.	C	T	.	A
1182 (1)
1183 (1)	M	.	T	Y	Y	.	.	.	T	.	A
1184 (1)	M	.	T	Y	Y	.	.	.	T	.	A
1185 (1)
1186(2)	.	.	.	Y	Y	M	R	.	T	.	A
1187 (1)	Y	.	R	T	T	.	A
1188 (1)	.	.	.	Y	Y	.	R	.	T	.	A
1189 (1)
1190 (1)
1191 (1)
1192 (1)	M	C	.	Y	Y	.	.	C	.	.	.
1193 (1)	M	C	.	Y	C	.	R	.	T	.	A
1194 (1)	C	C	T	C	C	.	.	C	T	.	A
1195 (1)
1196 (1)	Y	.	R	T	T	.	A
1197 (1)
1198 (1)	M	.	T	Y	Y	.	.	.	T	.	A
1199 (1)	Y	.	R	T	T	.	A

Anexo 2. Dendrograma da **Figura 6**, apresentado de forma ampliada para facilitar a visualização de todos os isolados



Anexo 2. (Continuação)



Dendrograma UPGMA mostrando a distância genética entre as cepas de *C. albicans* de pacientes com candidemia tipados por MLST. A linha tracejada mostra o ponto de corte igual a 0,1 utilizada para determinar a distância genética que auxilia no delineamento dos clados.

Anexo 3. Tabela das concentrações inibitórias mínimas (CIM) expressas em µg/mL para 5 antifúngicos de 61 pacientes incluídos neste estudo com informações adicionais sobre o número no estudo da rede nacional de vigilância de candidemia (RNVC) e data das coletas das amostras.

	Nº CDC	Nº protocolo	Data da Coleta	Nº Banco	Nº LEMI ^a	Anfo-B	Fluco	Itra	5FC	Vorico	CIM em µg/mL	
											hemocultura	
1	1	01-0001-01-01	14/03/2003	1280 ^a	6050A	0,5	0,125	0,03	0,125	0,03		
2	2	01-0001-01-02	01/04/2003	1280B	6050B	0,25	0,125	0,03	0,125	0,03		
3	13	01-0012-01-01	27/05/2003	1389 ^a	6455A	0,25	0,25	0,03	0,125	0,03		
4	18	01-0016-01-01	07/06/2003	1392 ^a	6458A	0,25	0,5	0,03	0,125	0,03		
5	32	01-0033-01-01	25/01/2004	1917 ^a	7887A	0,25	0,5	0,03	0,5	0,03		
6	38	01-0048-01-01	02/10/2004	2392 ^a	8853A	0,5	0,25	0,03	0,125	0,03		
7	42	02-0001-01-01	24/02/2003	ppd/8	5879-A	0,25	0,5	0,03	0,5	0,03		
8	50	02-0015-01-01	14/10/2003	ppd/8	7009	0,5	0,25	0,03	0,25	0,03		
9	59	02-0030-01-01	27/11/2003	1949	7922	0,25	0,5	0,03	4	0,03		
10	65	02-0040-01-01	26/06/2004	2251	8562	0,5	0,25	0,03	0,25	0,03		
11	76	02-0053-01-01	29/10/2004	2545	9126	0,5	0,125	0,03	0,125	0,03		
12	77	03-0004-01-01	09/04/2003	1251 ^a	5981B	0,5	0,125	0,03	0,125	0,03		
13	78	03-0004-01-02	11/04/2003	1251B	5995A	0,5	0,125	0,03	0,125	0,03		
14	82	03-0008-02-01	27/06/2003	1254C	6335	1	0,125	0,03	0,25	0,03		
15	93	03-0065-01-01	03/10/2003	1533	6872	0,5	0,125	0,03	0,25	0,03		
16	102	03-0092-01-01	26/11/2003	1622	7303	0,5	0,25	0,03	>64	0,03		
17	108	03-0104-01-01	08/01/2004	1746	7581	0,25	0,5	0,03	0,5	0,03		
18	118	03-0152-01-01	08/04/2004	2021	8075	0,125	0,5	0,03	1	0,03		
19	130	03-0193-01-01	13/12/2004	2497	9047	0,5	0,125	0,03	0,125	0,03		
20	131	04-0001-01-01	27/07/2003	1432	6552	0,25	0,5	0,03	0,25	0,03		
21	132	04-0003-01-01	27/07/2003	1434	6554	0,25	0,25	0,03	0,25	0,03		
22	148	04-0041-01-01	19/02/2004	1872	7812	0,25	0,25	0,03	4	0,03		
23	160	04-0059-01-01	27/05/2004	2133	8342	0,5	0,5	0,03	0,25	0,03		
24	172	04-0080-01-01	25/11/2004	2432	8919	0,5	0,125	0,03	1	0,03		
25	173	04-0082-01-01	26/12/2004	2534	9115	0,25	0,25	0,03	0,125	0,03		
26	181	05-0013-01-01	09/06/2003	1367 ^a	6327	0,25	0,125	0,03	0,125	0,03		
27	192	05-0033-01-01	06/10/2003	1570 ^a	7053A	0,25	0,25	0,03	2	0,03		
28	193	05-0033-01-02	09/10/2003	1570B	7053B	0,5	0,125	0,03	2	0,03		
29	205	05-0051-01-01	23/01/2004	1931	7901	0,125	0,5	0,03	2	0,03		
30	225	05-0102-01-01	10/12/2004	2518 ^a	9085A	0,5	0,125	0,03	0,125	0,03		
31	228	05-0103-01-01	13/12/2004	2519 ^a	9086A	0,25	0,25	0,03	0,125	0,03		
32	233	06-0005-01-01	30/04/2003	1400 ^a	6489A	0,25	0,25	0,03	0,5	0,03		
33	235	06-0007-01-01	27/05/2003	1402	6491	1	0,125	0,03	0,25	0,03		
34	244	06-0043-01-01	15/06/2004	2139	8363	0,5	0,5	0,06	2	0,06		
35	245	06-0046-01-01	09/09/2004	2346	8757	1	0,125	0,03	0,25	0,03		
36	248	08-0003-01-02	28/03/2003	1238B	5973	0,5	0,125	0,03	0,125	0,03		
37	249	08-0007-01-01	05/04/2003	1265	6012	0,5	0,25	0,03	0,125	0,03		
38	250	08-0008-01-01	24/04/2003	1299	6103	1	0,125	0,03	0,125	0,03		
39	261	08-0028-01-01	03/05/2004	2079	8203	0,5	1	0,03	0,5	0,03		
40	265	09-0017-01-01	07/02/2004	1827	7719	0,25	0,5	0,03	0,25	0,03		
41	266	09-0019-01-01	12/02/2004	1850	7764	0,5	0,5	0,03	8	0,03		
42	272	09-0042-01-01	13/06/2004	2097	8268	1	0,25	0,03	16	0,03		

43	275	09-0048-01-01	09/08/2004	2260	8587	0,5	0,5	0,06	2	0,03
44	276	09-0048-02-01	28/10/2004	2381	8842	0,5	0,125	0,03	2	0,03
45	283	09-0058-01-01	31/10/2004	2386	8846	0,5	0,25	0,03	0,125	0,03
46	286	12-0005-01-01	19/09/2003	1506	6795	0,25	0,5	0,03	0,5	0,03
47	299	12-0036-01-01	04/04/2004	PPP/22	7998A	0,25	0,25	0,03	1	0,03
48	305	12-0056-01-01	09/06/2004	2100	8271	1	64	0,5	0,25	4
49	306	12-0058-01-01	15/06/2004	PPD/22	8277A	1	2	0,25	2	0,06
50	307	12-0058-01-02	19/06/2004	PPD/22	8277B	0,5	0,25	0,03	1	0,03
51	314	12-0067-01-01	20/07/2004	PPD/22	8461A1	0,5	0,5	0,03	2	0,03
52	315	12-0067-01-02	22/07/2004	PPD/22	8461B1	1	0,125	0,03	2	0,03
53	316	12-0067-01-03	23/07/2004	PPD/22	8461C1	0,25	0,125	0,03	2	0,03
54	317	12-0067-01-04	25/07/2004	PPD/22	8461D	0,5	0,125	0,03	2	0,03
55	318	12-0067-01-05	26/07/2004	PPD/22	8461 E1	1	0,125	0,03	0,25	0,03
56	319	12-0067-01-06	28/07/2004	PPD/22	8461F1	1	0,125	0,03	0,25	0,03
57	320	12-0067-01-07	29/07/2004	PPD/22	8461G1	0,25	0,5	0,03	0,25	0,03
58	321	12-0068-01-01	18/07/2004	2187 ^a	8451A	0,5	0,5	0,03	0,25	0,03
59	328	12-0074-01-01	04/08/2004	2198	8482	1	0,5	0,03	4	0,03
60	331	12-0078-01-01	31/08/2004	2296 ^a	8641A	0,5	0,5	0,03	0,25	0,03
61	337	12-0085-01-01	28/09/2004	2333A/B/C	8731A/B/C	1	0,25	0,03	0,25	0,03
62	349	12-0094-01-01	01/11/2004	2365	8815	0,5	0,125	0,03	0,125	0,03
63	350	12-0094-02-01	06/12/2004	2434	8925	0,5	0,125	0,03	0,125	0,03
64	361	12-0115-01-01	29/12/2004	2476	9003	0,5	0,125	0,03	0,125	0,03
65	363	13-0003-01-01	13/11/2003	1626	7309	0,5	0,25	0,03	0,5	0,03
66	364	13-0011-01-02	01/04/2004	2063	8181	0,25	0,125	0,03	0,125	0,03
67	366	13-0016-01-01	29/06/2004	2177	8433	0,5	0,125	0,03	0,125	0,03
68	370	13-0021-01-01	03/11/2004	2406	8882	0,5	0,25	0,03	4	0,03
69	371	14-0001-01-01	10/08/2003	1600	7222	0,25	0,5	0,03	0,25	0,03
70	372	14-0008-01-01	13/11/2003	1618	7275	0,25	0,5	0,03	0,5	0,03
71	378	14-0027-01-01	15/03/2004	1982 ^a	8022A	0,25	0,5	0,03	2	0,03
72	379	14-0027-01-02	25/03/2004	1982B	8022B	0,5	4	0,06	0,125	0,06
73	384	14-0036-01-01	05/03/2004	2071 ^a	8189A	0,5	0,125	0,03	0,125	0,03
74	386	14-0041-01-01	24/05/2004	2107 ^a	8297A	0,5	0,125	0,125	0,125	0,03

^a Laboratório Especial de Micologia (LEMI)

Liberdade é uma palavra que o sonho humano alimenta, não há ninguém que explique e ninguém que não entenda.

(Cecília Meireles)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)