



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



Instituto Nacional de Infectologia

Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

LUCAS MACHADO MOREIRA

***Candida tropicalis*: Epidemiologia Molecular de isolados clínicos em
Hospital Universitário de Minas Gerais**

Rio de Janeiro
2019

LUCAS MACHADO MOREIRA

***Candida tropicalis*: Epidemiologia Molecular de isolados clínicos em
Hospital Universitário de Minas Gerais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para a obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores:

Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira

Dr. Mauro de Medeiros Muniz

Rio de Janeiro
2019

LUCAS MACHADO MOREIRA

***Candida tropicalis*: Epidemiologia Molecular de isolados clínicos em
Hospital Universitário de Minas Gerais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para a obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores:

Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira

Dr. Mauro de Medeiros Muniz

Aprovado em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cristiane da Cruz Lamas (Presidente)
Instituto Nacional de Infectologia - Fiocruz

Dr. André Luis Souza dos Santos
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Lucimar Ferreira Kneipp
Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Dedico este trabalho à duas mulheres que dedicaram suas vidas de forma incondicional a mim. À minha mãe, Elizete, exemplo de força, dedicação e amor e à minha avó de ouro, Maria de Lourdes, que hoje deixa saudade em meu coração.

õLutem e lutem novamente, até
que cordeiros virem leõesõ
Robin Hood

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira que abriu as portas do laboratório. Muito obrigado pela oportunidade, confiança e amizade.

Ao meu coorientador Dr. Mauro de Medeiros Muniz com quem tenho a oportunidade de aprender a cada dia mais. Obrigado pelas conversas, conselhos, compreensão e constante apoio.

A Profa. Dra. Maria Helena Braga pela orientação de vida, carinho de mãe e pelas inúmeras oportunidades que sempre me proporciona. Obrigado!

Ao Prof. Dr. Murilo Gomes Oliveira e a todos os colaboradores do setor de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas Professor Maurílio Baldi do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora por todos os ensinamentos, trabalhos, plantões e constante auxílio.

A Dra. Luciana Trilles por toda sua paciência e pela pronta disponibilidade em sanar minhas dúvidas. Obrigado pelo carinho, atenção, sugestões e por sempre me lembrar de ler os *guidelines*.

Aos membros da equipe Dr. Rodolfo de Almeida Lima Castro, Dra. Marília Martins Nishikawa e Dr. Rodrigo de Almeida Paes. Obrigado por suas colaborações na realização deste trabalho.

A Dra. Rosely de Oliveira Zancopé que acompanhou a evolução deste trabalho durante esses dois anos de mestrado. Obrigado pela atenção e sugestões.

À Dra. Lívia Souza Ramos que revisou e muito contribuiu na construção deste trabalho. Obrigado pela sua disponibilidade, dedicação e correções.

Aos professores Dra. Cristiane da Cruz Lamas, Dr. André Luis Souza dos Santos, Dra. Lucimar Ferreira Kneipp e Dra. Danielly Corrêa Moreira de Sequeira por aceitarem participar da minha banca examinadora de mestrado. Obrigado pela troca de conhecimentos, sugestões e críticas na finalização deste trabalho.

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

Ao meu amigo Fernando Almeida da Silva pela amizade e carinho que vão além do convívio diário no laboratório. Obrigado por todo o apoio, aprendizados, conselhos e por todo o incentivo frente aos desafios da vida. Obrigado irmão.

A todos os amigos do Laboratório de Micologia, setor de Imunodiagnóstico (INI ó Fiocruz) por dividirem comigo não só a bancada de trabalho. Obrigado pelas conversas, pelas inúmeras canecas de café, feijoadas, churrascos e por tornar tão agradável cada dia de trabalho.

Aos colaboradores do Laboratório de Micologia, dos setores Ambiental e Diagnóstico Micológico (INI ó Fiocruz), obrigado pela convivência diária.

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

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

A Flávia Ganimi Von Goldner por toda a cumplicidade, compreensão e apoio diário.

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

MACHADO-MOREIRA, L. *Candida tropicalis*: Epidemiologia Molecular de isolados clínicos em Hospital Universitário de Minas Gerais. Rio de Janeiro, 2019. 115f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] ó Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

O aumento da prevalência de infecções nosocomiais causadas por *Candida tropicalis* descreve a espécie como um patógeno emergente em escala mundial. Esse fenômeno, somado a fatores predisponentes como o aumento no número de casos de pacientes gravemente imunocomprometidos, elevam as taxas de morbimortalidade associadas às infecções por *C. tropicalis*. Frente a esse cenário, o estudo objetivou avaliar por meio de ferramentas moleculares de menor custo, a epidemiologia dos isolados de *C. tropicalis* identificados como agentes etiológicos de quadros de candidíase invasiva em um Hospital Universitário de Minas Gerais. Um número de 110 isolados fúngicos, oriundos de episódios de candidíase que ocorreram no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2017, presuntivamente identificados como *C. tropicalis*, por meio de metodologia convencional, foram incluídos no estudo. A identificação fenotípica dos isolados envolveu avaliação em CHROMagar® *Candida*, onde 93 isolados desenvolveram coloração azul e 17 apresentaram coloração inespecífica. A avaliação da macromorfologia dos isolados exibiu 4 variantes morfológicas descritas como cotonosa, micelial, lisa e rugosa. A identificação bioquímica dos isolados foi realizada em sistema Vitek® 2 YST Card e apresentou 17 perfis bioquímicos distintos compatíveis com a identificação de *C. tropicalis*. No entanto, o sistema não conseguiu identificar 4 dos 110 isolados testados. A identificação molecular dos isolados foi realizada pela amplificação e posterior sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal, e a partir da avaliação das sequências de DNA dos isolados foi possível avaliar a existência de 12 haplótipos com alta taxa de diversidade haplotípica. A análise filogenética dos haplótipos determinou o agrupamento dos haplótipos em 4 clados. O clado 1 agrupa os haplótipos 1, 3, 4 e 6 e concentra 76% dos isolados. A tipagem dos isolados pela amplificação das regiões repetitivas hipervariáveis (minissatélites) M13 evidenciou a existência de 7 perfis moleculares. Os isolados inseridos no estudo foram provenientes de 64 pacientes, dos quais 52% eram do sexo masculino, a mediana de idade observada foi de 61,7 anos e o principal motivo de internação foi associado a doenças crônico-degenerativas, seguido pelas doenças hematológicas e/ou neoplasias. A análise multivariada dos fatores de risco associados ao quadro de candidíase invasiva, nos permitiu inferir que o uso de sonda urinária [OR 84,4, IC95% 4,4-1634,2], submissão ao procedimento de transfusão sanguínea [OR 8,0, IC95% 1,1-56,8], internação no CTI [OR 77,7, IC95% 3,7-1651,3] e o não uso de antifúngicos [OR 4,5, IC95% 1,3-15,1] foram associados a um aumento da chance de óbito. Enquanto, a análise de sobrevida determinou que os pacientes que apresentaram infecção por cepas pertencentes ao clado ITS 3 (H2) exibiram o menor tempo de sobrevida e maior risco de óbito [HR 12,49, IC95% 2,27-68,77] comparado aos pacientes acometidos por isolados do clado ITS 4 (H5, H8 e H10). As metodologias empregadas nesse estudo demonstraram robustez e poder discriminatório para avaliar os perfis genotípicos circulantes na unidade hospitalar, elucidaram aspectos epidemiológicos e identificaram as prováveis correlações clínicas entre os aspectos genotípicos dos isolados e o desfecho clínico do paciente.

Palavras chaves: Epidemiologia molecular, *Candida tropicalis*, Candidíase.

MACHADO-MOREIRA, L. *Candida tropicalis*: Molecular Epidemiology of clinical isolates at University Hospital of Minas Gerais. Rio de Janeiro, 2019. 115p. Dissertation [Master in Clinic Research in Infectious Diseases] ó Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases.

ABSTRACT

The increased prevalence of nosocomial infections caused by *Candida tropicalis* has been describing the species as an emerging pathogen on worldwide scale. In addition, this phenomenon has been associated to predisposing factors such as the increasing severe number of cases of immunocompromised patients raising the morbimortality rates associated with *C. tropicalis* infections. According to this scenario, the study aimed to evaluate the epidemiology of *Candida tropicalis* isolates identified as etiological agents of invasive candidiasis in a Federal University Hospital of Minas Gerais, using lower cost molecular tools. A number of 110 fungal isolates from candidiasis episodes that occurred from January 2013 to January 2017, identified as *C. tropicalis*, using conventional methodology were included in the study. The isolates phenotypic identification involved; evaluation of CHROMagar® Candida, and 93 isolates developed blue staining and 17 has shown non-specific staining. The macromorphology; four morphological variants described as cottonous, mycelial, smooth and rough. The biochemical identification was performed in Vitek® 2 YST Card system and presented 17 distinct biochemical profiles identified as *C. tropicalis*. However, the system was unable to identify 4 of the 110 isolates tested. The molecular identification was performed by PCR amplification and further sequencing of the ribosomal DNA (ITS1-5.8S-ITS2 region) and it was possible to demonstrate 12 haplotypes with high diversity. Phylogenetic analysis of haplotypes has clustered them into four clades. Clade 1 groups haplotypes 1, 3, 4 and 6 (considered as precursor group) concentrating 76% of the isolates. The M13 hypervariable regions (minisatellites) typing has shown seven molecular profiles. From those, 64 patients, 52% were male, the median age observed was 61.7 years and the hospitalization main reason were associated with chronic-degenerative diseases, followed by hematological and/or neoplasia. The multivariate analysis of the risk factors associated with invasive candidiasis has allowed to infer that urinary catheter use [OR 84.4, 95% CI.44-1634.2], blood transfusion procedure [OR 8, 0, IC95% 1.1-56.8], ICU hospitalization [OR 77.7, IC 95% 3.7-1651.3] and non-use of antifungal agents [OR 4.5, IC 95% 1,3- 15,1] were associated with a higher risk of death. The Survival analysis has shown that patients who presented infections caused by strains belonging to the ITS 3 clade (H2) exhibited the shortest survival time and highest risk of death [HR 12.49, 95% CI 2.27-68.77] when comparing those patients affected by ITS 4 clade isolates (H5, H8 and H10). The methodologies employed in this study demonstrated robustness and discriminatory power to evaluate the genotypic profiles circulating in the hospital units, accurately identification elucidating epidemiological aspects and strongly suggesting the presumable clinical correlations between the genotypic pattern and the possibility of predicting the clinical outcome.

Keywords: Molecular Epidemiology, *Candida tropicalis*, Candidiasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fluxograma de metodologias empregadas no trabalho.	43
Figura 2 -	Variantes de pigmentação das colônias em Chromagar® Candida.	45
Figura 3 -	Variantes morfológicas das colônias de <i>Candida tropicalis</i> em Sabouraud dextrose ágar.	46
Figura 4 -	Dendrograma baseado na análise dos perfis bioquímicos obtidos pelo Vitek® 2 YST Card	47
Figura 5 -	Análise de correlação entre os testes fenotípicos empregados no estudo dos 110 isolados presuntivamente identificados como <i>C. tropicalis</i> por metodologia convencional.	50
Figura 6 -	Análise filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal.	51
Figura 7 -	Análise polimórfica da região ITS1-5.8S-ITS2 de 113 sequências de <i>C. tropicalis</i> .	52
Figura 8 -	Diversidade genética de <i>C. tropicalis</i> com base na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal.	54
Figura 9 -	Análise filogenética baseada nas sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal de 12 haplótipos de <i>C. tropicalis</i> .	55
Figura 10 -	Diversidade genética de <i>C. tropicalis</i> com base na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal e de acordo com a fonte de isolamento.	57
Figura 11 -	Diversidade genética de <i>C. tropicalis</i> com base na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal e de acordo com o país de isolamento.	58
Figura 12 -	Gel representativo dos produtos do DNA <i>fingerprinting</i> - primer M13 de isolados de <i>C. tropicalis</i> .	59
Figura 13 -	Dendrograma baseado na análise dos perfis moleculares obtidos a partir dos produtos da PCR <i>fingerprinting</i> : primer M13.	60

- Figura 14 -** Diversidade genética de *C. tropicalis* com base na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal e sua relação com os perfis moleculares obtidos a partir dos produtos da PCR *fingerprinting*: *primer* M13. 61
- Figura 15 -** Diversidade genética de *C. tropicalis* com base na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal e sua relação com as características fenotípicas e o sítio de isolamento. 62
- Figura 16 -** Análise de sobrevida de 62 pacientes com candidíase invasiva por *C. tropicalis*. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sítios de isolamento dos 110 isolados fúngicos oriundos de episódios de candidíase que ocorreram no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2017, presuntivamente identificados como <i>Candida tropicalis</i> .	44
Tabela 2 -	Caracterização bioquímica dos isolados fúngicos oriundos de episódios de candidíase que ocorreram no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2017, identificados como <i>Candida tropicalis</i> pelo sistema Vitek® 2 YST Card.	46
Tabela 3 -	Testes bioquímicos variáveis entre os perfis de 106 isolados clínicos identificados pelo sistema Vitek® 2 YST Card como <i>C. tropicalis</i> .	48
Tabela 4 -	Diversidade haplotípica da região ITS1-5.8S-ITS2 de 113 sequências de <i>C. tropicalis</i> .	53
Tabela 5 -	Fatores associados ao desfecho clínico de 62 pacientes com candidíase invasiva por <i>C. tropicalis</i> .	66
Tabela 6 -	Fatores associados ao desfecho clínico de 62 pacientes com candidíase invasiva por <i>C. tropicalis</i> por análise multivariada.	67
Tabela 7 -	Análise comparativa dos fatores associados a evolução clínica de 62 pacientes com candidíase invasiva por <i>C. tropicalis</i> agrupados pela diversidade intraespecífica da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal.	68
Tabela 8 -	Análise comparativa dos fatores associados a evolução clínica de 62 pacientes com candidíase invasiva por <i>C. tropicalis</i> agrupados pela diversidade dos perfis moleculares obtidos a partir dos produtos da PCR <i>fingerprinting</i> : primer M13.	70
Tabela 9 -	Fatores de risco associados ao desfecho clínico de 62 pacientes com candidíase invasiva por <i>C. tropicalis</i> estimado por regressão de Cox.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de microrganismos Norte Americana)
BHI	- <i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão cérebro e coração)
CID	- Classificação internacional de doenças
CNA	- <i>Candida não-albicans</i>
CTI	- Centro de Terapia Intensiva
CVV	- Casos de vulvovaginite
dATP	- Deoxi-Adenosina Trifosfato
dCELa	- D-celobiose
dCTP	- Deoxi-Citosina Trifosfato
dGATa	- D-galacturonato
dGTP	- Deoxi-Guanidina Trifosfato
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
dNTP	- Deoxi-Nucleotídeo Trifosfato
DST	- Tipos de sequências diplóides
dTTP	- Deoxi-Timidina Trifosfato
EDTA	- Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido tetracético etilenodiamino)
HD	- Diversidade de haplótipos

HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HU/UFJF	- Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora
IMLTa	- L-malato
INCQS	- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ITS	- <i>Internal Transcribed Spacer</i> (Região de transcrição interna)
IARAA	- L-arabinose
MAdGa	- Metil- -D-glucopiranosídeo
MALDI-TOF MS	- <i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight mass spectrometry</i> (Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz)
MLST	- Tipagem por sequenciamento de regiões multilocus
NAGa	- N-acetil-glucosamina
PCR	- Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PDA	- <i>Potato Dextrose Agar</i> (Ágar batata dextrose)
PFGE	- Eletroforese em gel com campo pulsado
RAPD	- Amplificação de polimorfismos randômicos
rDNA	- DNA ribossomal
SAPs	- Aspárticos proteases secretadas
SDA	- Sabouraud dextrose Agar
TBE	- Tris borato-EDTA

TGU	- Trato geniturinário
TMO	- Unidade de Transplante de Medula Óssea
TRI	- Trato respiratório inferior
Tris	- Tris (Hidroximetil) Aminometano
TyrA	- Tirosina arilamidase
UFC	- Unidades formadoras de colônias
URE	- Urease
UV	- Luz ultravioleta
XLTa	- Xilitol
YPD	- <i>Yeast Extract Peptone</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Candidíase.....	18
1.2 Agente etiológico.....	21
1.3 Morfofisiologia.....	21
1.4 Características Genéticas.....	22
1.5 Fatores de Virulência.....	23
1.6 Patogenia.....	26
1.7 Diagnóstico Laboratorial.....	29
1.8 Epidemiologia molecular.....	31
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4 MÉTODOS.....	37
4.1 Desenho do Estudo.....	37
4.2 Cálculo do tamanho amostral.....	37
4.3 Casuística.....	37
4.4 Cepas de Referência.....	37
4.5 Confirmação Fenotípica.....	38
4.5.1 Reisolamento e identificação em meio cromogênico.....	38
4.5.2 Avaliação das características macromorfológicas.....	39
4.5.3 Identificação bioquímica: Sistema Vitek® 2 YST Card.....	39
4.5.4 Preservação dos isolados clínicos.....	39
4.6 Identificação Molecular.....	40
4.6.1 Extração do DNA genômico.....	40
4.6.2 Amplificação e Sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA.....	40
4.6.3 Análise da diversidade intraespecífica da região ITS1-5.8S-ITS2.....	41
4.6.4 DNA <i>õFingerprintingõ</i> : primer M13.....	41
4.7 Coleta dos dados de prontuário.....	42
4.8 Plano de análise.....	42
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Confirmação Fenotípica.....	44

5.1.1 Re-isolamento e identificação em meio cromogênico	44
5.1.2 Avaliação das Características Macromorfológicas	45
5.1.3 Identificação bioquímica: Sistema Vitek® 2 YST Card.....	46
5.2 Identificação Molecular	49
5.2.1 Amplificação e Sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA	49
5.2.2 Análise da diversidade intraespecífica da região ITS1-5.8S-ITS2	52
5.2.3 DNA <i>δ</i> Fingerprinting: primer M13	59
5.3 Correlações fenotípicas e genotípicas.....	61
5.4 Avaliações Clínicas	63
6 DISCUSSÃO.....	75
7 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS.....	88
APÊNDICE A ó Análise geral dos 110 isolados de <i>Candida tropicalis</i> oriundos de episódios de candidíase que ocorreram no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2017.	107
APÊNDICE B ó Sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal de <i>C. tropicalis</i> obtidas no banco de dados do NCBI/GenBank	110
APÊNDICE C ó Análise de correlação entre o perfil haplotípico e os testes genotípicos e fenotípicos empregados no estudo dos 110 isolados presuntivamente identificados como <i>C. tropicalis</i> por metodologia convencional.	113
APÊNDICE D - Análise de correlação entre o perfil molecular M13 e os testes fenotípicos empregados no estudo dos 110 isolados presuntivamente identificados como <i>C. tropicalis</i> por metodologia convencional.	115
APÊNDICE E - Análise da evolução de 25 casos que apresentaram múltiplos isolado de <i>C. tropicalis</i>	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Candidíase

A candidíase é uma infecção oportunista de distribuição mundial, causada por fungos pertencentes ao gênero *Candida* (PFALLER et al., 2014). Este gênero agrupa espécies que compõem a microbiota anfibiótica do trato gastrointestinal e do sistema tegumentar (DIGNANI; SOLOMKIM; ANAÏSSE, 2003; KIM; SUDBERY, 2011; LIM et al., 2012). Entretanto, esses microrganismos comensais em situações de desequilíbrio imunológico ou da própria microbiota tendem a causar manifestações clínicas de aspectos variados e caráter agudo ou crônico (VINCENT et al., 2009; MORACE; BORGHI, 2010). As infecções causadas por espécies do gênero *Candida* podem ter sua origem por via endógena ou exógena e tem sua instalação diretamente relacionadas à predisposição do hospedeiro, taxa infecciosa e virulência fúngica (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; MONGE et al., 2006; BARBEDO; SGARBI, 2010). Nos últimos anos, tem sido relatado um aumento na incidência de infecções por *Candida* associada a fatores predisponentes como o uso prolongado de antimicrobianos e quimioterápicos e ao aumento no número de casos de pacientes gravemente imunocomprometidos (PFALLER et al., 2014; VALLABHANENI et al., 2016).

O gênero *Candida* é de grande importância clínica, composto por mais de 200 espécies, entre as quais, 40 já foram associadas às infecções fúngicas nosocomiais. Dentre as espécies do gênero, *C. albicans* é a mais comumente relacionada aos quadros infecciosos. No entanto, a prevalência de colonização e infecções fúngicas nosocomiais causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) apresentaram aumento expressivo nas últimas décadas, com taxas superiores a 50% das infecções não superficiais causadas pelo gênero (TORTORANO et al., 2006; SOBEL, 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007; YANG et al., 2010; MICELI; DÍAZ; LEE, 2011).

Em meio às espécies de CNA, as mais comuns associadas à candidíase, correlacionada à frequência de isolamento, são complexo *C. glabrata*, *C. tropicalis*, complexo *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* e *C. kefyr*. Entretanto, alguns estudos ressalvam a classificação de *C. tropicalis* e complexo *C. parapsilosis* como mais frequentes que o complexo *C. glabrata* (MAGRI et al., 2013; GUINEA et al., 2014). As diferenças de classificação são observadas quando instituições, regiões geográficas ou grupos singulares de

pacientes são estudados (JOHNSON, 2009; YANG et al., 2010; GUINEA et al., 2014; PFALLER et al., 2014; VALLABHANENI et al., 2016).

A exemplo, o Brasil, Chile, Argentina, México, Turquia e países asiáticos tropicais, como Índia, Tailândia e Singapura, têm reportado *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* como as espécies de CNA mais frequentes associadas às candidemias nosocomiais (COLOMBO et al., 2006; CORZO-LEON et al., 2014; ALP et al., 2015; WANG; XU; HSUEH, 2016; TIRABOSCHI et al., 2017; DA MATTA; SOUZA; COLOMBO, 2017; MÁRQUEZ et al., 2018), enquanto na Austrália, Japão, Israel, Espanha, Itália e África do Sul, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* são as mais comuns (TORTORANO et al., 2002; TORTORANO et al., 2006; KREUSCH et al., 2013; GUINEA et al., 2014; ELIAKIM-RAZ et al., 2016; CHAPMAN et al., 2017; KAKEYA et al., 2018). Em grupos específicos, como os pacientes acometidos por malignidades hematológicas ou neoplasias, *C. tropicalis* e *C. krusei* são as espécies mais isoladas (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011, DE FREITAS et al., 2013; TANG et al., 2014; DEWAN et al., 2015; DILHARI, et al., 2016).

Na Oceania, um estudo multicêntrico realizado no período de 2014 a 2015, avaliou 498 casos de candidemia, nos quais *C. albicans* foi identificada em 44,4% dos casos. Dentre as CNA, o complexo *C. glabrata* foi identificado em 26,7% dos casos, complexo *C. parapsilosis* em 16,5% e *C. tropicalis* em apenas 4,8% (CHAPMAN et al., 2017). Nos países asiáticos como Japão, Korea, Hong Kong, Malásia, Singapura, Tailândia e Taiwan, *C. albicans* é a espécie que apresenta maior frequência de isolamentos nos casos de candidemias e candidíases invasivas, enquanto em países como Paquistão e Índia *C. tropicalis* é a espécie predominante entre as *Candida* spp. (VERMA et al., 2003; KOTHARI; SAGAR, 2009; YANG et al., 2010; CHANDER et al., 2013; WANG; XU; HSUEH, 2016; KAKEYA et al., 2018).

Em um estudo realizado em 19 hospitais de Taiwan, nos anos de 2002 e 2006, foram avaliados isolados identificados como agentes etiológicos de quadros de candidíase em sítios estéreis como sangue, líquido ascítico, líquido cefalorraquidiano e líquido sinovial, sendo *C. albicans* (50,1%) e *C. tropicalis* (20,7%) as espécies isoladas com maior frequência (YANG et al., 2010).

Na Europa, um grande número de estudos epidemiológicos realizados em países como Itália, Islândia, Finlândia, Noruega, Dinamarca, Espanha, França, Alemanha, Suécia e Inglaterra avaliaram um número estimado de 3500 casos de candidíase no período de 1980 a 2013. Esses estudos evidenciaram no continente os complexos *C. glabrata* e *C. parapsilosis* como as espécies de CNA mais frequentemente relacionadas a candidemias nosocomiais e

demonstraram uma variação na frequência de isolamento de *C. tropicalis* de 3% a 13% no período (TORTORANO et al., 2002; TORTORANO et al., 2006; GUINEA et al., 2014).

No Oriente Médio, estudos retrospectivos sobre candidemia foram realizados na Turquia no período de 2001 a 2010 e em Israel entre os anos de 2007 e 2014, sendo avaliados um total de 499 casos e observado a maior frequência de *C. albicans*. O isolamento de *C. tropicalis* como agente etiológico dos quadros de candidemia variou entre 13,4 e 13,6% entre os estudos (ALP et al., 2015; ELIAKIM-RAZ et al., 2016). Na África, um estudo epidemiológico realizado em Soweto na África do Sul, entre os anos de 1999 e 2007, avaliou 268 pacientes com distintos fatores predisponentes e evidenciou uma baixa frequência na identificação de *C. tropicalis* dentre os casos estudados (KREUSCH et al., 2013).

Nas Américas do Norte e Central, os estudos realizados no período de 1999 a 2011 em países como Estados Unidos, Canadá, México, Porto-Rico e Costa-Rica, também demonstram *C. albicans* como a espécie mais frequente e *C. tropicalis* como a segunda ou terceira espécie mais identificada com percentual de 10 a 26% (CORZO-LEON et al., 2014; GUINEA et al., 2014; PFALLER et al., 2014; DA MATTA; SOUZA; COLOMBO, 2017).

Na América do Sul, os estudos epidemiológicos descrevem um padrão de frequência de isolamento distinto daqueles observados nos países nórdicos, onde as espécies de CNA predominantes pertencem aos complexos *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Um montante de 34 estudos prospectivos e retrospectivos realizados no Brasil, Argentina, Chile, Colômbia, Venezuela e Peru, no período de 1994 a 2013 demonstraram uma maior prevalência de identificação de espécies do complexo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Em 38% dos estudos, *C. tropicalis* foi a espécie de CNA mais identificada com percentuais que variam de 15 a 39% da frequência de isolamento (DA MATTA; SOUZA; COLOMBO, 2017; TIRABOSCHI et al., 2017; MÁRQUEZ et al., 2018). De acordo com a Rede Brasileira de Candidemia, a epidemiologia dos casos no país reflete números médios que apontam a espécie *C. albicans* como responsável por 40,9% dos casos, seguido por *C. tropicalis* (20,9%), *C. parapsilosis* (20,5%) e *C. glabrata* (4,9%) (COLOMBO et al., 2006; NUCCI et al., 2010; DA COSTA et al., 2014; DA MATTA; SOUZA; COLOMBO, 2017).

1.2 Agente etiológico

Candida tropicalis foi descrita pela primeira vez por Castellani (1912) como agente causador de uma bronquite fúngica, momento que recebeu o nome de *Oidium tropicale*. *C. tropicalis* é uma levedura pertencente a divisão Ascomycota, classe Saccharomycetes, da ordem Saccharomycetales, família Saccharomycetaceae (PFALLER; DIEKEMA, 2007; KURTZMAN et al, 2011; KIDD et al., 2016).

1.3 Morfofisiologia

Candida tropicalis é um fungo dimórfico, sua organização celular se dá por meio da formação de pseudomicélio, constituído por estruturas longas, ramificadas, com blastoconídios esféricos ou ovóides isolados, em cadeias simples ou aglomerados e células de brotamento elipsoidais ou em forma de lágrima ao longo da pseudo-hifa. Em condições ideais, *C. tropicalis* pode formar hifas verdadeiras, uma propriedade compartilhada com *C. albicans* (SUZUKI; MIYAMAE; ISHIDA, 1991; CHAI; DENNING; WARN, 2010; TURNER et al., 2014 ZHANG et al., 2016).

Colônias de *C. tropicalis* cultivadas em meio *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) ou meio *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YPD) apresentam cor creme, com variações de branco a cinza, aspecto maciço e cremoso, com superfícies que oscilam de lisa a rugosa (SUZUKI; MIYAMAE; ISHIDA, 1991; MORALEZ et al., 2014).

Estas colônias não podem ser distinguidas de outras espécies de *Candida* com base na morfologia macroscópica ou na taxa de crescimento, mas podem ser identificadas pelas características microscópicas, como ausência de clamidósporos terminais, associadas a uma série de ensaios bioquímicos (ESPINEL-INGROFF et al., 1996; KURTZMAN et al, 2011).

Leveduras da espécie *C. tropicalis* normalmente são capazes de assimilar por meio da via oxidativa carboidratos como glucose, 2-ceto-D-gluconato, xilose, adonitol, D-galactose, D-sorbitol, N-acetil-glucosamina, D-maltose, sacarose e trealose (KURTZMAN et al, 2011).

Entretanto, a espécie tem a capacidade peculiar de realizar comutações fenotípicas, propriedade que permite ao isolado alternar suas características fenotípicas a partir de um genótipo conservado (JOLY et al., 1996; MORALEZ et al., 2014). O fenômeno da comutação fenotípica habilita o isolado de *C. tropicalis* variar características morfológicas, fisiológicas e patogênicas (LAN et al., 2002).

1.4 Características Genéticas

C. tropicalis é uma levedura pertencente a um seletivo grupo constituído por 75 espécies do gênero *Candida*, denominado clado CTG. Os fungos agrupados nesse clado são capazes de alterar a tradução do códon CUG, que codifica tradicionalmente o aminoácido leucina por uma serina. O impacto e as implicações biológicas desse evento são singulares e ainda pouco compreendidas, uma vez que a ambiguidade possibilita o aumento da diversidade proteica de um organismo e contrapõe o conceito de um código genético universal (MASSEY et al., 2003; SANTOS et al., 2011; SEERVAI et al., 2013).

Inúmeras espécies de fungos podem se reproduzir de forma sexuada e assexuada (NIELSEN, 2007). No clado CTG, espécies como *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* desenvolvem ciclos sexuais completos que incluem eventos de esporulação, enquanto espécies como *C. albicans* sofre acasalamentos homo e heterotálicos orientado por transição fenotípica entre um estado branco e opaco. A reprodução sexual, adotada em situações adversas, favorece a diversidade genômica que permite a adaptação da levedura a ambientes hostis (MAGEE; MAGEE, 2000; NIELSEN, 2007; ALBY; SCHAEFER, 2009; SEERVAI et al., 2013).

C. tropicalis é uma levedura diploide, a qual acreditava-se ter apenas características reprodutivas assexuadas. Entretanto, pesquisas recentes descreveram um acasalamento eficiente entre células diploides *MATa* e *MAT*, que obteve como resultado células tetraploides *a/a* (PORMAN et al., 2011; XIE et al., 2012; SEERVAI et al., 2013). O acasalamento na espécie é controlado pelo regulador transcricional conservado *Wor1* que coordena uma mudança fenotípica em que as células transitam de um estado branco convencional para um estado opaco alternativo, tornando-se competente (MILLER; JOHNSON, 2002; XIE et al., 2012; SEERVAI et al., 2013). A comutação branco-opaco também pode ser induzida na presença de N-acetil-glucosamina (NAGa), uma aldohexose componente da parede celular microbiana e da molécula de quitina (O'HARA; SHANAHAN, 2006; HUANG et al., 2010; XIE et al., 2012).

Seervai e colaboradores (2013) demonstraram que as cepas tetraploides *a/a* de *C. tropicalis* podem ser induzidas a sofrer um ciclo parassexual completo. Esse processo gera células *MATa* ou *MAT* diploides competentes, que por fusão dos diferentes núcleos diploides em uma célula heterocarionte resulta na formação de núcleo tetraploide, que é supostamente instável e produz segregantes por recombinação, processo que pode ocorrer por permutação gênica mitótica ou haploidização.

Morrow e Fraser (2013) demonstram que além das mudanças de ploidia ocorridas no ciclo, as recombinações genéticas também afetam a expressão gênica das células. Sendo assim, o ciclo parassexual é considerado um mecanismo de adaptação que pode gerar variações do cariótipo com impacto direto nos processos de colonização e infecção em mamíferos, uma vez que os eventos de acasalamento ocorrem de maneira eficiente a 37°C (PORMAN et al., 2011; BERMAN; HANDANY, 2012). É importante destacar que a ocorrência de divisão celular por meiose ainda não foi descrita na espécie (ZUZA-ALVES; SILVA-ROCHA; CHAVES, 2017).

Em estudo conduzido por Butler e colaboradores (2009), o genoma da espécie *C. tropicalis* (cepa MYA-3404) foi sequenciado e descrito com um tamanho de 14,58 Mb, contendo 6441 genes e um teor de guanina/citosina de 33,2%. O número de cromossomos não é conhecido com precisão, mas estimado em 5 ou 6 (LI et al., 2014).

1.5 Fatores de Virulência

Dentre as espécies do gênero, *C. tropicalis* tem sido considerada a segunda espécie de maior importância clínica em países tropicais (CHAI; DENNING; WARN, 2010). Estudos de virulência apresentam indícios experimentais que *C. tropicalis* é possivelmente a espécie mais patogênica e virulenta dentre as CNA e está intimamente associada a manifestações clínicas superficiais, mucosas, invasivas e disseminadas, com altas taxas de mortalidade (CHAI; DENNING; WARN, 2010; MESA-ARANGO et al., 2013; MORALES et al., 2014; WU et al., 2014; NEGRI et al., 2015).

Em comparação a outras espécies de CNA, *C. tropicalis* apresenta várias características que aumentam sua patogenicidade intrínseca, como a sua capacidade de oscilar entre um estado morfológico leveduriforme e filamentoso. Essa alternância permite a espécie ter competência adaptativa para sobreviver às variações que ocorrem nos microambientes de um hospedeiro (GOW, et al., 2012; HUANG, 2012; ZANG, et al., 2016).

Diversos são os fatores ambientais envolvidos na regulação da alternância morfológica de *C. tropicalis*, dentre os quais o aporte de NAGa desempenha papel supressor, enquanto a oferta de glicose desempenha efeito promotor tanto a 25°C quanto a 37°C. Além desses elementos, estima-se que 40 fatores de transcrição são reguladores do crescimento em fase filamentosa, sendo a grande maioria de caráter conservado entre os homólogos da espécie e

outros específicos como os fatores *WOR1*, *BCR1*, *Stp4*, *Efh1*, *Csr1* e *Zcf17* (ZANG, et al., 2016).

A patogenicidade das espécies do gênero *Candida* também envolve fatores de virulência relacionados às estratégias de escape do sistema imunológico e a capacidade de aderência a diferentes superfícies (SARDI et al., 2013). O mecanismo de aderência do fungo às superfícies é multifásico e envolve fatores iniciais inespecíficos como interações eletrostáticas e hidrofobicidade celular, seguido da ação de proteínas de superfície especializadas, denominadas adesinas (LI et al., 2003; VERSTREPEN; KLIS, 2006; SILVA-DIAS et al., 2015). A aderência da célula fúngica às superfícies é etapa prévia aos processos de invasão tecidual, otimizados pela capacidade de transição entre células leveduriformes e filamentosas, (CULLEN; SPRAGUE, 2012) e formação de biofilme (VERSTREPEN; KLIS, 2006; SARDI et al., 2013; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014).

O biofilme, por definição, é uma comunidade biológica organizada, estruturada e funcional, inserida em uma matriz extracelular de produção própria constituída de polissacarídeos, proteínas, lipídios, minerais e ácido desoxirribonucleico extracelular. Essas comunidades biológicas têm a capacidade de se aglutinar tanto a superfícies bióticas quanto a superfícies abióticas (SARDI et al., 2013; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014; NOBILE; JOHNSON, 2015; DE MELLO et al., 2017; ARAÚJO, et al., 2017).

A formação do biofilme é controlada por redes regulatórias complexas e envolve quatro processos subsequentes a começar pela adesão, formação da camada basal ou de ancoragem, proliferação e maturação, seguida pelo deslocamento e dispersão do biofilme (ARAÚJO, et al., 2017). A formação de biofilme constitui um importante fator de virulência para as espécies do gênero *Candida*, pois aumentam a resistência à terapia por restringir a permeação dos agentes antifúngicos através da matriz extracelular e protegem às células fúngicas da resposta imune do hospedeiro e das microvariações ambientais (SANTOS et al., 2015; ARAÚJO, et al., 2017; DE MELLO et al., 2017).

Dentre as espécies do gênero, existe uma variabilidade considerável na produção de biofilme, ao passo que *C. tropicalis* apresenta maior produção de biomassa e *C. glabrata* maior atividade metabólica (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014). Estudos realizados com isolados de *C. tropicalis* obtidos de amostras de sangue e do trato geniturinário descrevem a espécie como a produtora de biofilme mais eficiente do gênero *Candida* (PAIVA et al., 2012; PANNANUSORN et al., 2013; UDAYALAXMI; DÓSOUZA, 2014).

Somado a todos os fatores já descritos, a competência para produção de enzimas hidrolíticas como proteases, fosfolipases e hemolisinas, agrega a levedura grande potencial

patogênico, uma vez que a produção dessas enzimas extracelulares, que desempenham importante função nos processos de aderência, invasão e destruição tecidual, ampliam a chance de disseminação hematogênica do patógeno (GOKCE et al., 2007; SILVA et al., 2012; DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014; ZHANG et al., 2019).

As enzimas hidrolíticas da família das aspártico proteases secretadas (Saps) são responsáveis pela adesão, pelo dano tecidual e evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Essas enzimas apresentam grande potencial lítico sobre substratos proteicos o que confere a esse grupo de enzima potencial para clivar estruturas de defesa do hospedeiro pertencentes ao sistema imune inato e adaptativo (HUBE; NAGLIK, 2001; ZUZA-ALVES; SILVA-ROCHA; CHAVES, 2017).

Estudos *in vitro* demonstram que *C. tropicalis* secreta altos níveis de aspártico proteases em meio enriquecido com albumina como única fonte de nitrogênio (SILVA et al., 2012; DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). A regulação da expressão dessas proteínas em *C. tropicalis* envolvem um grupo de quatro genes *SAPT1* ó *SAPT4*, mas apenas o produto codificado pelo gene *SAPT1* foi isolado e bioquimicamente descrito até o momento (SYMERSKY; MONOD; FOUNDLING, 1997; SILVA et al., 2012).

Outro importante fator de virulência que confere aos microrganismos competência para invadir o epitélio do hospedeiro são as fosfolipases, enzimas com a capacidade de hidrolisar fosfolipídios de membrana (SCHALLER et al., 2005). Estudos conduzidos com isolados de *C. tropicalis* de diferentes sítios anatômicos demonstraram que a espécie produz baixos níveis de fosfolipases (GALAN-LADERO et al., 2010; JIANG et al., 2016), no entanto Deorukhkar e colaboradores (2014) descreveram a produção dessa enzima como principal fator de virulência na espécie. Este estudo observou a produção da fosfolipases em 58% dos isolados, dos quais a maior atividade enzimática foi evidenciada nas cepas identificadas a partir de swab vaginal e cultura de sangue (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014).

Grande parte das funções basais do metabolismo e da capacidade infecciosa dos fungos são mediadas por holoenzimas dependentes de ferro, logo o desenvolvimento de estratégias para obtenção desse metal de transição é de suma importância para a manutenção fúngica (MANNIS; MOSSER; BUCKLEY, 1994; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Em isolados de *C. tropicalis* uma das principais vias de obtenção de ferro está relacionada a produção e secreção de uma manoproteína de parede celular denominada -hemolisina que tem a capacidade de lisar eritrócitos e adquirir ferro do grupo heme da hemoglobina (FAVERO et al., 2014).

A produção de níveis elevados de α -hemolisina por *C. tropicalis* já foi demonstrada *in vitro* na presença de sangue de carneiro e humano sob diversas condições (NEGRI et al., 2010; FAVERO et al., 2011; DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014; TREVIÑO-RANGEL, et al., 2018). Complementar a ação das hemolisinas, acredita-se que o gene codificador da hemo-oxigenase (CtHMX1) está potencialmente relacionado com a absorção de ferro pelas células fúngicas (FRANÇA; FURLANETO-MAIA; FURLANETO, 2017).

Ao somatório desses fatores de virulência que regem a patogenicidade intrínseca a espécie *C. tropicalis*, incorpora-se o constante desenvolvimento de mecanismos de resistência a farmacoterapêutica disponível para o tratamento das afecções fúngicas. Estudos relatam um crescimento exponencial na frequência de isolados de *C. tropicalis* resistentes aos antifúngicos azólicos, principalmente ao fluconazol (ZUZA-ALVES; SILVA-ROCHA; CHAVES, 2017; DA MATTA; SOUZA; COLOMBO, 2017).

A resistência aos azólicos ocorre por meio de mecanismos como: o aumento dos níveis da enzima 14 α -lanosterol demetilase (Erg11p), produto do gene *ERG11*; regulação positiva de genes *MDR1* e *CDR1* que controlam o efluxo do fármaco; alterações na síntese de esteróis e diminuição da afinidade dos azólicos pelo alvo celular (LUPETTI et al., 2002; MARIE; WHITE, 2009; MORSCHHÄUSER, 2010, JIANG et al., 2013). As alterações na biossíntese do ergosterol mediadas pelos genes *ERG3*, *ERG6* e *ERG11*, também capacitam o isolado a apresentar resistência a classe dos polienos, fato preocupante uma vez que a anfotericina B é o terceiro antifúngico mais aplicado na prática clínica (LUPETTI et al., 2002; SENEVIRATNE et al., 2016).

1.6 Patogenia

Dada a frequência de isolamento e as altas taxas de mortalidade, *C. tropicalis* é considerado um importante patógeno oportunista, que além de apresentar notáveis fatores de virulência também se vale da predisposição do hospedeiro para desenvolver, por via endógena, quadros de infecções invasivas (KAM; XU, 2002; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Fatores predisponentes como o uso de antimicrobianos de largo espectro, tempo prolongado de internação, neutropenia, nutrição parenteral, sonda vesical, ventilação mecânica, cateter venoso central, imunossupressão, insuficiência renal, hemodiálise, lesões mucosas, quimioterapia, radioterapia e o uso de corticosteroides merecem destaque e grande

atenção durante o manejo clínico (KAM; XU, 2002; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PAPPAS et al., 2003; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

C. tropicalis já foi descrito como agente etiológico de infecções superficiais, mucosas, invasivas e disseminadas, sendo considerada de alta gravidade quando associada a um quadro de candidemia (KAM; XU, 2002; CHAI; DENNING; WARN, 2010).

A espécie foi descrita como parte da microbiota normal do sistema tegumentar e seus anexos, sendo raramente relacionada a acometimentos da pele, unha e pelos (KWOK et al., 1998; JAUTOVA et al., 2001; KAM; XU, 2002). No entanto, *C. tropicalis* é a segunda levedura mais isolada em casos de dermatite de contato por fraldas (assaduras), com taxa relativa de 7% (DORKO e al., 2003), esporadicamente causa abscessos subcutâneos (BENSON; ROTH; HICKS, 1987) e, quando associada a casos de ictiose lamelar, apresentam um grave prognóstico (MURGU et al., 2017).

O gênero *Candida* também compõe a microbiota da cavidade oral de humanos, com prevalência de colonização de 35%, dos quais, a espécie *C. tropicalis* é responsável por 16% (MARTIN; WILKINSON, 1983; LUQUE et al., 2009). Elevações nessas taxas são observadas em indivíduos que fazem uso de prótese dentária (ABBEELE et al., 2008), indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (TUMBARELLO et al., 1996; COSTA et al., 2006; CHARONE et al., 2017), e em pacientes oncológicos em tratamento radioterápico (LEUNG et al., 2000; THAWEBON et al., 2008). Candidíase oral, orofaríngea e esofágica causadas por *C. tropicalis* são raras, mas ocorre em cerca de 3-8% dos pacientes com aids, especialmente aqueles com doença recorrente (TUMBARELLO et al., 1996; RIBEIRO et al., 2015).

Infecções vaginais por *C. albicans* são responsáveis por 80-90% dos casos de vulvovaginite (CVV) (HOLLAND et al., 2003; YANG et al., 2003; RICHTER et al., 2005). Entretanto, *C. tropicalis* está correlacionada entre 1% a mais de 10% dos CVV (PARAZZINI et al., 2000; RICHTER et al., 2005) e pode estar associada a infecções de repetição, bem como a casos de falência na terapia primária, especialmente após automedicação (HOROWITZ; EDELSTEIN; LIPPMAN, 1985).

Infecções do trato urinário por *Candida*, pode ser encontrada em até 2% de indivíduos assintomáticos (RIVETT; PERRY; COHEN, 1986; FISHER; NEWMAN; SOBEL, 1995). A maioria dos casos de candidúria é causada por *C. albicans* (51,8%), mas uma proporção significativa, de mais de 10%, é ocasionada por *C. tropicalis* (FRASER et al., 1992; SOBEL et al., 2000; NEGRI et al., 2012; NEGRI et al., 2015). A incidência de *C. tropicalis* em trato urinário é variável e apresenta taxas elevadas e significativas em pacientes com sepse fúngica

(CHAKRABARTI; REDDY; SINGHI, 1997; PAUL et al., 2004). Um aumento da incidência de candidúria é visto em pacientes imunocomprometidos diagnosticados com diabetes *mellitus* (STAPLETON, 2002) e malignidades hematológicas (RIVETT; PERRY; COHEN, 1986; NEGRI et al., 2015).

Quindós e colaboradores (2014) evidenciaram que 70% a 80% dos pacientes neutropênicos colonizados por *C. tropicalis* podem eventualmente desenvolver infecção invasiva (WINGARD, 1995; QUINDÓS et al., 2014; ALP et al., 2015). Casos de infecções invasivas e disseminadas, promovidas por *C. tropicalis*, apresentam taxa de mortalidade entre 40 e 70% quando associadas a fungemias (LEUNG et al., 2002; TORTORANO et al., 2002; YAP et al., 2009; NEGRI et al., 2012; CHEN et al., 2014). Nos casos de sepse por *C. tropicalis*, observa-se um tempo de hospitalização em UTI superior aos eventos de candidemia por *C. albicans*, o que eleva a probabilidade de óbito. Identificação tardia em hemoculturas também é considerado fato agravante (MILLER; MEJICANO, 2001; NEPPELENBROEK et al., 2013).

A infecção disseminada por *C. tropicalis* tem apresentação semelhante a candidemias ocasionadas por outras espécies do gênero, onde febre e leucocitose seriam os principais indícios clínicos. Esse quadro também pode ser observado nos processos infecciosos em órgãos isolados, uma vez que as infecções focais, certamente são oriundas da disseminação por via hematogênica de acometimentos primários. A osteomielite vertebral associada à *Candida* é um exemplo do processo de disseminação, onde 19% dos casos são atribuídos à *C. tropicalis* (MILLER; MEJICANO, 2001). Já manifestações dermatológicas de candidíase disseminada causada por *C. tropicalis* demonstram sintomas que variam de erupções nodulopapulares na pele a lesões necróticas, na maioria dos casos é possível chegar a um diagnóstico por histologia e cultura da lesão (WOLFSON; SOBER; RUBIN, 1985; FRASER et al., 1992).

A candidíase crônica disseminada representa uma forma distinta de infecção disseminada com envolvimento predominante do fígado, baço e rim, ocasionalmente ocorre em pacientes com neutropenias leucêmicas associadas à quimioterapia (FRASER et al., 1992). Um caso específico de candidíase crônica são as infecções associadas à fibrose cística, na qual *C. tropicalis* é a CNA mais relacionada (GARCZEWSKA et al., 2016).

Infecções nosocomiais por *C. tropicalis* estão associadas a origem endógena e em menor frequência a contaminação cruzada de pacientes por profissionais de saúde. Casos de candidúria por *C. tropicalis* dentro de uma UTI, foram atribuídos, epidemiologicamente, à

contaminação ambiental devido ao descarte inadequado de resíduos médico-hospitalares (JANG et al., 2005; GUINEA et al., 2014).

A predominância de candidemias nosocomiais por *C. tropicalis* foi demonstrada em casos avaliados em Singapura e no Canadá (CHAI et al., 2007; ÁSMUNDSDÓTTIR et al., 2008). Dentro de unidades de cuidados neonatais/pediátricos intensivos, os surtos de infecções hematogênicas por *C. tropicalis* são um motivo de preocupação. Um controle rigoroso de boas práticas em unidades hospitalares pode em alguns casos evitar a ocorrência de surtos. Estes dados sugerem claramente o potencial de transmissão de *C. tropicalis* dentro do ambiente hospitalar (ROILIDES et al., 2003; CHOWDHARY et al., 2003; ROILIDES et al., 2004).

1.7 Diagnóstico Laboratorial

Infecções invasivas por *Candida* spp. apresentam significativas taxas de morbimortalidade e elevado custo socioeconômico, dessa forma é de suma importância a realização de um diagnóstico rápido e preciso que permita a escolha da farmacoterapia apropriada (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

O diagnóstico clínico das candidíases invasivas, com base na sintomatologia e anamnese do paciente é inespecífico (BLOT et al., 2002). Assim, é fundamental a confirmação laboratorial da infecção por isolamento e identificação de seu agente etiológico. As metodologias clássicas de identificação de leveduras patogênicas envolvem a caracterização morfológica e bioquímica do microrganismo a partir de testes como: avaliação da produção de tubo germinativo, microcultivo em ágar *Cornmeal-tween* 80, auxanograma (avaliação da capacidade de assimilação de diferentes carboidratos ou de diferentes fontes de nitrogênio) e zimograma (avaliação da capacidade de fermentação dos carboidratos). Essas metodologias, apesar de laboriosas e de demandarem muito tempo de análise, ainda são consideradas de referência em todo o mundo (LACAZ et al., 2002; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Na busca de realizar investigações cada vez mais rápidas e eficientes tornou-se padrão a realização dos exames microscópicos, uma importante ferramenta de triagem na avaliação de quadros infecciosos fúngicos. As avaliações microscópicas diretas do material biológico podem ser realizadas a fresco, após tratamento da amostra com hidróxido de potássio ou após coloração pelas metodologias de Gram, Giemsa, hematoxilina eosina e ácido periódico de

Schiff. A visualização direta do agente etiológico permite um direcionamento preliminar para o manejo clínico do paciente (KOTHAVADE et al., 2010).

Comercialmente, meios seletivos e indicadores como CHROMagar® Candida (BD Difco), Candida® ID2 (bioMérieux), Hicrome® Candida (HiMedia) estão disponíveis para a rotina de identificação presuntiva de espécies do gênero *Candida* e para auxiliar a identificação de culturas mistas. Com base na inclusão de substrato cromogênico no meio e na atividade da enzima α -glucosaminidase do isolado, o teste avalia a morfologia e a pigmentação das colônias, mas apresenta espectro limitado de identificação. Os meios cromógenos permitem a identificação das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, que produzem, respectivamente, colorações de verde claro a verde médio; azul esverdeado a azul metálico; e cor de rosa claro com aspecto seco e rebordo esbranquiçado. Porém, outras espécies de CNA não assumem coloração específicas (ODDS; BERNAERTS, 1994; FREYDIÈRE; BUCHAILLE; GILLE, 1997; COOKE et al., 2002; YUCESAY; OZTEK; MAROL, 2005; HOSPENTHAL et al., 2006; OZCAN et al., 2010).

Sistemas automatizados e semi-automatizados de identificação fenotípica também já são utilizados em larga escala. Esses sistemas funcionam baseados nos mesmos princípios da metodologia clássica, que avalia a capacidade assimilativa e a expressão de enzimas específicas (FREYDIÈRE et al., 2001; ELLEPOLA; MORRISON, 2005). As principais ferramentas de identificação rápida de leveduras utilizadas pelos laboratórios de microbiologia são API® 20 C AUX, Vitek® 2, RapID Yeast® Plus. Dentre esses, o sistema automatizado Vitek® 2 (bioMérieux) se destaca devido a sua amplitude de 46 testes disponíveis no cartão de identificação de leveduras Vitek® 2 YST Card que compreende testes de assimilação de carboidratos, ácidos orgânicos e nitrogênio, detecção de oxidases, arilamidases e enzimas hidrolíticas como urease e fosfatase (HATA et al., 2007).

Nos últimos anos, foram desenvolvidos inúmeras metodologias na busca de otimizar o diagnóstico das infecções fúngicas e a identificação de leveduras patogênicas do gênero *Candida*, dentre elas importantes resultados foram observados na aplicação de testes sorológicos com base em metodologias imunoenzimáticas diretas e indiretas (PONTON; PALACIO, 2007), nas determinações das concentrações séricas de $\alpha(1-3)$ -D-glucanas (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2005), e na aplicação da espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) baseada na relação massa/carga de proteínas como ferramenta analítica de identificação dos agentes etiológicos (MADOLNATO et al., 2018).

Entretanto, os métodos fenotípicos, disponíveis na rotina laboratorial para identificação de leveduras do gênero *Candida* não fornecem dados suficientes, que permitam

a identificação precisa de espécies emergentes ou espécies filogenéticas morfologicamente indiscerníveis presentes dentro das espécies taxonômicas, denominadas como espécies crípticas. Portanto torna-se necessária a realização de metodologias moleculares para a confirmação da identificação (LOCKHART et al., 2007; BALASUNDARAM et al., 2015; CRISEO; SCORDINO; ROMEO, 2015; MOHD TAP et al., 2018). Os métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) aplicados no estudo da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal são hoje importantes instrumentos no diagnóstico laboratorial de infecções fúngicas invasivas que demonstram significativos valores de sensibilidade e especificidade (HEELAN et al., 1998; NEPPELENBROEK et al., 2013; DAEF et al., 2014; FATIMA et al., 2017).

1.8 Epidemiologia molecular

O desenvolvimento de novas tecnologias moleculares permitiu a evolução dos estudos epidemiológicos e a introdução formal do conceito de epidemiologia molecular em 1982. Com foco na definição, identificação, e monitorização de espécies, subespécies e estirpes patogênicas relevantes, por meio de tecnologia molecular, os estudos epidemiológicos permitiram o refinamento da forma como são investigadas as vias mecanicistas das relações entre exposição e doença (PERERA; HERBSTMAN, 2008).

Por sua vez, a identificação e a avaliação da diversidade genética de isolados clínicos é vital para a compreensão dos aspectos epidemiológicos das infecções nosocomiais pelo gênero *Candida* (KLEINEGGER et al., 1996).

Estudos vêm sendo realizados, por meio da avaliação da variação genética na região do espaço de transcrição interna (ITS) do DNA ribossomal (rDNA) em diversos fungos (CIARDO et al., 2010). Contudo, o número de polimorfismos da sequência ITS nas várias espécies do gênero *Candida* e suas associações com fontes de infecções fúngicas invasivas continuam sendo pouco investigadas (MERSEGUEL et al., 2015).

Em estudo recente, Merseguel e colaboradores (2015) avaliaram a diversidade genética intra e interespecíficas em isolados do gênero *Candida* obtidos de pacientes com candidíase disseminada. A presença de diversos polimorfismos intraespecíficos na região ITS foram determinados e agrupados em haplótipos com base em análises filogenéticas *bayesiana*. A análise do polimorfismo por sequenciamento da região ITS do rDNA demonstrou ser um bom marcador genético para identificação de espécies, assim como para determinar as

relações filogenéticas entre as espécies de importância médica do gênero *Candida* (MERSEGUEL et al., 2015).

Metodologias de tipagem baseadas em técnicas de PCR para *C. tropicalis*, como por exemplo, amplificação de polimorfismos randômicos no DNA (RAPD) também estão disponíveis (LIN; LEHMANN, 1995; STEFFAN et al., 1997), mas não demonstram reprodutibilidade intra e interlaboratoriais. Variações no padrão de bandas nesses estudos podem ter sido gerados por uma multiplicidade de fatores, como diferentes concentrações de iniciadores e condições de replicação. Já a utilização da eletroforese em gel com campo pulsado (PFGE) permite a tipagem de *C. tropicalis* por cariotipagem eletroforética (DOEBBELING et al., 1993; ESPINEL-INGROFF et al., 1996), entretanto muitos cromossomos dessa espécie são de tamanho semelhante e aparecem como uma grande banda complexa (ESPINEL-INGROFF et al., 1999), e de baixa resolução. Essa metodologia é fastidiosa e custosa, não sendo aplicável em laboratórios de rotina clínica.

Outra ferramenta já descrita é a utilização de tipagem por sequenciamento de regiões multilocus (MLST) (BOUGNOUX; MORAND; D'ENFERT, 2002). A aplicação desse instrumento na tipagem de leveduras do gênero *Candida* envolve o estudo dos genes *ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*, que após amplificados e sequenciados devem ser analisados no software mlstdbNet (<http://pubmlst.org/ctropicalis/>) (CHOU et al., 2007; MAGRI et al., 2013). As investigações multilocus sugerem que isolados de *C. tropicalis* podem ser agrupados em clados com base em tipos de sequências diplóides (DST), sendo que a diversidade de DSTs observadas na espécie *C. tropicalis* é maior do que se relatou até o momento em *C. albicans* e *C. glabrata* (TAVANTI et al., 2005a; CHOU et al., 2007; FAN et al., 2014; WU et al., 2014). Entretanto, o MLST é uma metodologia de custo elevado, devido a necessidade de sequenciamento de diversos genes para obtenção da tipagem dos isolados.

Estudos realizados por Ásmundsdóttir e colaboradores (2008) relatam o caráter discriminatório dos iniciadores (*primers*): T3B (*primer* universal), M13 (*primer* minissatélite) e (GACA)₄ (*primer* microssatélite). O iniciador M13 tem o maior poder de discriminação entre isolados de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, enquanto o (GACA)₄ entre isolados de *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Essas metodologias foram reprodutíveis e o isolado de referência (*Candida albicans* ATCC 90028) apresentou perfis consistentes para o DNA *fingerprinting* utilizando os três marcadores.

No estudo realizado por Ásmundsdóttir e colaboradores (2008) o principal foco foi a determinação da epidemiologia molecular das fungemias causadas por *C. albicans* na unidade hospitalar avaliada, sendo possível revelar pela metodologia do minissatélite M13, 35

genótipos diferentes nos casos analisados. A técnica de DNA *fingerprinting* utilizando esses três marcadores revelou ser uma metodologia de grande poder discriminatório que proporcionou a avaliação da variabilidade genética intra e interespecífica nas diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida* analisadas.

Esses autores já demonstravam a utilização dessas metodologias de tipagem em outros estudos de investigação de surtos nosocomiais, com bons resultados como descrito por Marco e colaboradores (1999). Alguns trabalhos relatam que cepas fúngicas únicas foram responsáveis por um grande número de casos de candidemia em unidades hospitalares (CHOWDHARY et al., 2003; CLARK et al., 2004; VIVIANI et al., 2006). Esses estudos demonstram a importância da utilização de métodos moleculares para a tipagem de espécies do gênero *Candida*, com a finalidade de viabilizar estudos dos surtos ou de casos de candidemia em unidades hospitalares (ÁSMUNSDÓTTIR et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Candida tropicalis é uma das espécies mais isoladas em casos de candidíase invasiva, com taxas que variam de 4% a 39% de todos os casos de candidemia, dependendo da área geográfica e condições predisponentes (MAGRI et al., 2013; DA MATTA et al., 2017). Nucci e Colombo (2007) em estudo multicêntrico, avaliaram 12 institutos de 10 cidades distintas, pertencentes a diferentes regiões do Brasil em dois períodos de tempo, e observaram uma proporção de candidemia causada por *C. tropicalis* que variou de 15,7% a 25,8% entre as instituições.

Estudos epidemiológicos realizados no país demonstram a alta frequência de isolamento de *C. tropicalis* em casos de candidemias. Em São Paulo, no período de 1995 a 2007, a frequência média descrita foi de 24,8% (DA MATTA et al., 2017), no Rio de Janeiro, nos períodos de 1995 a 1996 e 2002 a 2007, a frequência média foi de 17,2% (COLOMBO et al., 1999; NEUFELD et al., 2015), enquanto no Paraná, no período de 2006 a 2011, a frequência atingiu valor superior a 30% dos casos de candidemia (DA COSTA et al., 2014).

Acima dos valores reportados nos principais centros do Brasil, o Hospital Universitário, da Universidade Federal de Juiz de Fora, descreveu *C. tropicalis* como responsável por 32,3% dos casos de candidemia, no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2017. Nesse período também foi observado na unidade um aumento estimado de 26,4% nos casos de candidíase por *C. tropicalis*.

Dada a magnitude das frequências observadas, a identificação e a avaliação da diversidade genética dos isolados clínicos torna-se vital para compreensão dos aspectos epidemiológicos das infecções (KLEINEGGER et al., 1996). A tipagem dos isolados clínicos pode auxiliar na avaliação dos quadros infecciosos e na determinação do número de subtipos envolvidos, além de permitir a avaliação da introdução ou seleção de cepas mais resistentes durante o curso das terapias (PFALLER et al., 1994; ESPINEL-INGROFF et al., 1996).

Métodos de tipagem a nível molecular têm sido amplamente utilizados na identificação de fontes de infecção baseando-se na observação da relação genotípica entre isolados clínicos envolvidos em surtos epidêmicos com cepas obtidas de possíveis focos infectantes. Tais métodos, já foram aplicados em inquéritos envolvendo outras espécies do gênero *Candida*, como por exemplo, no complexo *Candida parapsilosis*. Mas, ainda existe uma lacuna quanto à aplicação dessas metodologias de tipagem em isolados de *C. tropicalis*, no Brasil, particularmente em unidades hospitalares.

O principal método de tipagem molecular empregado para determinar a epidemiologia molecular de leveduras do gênero *Candida* é o MLST, o qual distingue os isolados com base em polimorfismos de nucleotídeos de fragmentos de genes (BOUGNOUX; MORAND; D'ENFERT, 2002). O sistema MLST para *C. tropicalis*, recomendado por Tavanti e colaboradores (2005b), envolve a avaliação de seis genes constitutivos (*ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a*), fato que eleva o custo de aplicação do método e inviabiliza seu uso na rotina laboratorial.

Frente a limitação, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos que empreguem ferramentas moleculares de menor custo que permitam avaliar a diversidade genética dos isolados clínicos de *C. tropicalis*, elucidar aspectos epidemiológicos, identificar correlações clínicas e contribuir para desenvolvimento de políticas de saúde com foco na redução das taxas de morbimortalidade das infecções causadas por *C. tropicalis*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a epidemiologia molecular e os aspectos clínicos de infecções por *Candida tropicalis* em Hospital Universitário de Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as espécies do gênero *Candida*, identificadas previamente por métodos fenotípicos como sugestivas de *C. tropicalis*, pela realização de taxonomia polifásica;
- Avaliar a variabilidade intraespecífica da região ITS1-5.8S-ITS2 nos isolados de *C. tropicalis*;
- Caracterizar os genótipos envolvidos nos casos de candidíase nessa unidade hospitalar;
- Comparar a capacidade discriminatória dos métodos moleculares empregados;
- Associar os resultados dos métodos moleculares aos aspectos clínicos das infecções por *C. tropicalis*;
- Determinar o perfil epidemiológico das infecções com base nos aspectos genotípicos do agente etiológico.

4 MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

Estudo longitudinal que aplica métodos de epidemiologia molecular em isolados clínicos de *C. tropicalis* do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU/UFJF), Minas Gerais, no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2017.

4.2 Cálculo do tamanho amostral

O estudo incluiu todos os isolados de *C. tropicalis* viáveis, identificados como agente etiológico de quadros infecciosos no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2017, no HU/UFJF.

4.3 Casuística

Foram incluídos no estudo 110 isolados clínicos oriundos de episódios de candidíase, presuntivamente causados por *C. tropicalis*, em pacientes internados nas enfermarias (masculina, feminina, pediátrica), na Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) e no Centro de Terapia Intensiva (CTI) do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2017.

Os isolados foram obtidos de amostras, como: ponta de cateter, sangue, urina, trato respiratório, líquido ascítico, bile, secreções e abscessos. Identificados por metodologia convencional e, posteriormente, armazenados em meio infusão de cérebro e coração (BHI) suplementado com 30% glicerol à -70°C (WFCC, 2010) no acervo de fungos do Laboratório de Análises Clínicas Professor Maurílio Baldi.

Um fluxograma dos protocolos das metodologias empregadas nesse estudo está disponível na **Figura 1**, após a descrição de todas as metodologias empregadas na pesquisa.

4.4 Cepas de Referência

As cepas de *C. albicans* (ATCC 18804), *C. tropicalis* (ATCC 13803), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foram utilizadas como padrão de referência para CHROMagar[®] *Candida*, bem como as cepas de *C. tropicalis* (ATCC 13803, ATCC

28707 e ATCC 750) foram utilizadas como padrão de referência para o Sistema Vitek[®] 2 YST Card e nos estudos de tipagem molecular.

As cepas de referências supracitadas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde ó Fundação Oswaldo Cruz (INCQS-FIOCRUZ).

4.5 Confirmação Fenotípica

4.5.1 Reisolamento e identificação em meio cromogênico

Os isolados de *C. tropicalis* estocados a -70°C foram semeados pela técnica de esgotamento em placa de Petri (90 mm) contendo Sabouraud dextrose ágar (SDA) (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA). As placas foram incubadas a 35°C por 24-72 horas para avaliação da viabilidade e obtenção de colônia única (WFCC, 2010).

Após o crescimento das colônias selecionadas em SDA (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) em tubo de ensaio (12 x 150 mm) com tampa de rosca mantido à temperatura de 35°C por 24 horas, foi preparada, com o auxílio de uma alça de semeadura de 10 μL , uma suspensão homogênea da levedura em solução salina 0,9%, equivalente ao padrão n^o 1 da escala de McFarland. A densidade óptica da suspensão foi verificada por um densitômetro (DensiCheck[™], bioMerieux). Em seguida, uma alíquota de 1 μL dessa suspensão foi semeada pela técnica de esgotamento em placas de Petri (90 mm) contendo CHROMagar[®] *Candida* (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA). As placas foram incubadas a 35°C por 48-72 horas para avaliação de pureza e características cromogêneas.

A interpretação dos resultados foi baseada na observação macroscópica das colônias em SDA, e de acordo com as orientações do fabricante para o CHROMagar[®] *Candida*, assim sendo: colônias verde-claro a verde médio, *C. albicans*; colônias azuis acinzentadas, cinzentas-azuladas a azuis esverdeadas ou azuis metalizadas com ou sem halos violetas no meio circundante, *C. tropicalis*; colônias planas de grande dimensão, cor-de-rosa claro a vermelho claro com um rebordo esbraquiçado, *C. krusei*; e cores inespecíficas, demais espécies.

4.5.2 Avaliação das características macromorfológicas

As características macromorfológicas foram avaliadas após o crescimento em meio SDA (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) à temperatura de 35°C por 24 horas. Foi preparada, com o auxílio de uma alça de semeadura de 10 µL, uma suspensão homogênea da levedura em solução salina 0,9%, equivalente ao padrão n° 1 da escala de McFarland. A densidade óptica da suspensão foi verificada por um densitômetro (DensiCheck™, bioMérieux). Em seguida, uma alíquota de 1 µL dessa suspensão foi semeada em SDA (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) pela técnica de esgotamento em placas de Petri (90 mm). Todas as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas, e a interpretação dos resultados foi realizada por avaliação visual com base nas características macroscópicas tais como: margem, elevação, forma e aspecto baseados em perfis adaptados de Moralez e colaboradores (2014).

4.5.3 Identificação bioquímica: Sistema Vitek® 2 YST Card

Após crescimento em SDA em tubos de ensaio mantidos à temperatura de 35°C por 24 horas, foi preparada, com auxílio de uma alça de semeadura de 10 µL, uma suspensão homogênea da levedura em 3 mL de salina estéril a 0,45% em tubos de ensaio de poliestireno transparente (10 x 75 mm). A densidade óptica dessa suspensão foi verificada por um densitômetro (DensiCheck™, bioMérieux) e ajustada para o padrão n° 2 da escala de McFarland. Os tubos contendo a suspensão e os cartões de identificação de leveduras YST Card (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France) foram dispostos em estante própria e inseridos no primeiro compartimento do aparelho com o objetivo de a suspensão de levedura ser distribuída entre os poços do cartão. Em seguida, a estante foi inserida ao segundo compartimento do equipamento para a realização das etapas de selagem, incubação a 35,5°C por um período de aproximadamente 18 horas e leitura do cartão (HATA et al., 2007). A similaridade entre os perfis bioquímicos foi analisada pelo programa NTSYSpc versão 2.0.

4.5.4 Preservação dos isolados clínicos

Realizada a confirmação fenotípica, os isolados clínicos foram semeados em tubos de ensaio (20 x 200 mm) contendo potato dextrose ágar (PDA) (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) e incubados a 35°C por 24-48 horas para obtenção de massa celular. Em

seguida, duas metodologias de preservação com crioprotetores distintos foram utilizadas: *Skim Milk* a 20% (Fluka Analytical, SigmaAldrich, St Louis, USA) e BHI (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) acrescido de 30% de glicerol. Foram adicionados 5 mL de cada meio crioprotetor em diferentes tubos de PDA e homogeneizado por pipetagem. Alíquotas de 1 mL desta suspensão de leveduras foram distribuídas em criotubos de 2,0 mL e mantidas à temperatura de -20°C e -70°C, respectivamente, para posterior cultivo e extração de DNA.

4.6 Identificação Molecular

4.6.1 Extração do DNA genômico

Para a extração do ácido desoxirribonucleico (DNA), os isolados foram semeados em placas de Petri (90 mm) contendo o meio SDA e após crescimento a 35°C por 48 horas apenas uma colônia foi selecionada para obtenção de massa celular. A colônia selecionada foi semeada no mesmo meio de cultura com incubação *overnight* a 35°C. O DNA genômico da levedura foi extraído utilizando o kit *Gentra® Puregene® Yeast and Gram positive Bacteria* (Qiagen®, Maryland, USA) de acordo com as instruções do fabricante e quantificado por espectrofotometria (NanoVue Plus™ GE Healthcare). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão 1X TBE (0,1 M Tris-HCl pH 8,4; 0,09 M de ácido bórico; 0,001 M EDTA) por aproximadamente 1 hora a 90 V. A seguir, o gel foi submerso numa solução de brometo de etídio (Invitrogen™, Carlsbad, CA USA) a uma concentração final de 0,5 µg/mL por 30 minutos e as bandas observadas sob luz ultravioleta (UV) de um transiluminador (HOEFER®, MacroVue UV-20).

4.6.2 Amplificação e Sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA

A reação de amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 100 ng do DNA, 1X tampão da PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂; Invitrogen™ Brasil), 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP; Invitrogen™ Carlsbad, CA, EUA), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen™ Brasil), e 25 ng/ µL de cada *primer* (Invitrogen™ Brasil) SR6R (5'∅AAGTATAAGTCGTAACAAGG-3'∅) e LR1 (5'∅GGTTGGTTTCTTTTCCT-3'∅) (IRINYI et al., 2015). A PCR foi realizada em um termociclador Bio Rad (modelo C 1000) com um

ciclo inicial de 60 segundos de desnaturação a 94°C; 30 ciclos com 60 segundos de desnaturação a 94°C, 55 segundos de pareamento a 50°C e extensão de 45 segundos a 72°C; seguido de uma extensão final de 420 segundos a 72°C. O produto amplificado obtido foi purificado com o QIAquick® PCR *Purification Kit* (QIAGEN®) de acordo com instruções do fabricante e posteriormente enviado à Plataforma de Sequenciamento Genômico PDTIS/Fiocruz que utilizou o sequenciador ABI-3730 (Applied Biosystems) e kit comercial *Big Dye Terminator Sequencing* (Applied Biosystems) para realizar a reação de sequenciamento das fitas de DNA *sense* e *anti-sense*. As sequências obtidas foram editadas no programa Sequencher 4.9 (Genes Code Corporation, Ann Arbor, USA), o alinhamento e as análises filogenéticas foram realizados no software Mega X (KUMAR et al., 2018), e por fim, as sequências foram comparadas com as depositadas no banco de dados do NCBI/*GenBank*.

4.6.3 Análise da diversidade intraespecífica da região ITS1-5.8S-ITS2

O estudo da diversidade polimórfica intraespecífica da região ITS1-5.8S-ITS2 foi realizada no software *DnaSP* versão 5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009). A análise foi baseada no número de haplótipos, sítios variáveis, diversidade de haplótipos e diversidade de nucleotídeos. Os sítios com *õgapsõ* também foram considerados na análise. Para a construção da rede de haplótipos foi utilizado o software *Phyloviz* 2.0 e o software *SplitsTree* versão 4.14.8 (HUSON; BRYANT, 2006). A mesma análise de variabilidade intraespecífica da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal foi aplicado a um conjunto de 217 sequências de DNA de *C. tropicalis*, das quais 110 são os isolados clínicos do estudo e as demais sequências obtidas de forma randômica no banco de dados do NCBI/*GenBank*.

4.6.4 DNA *õFingerprintingõ*: *primer* M13

A sequência do fago do tipo selvagem - M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT- 3') capaz de detectar regiões repetitivas hipervariáveis (minissatélites) em eucariotos foi usada como *õprimerõ* na reação da PCR (VASSART et al., 1987). A reação em cadeia de polimerase foi realizada em um volume de 50 µL contendo 25 ng de DNA genômico, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen. Inc.), 3 mM de acetato de magnésio, 30 ng de *õprimerõ*, e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen™ Brasil). A reação foi realizada em um termociclador Bio Rad (modelo C 1000) com 35 ciclos com 20 segundos de desnaturação a 94°C; 60 segundos de hibridização dos *õprimersõ* a 50°C;

e 20 segundos de extensão a 72°C; seguido de uma extensão final de 360 segundos a 72°C. Os produtos de amplificação foram concentrados em aproximadamente 50% e submetidos a eletroforese em géis de agarose 1,4% (corados com brometo de etídio, a 10 mg/μL) em tampão (TBE) 1X - Tris-borato-EDTA a 5 V/cm e observados sob luz UV. Todas as bandas visíveis foram incluídas na análise, independente da sua intensidade. Os perfis DNA *fingerprinting* obtidos com o *primer* M13 foram analisados no programa NTSYSpc versão 2.0.

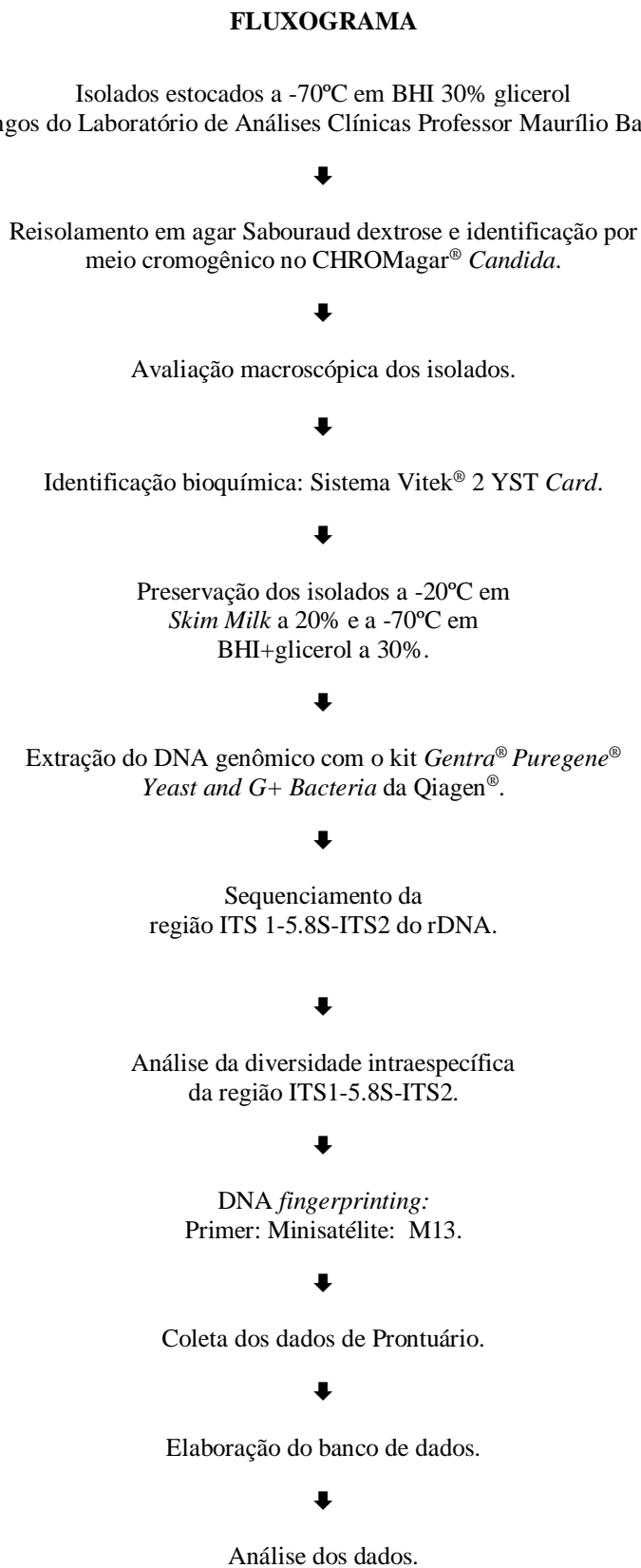
4.7 Coleta dos dados de prontuário

A pesquisa de informações nos prontuários foi pautada em análises retrospectivas dos dados de pacientes que obtiveram diagnóstico de candidíase por *Candida tropicalis* no HU/UFJF e que tinham o isolado estocado no acervo da unidade. A coleta de dados constituiu-se na busca de informações sócio demográficas, doenças de bases e associadas e dos aspectos clínicos e farmacoterapêutico, bem como fatores predisponentes envolvidos no quadro de candidíase.

4.8 Plano de análise

As informações coletadas na pesquisa foram inseridas em um banco de dados elaborado na plataforma Research Electronic Data Capture (REDCap) (HARRIS et al., 2009), que foi também usada para controle de qualidade e gerenciamento dos dados. Os dados do REDCap foram exportados para análise em ambiente R (R CORE TEAM, 2013). Realizou-se inicialmente um teste de normalidade para verificar se as variáveis seguem distribuição normal ou assimétrica. Nas análises bivariadas que envolvem variáveis quantitativas foi usado o teste *t* para variáveis com distribuição normal e o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para casos de distribuição assimétrica. Dados categóricos foram analisados usando o teste exato de Fisher. As análises de sobrevida foram realizadas por meio do teste de Kaplan Meier e o risco atribuído determinado por modelo de Cox. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de *p* foi menor do que 0,05. A sensibilidade dos métodos de identificação fenotípica foi determinada para um intervalo de confiança de 95%, e para a avaliação do grau de concordância entre as técnicas moleculares foi utilizado o coeficiente Kappa de acordo com a classificação de Landis e Koch (1977).

Figura 1: Fluxograma de metodologias empregadas no trabalho.



5 RESULTADOS

Um número de 110 isolados fúngicos, oriundos de episódios de candidíase que ocorreram no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2017, presuntivamente identificados como *Candida tropicalis*, por meio de metodologia convencional, foram incluídos no estudo.

Os isolados foram obtidos de diferentes sítios, como: sangue, ponta de cateter, amostras do trato respiratório, urina, líquido ascítico, bile, secreções e abscessos (**Tabela 1**).

Tabela 1: Sítios de isolamento dos 110 isolados fúngicos oriundos de episódios de candidíase que ocorreram no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2017, presuntivamente identificados como *Candida tropicalis*.

Sítios de Isolamento	Número Absoluto de Isolados	Percentual (%)
Sangue	24	22
Ponta de Cateter	9	8
Trato Respiratório	16	15
Urina	57	52
Outros*	4	3

*Outros: Líquido ascítico, bile, secreções e abscessos;

5.1 Confirmação Fenotípica

5.1.1 Re-isolamento e identificação em meio cromogênico

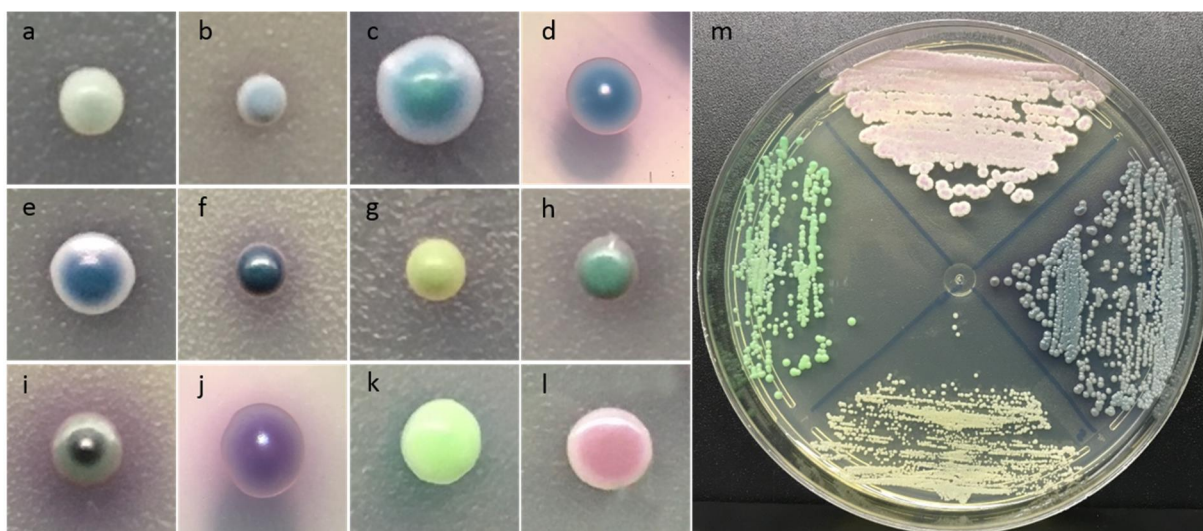
Todos os isolados, semeados em meio SDA, foram avaliados quanto a viabilidade e homogeneidade morfológica de crescimento das colônias. Uma vez confirmado que todos os isolados se apresentaram viáveis, foi selecionada uma única colônia de cada isolado que demonstrou crescimento homogêneo. As únicas exceções foram os isolados 41CT e 144CT que apresentaram crescimento heterogêneo. Ambos os isolados exibiram dois tipos de crescimento distintos em SDA. Para esses isolados foram selecionados um exemplar de cada tipo morfológico de colônia, denominadas 41CT / 41.1CT e 144CT / 144.1CT.

Em meio CHROMagar® *Candida* os isolados apresentaram colônias com 4 variações de pigmentação, sendo a coloração azul a mais frequente com 83,0% (93), seguido da cor verde com 15,2% (17) dos isolados e as cores roxo e rosa, cada uma com 0,9% (1).

De acordo com a **Figura 2** é possível observar que os isolados que assumiram uma pigmentação azul, sugestivamente identificados como *Candida tropicalis*, apresentaram 6 variações de tonalidade: (a) cinza-azulado, (b) azul acinzentado, (c) azul esverdeado, (d) azul,

(e) azul escuro e (f) azul metálico, todos com halo violeta no meio circundante. Os isolados de pigmentação verde variaram de (g) verde amarelado, (h) verde a (i) verde escuro de bordas brancas, colorações inespecíficas no meio CHROMagar® *Candida*. O isolado 41CT apresentou coloração (k) verde-clara, pigmentação indicativa de *Candida albicans*. Enquanto os isolados que exibiram colorações (j) roxo e (l) rosa também não puderam ser identificados pelo meio cromogênico, dada a não especificidade das cores.

Figura 2: Variantes de pigmentação das colônias em Chromagar® *Candida*.



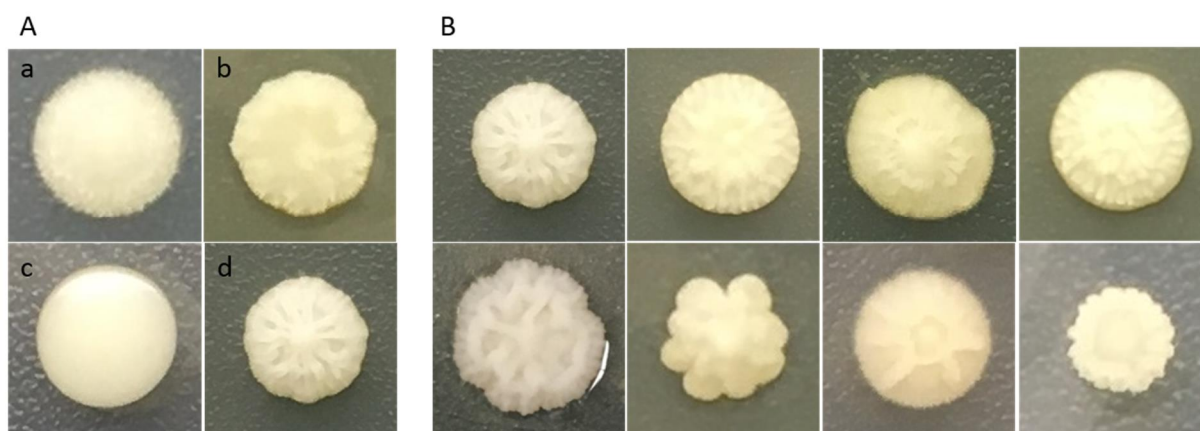
(a):Cinza azulado; (b):Azul acinzentado; (c):Azul esverdeado; (d):Azul; (e):Azul escuro; (f):Azul metálico; (g):Verde amarelado; (h):Verde; (i):Verde escuro de bordas brancas; (j):Roxo; (k):Verde claro; (l):Rosa; (m) no sentido horário a partir de 12 horas: *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC 18804.

5.1.2 Avaliação das Características Macromorfológicas

Em meio SDA foi avaliada a macromorfologia das colônias e observada uma variação de coloração de branco a creme com reverso incolor e pigmentação não difusível no ágar. Com base nas características de margem, elevação, forma e aspecto as colônias apresentaram 4 variantes morfológicas conforme descrito na **Figura 3A**.

A variante morfológica mais frequente foi a (a) cotonosa com 37,5% (42) dos isolados, seguido da variante (b) micelial com 25,9% (29), (c) lisa com 22,3% (25) e rugosa com 14,3% (16) dos isolados. Dentre os isolados que apresentaram macromorfologia rugosa foram observados 8 distintos perfis de rugosidade, com diferentes características de forma, aspecto e tamanho, conforme **Figura3B**.

Figura 3: Variantes morfológicas das colônias de *Candida tropicalis* em Sabouraud dextrose ágar.



A - (a):Cotonosa; (b):Micelial; (c):Lisa; (d):Rugosa; B ó Perfis de rugosidade, com diferentes características de forma, aspecto e tamanho apresentados pelos isolados classificados como rugosos.

5.1.3 Identificação bioquímica: Sistema Vitek® 2 YST Card

Todos os 112 isolados inseridos no estudo foram submetidos a avaliação bioquímica no sistema automatizado Vitek® 2 YST Card. Sendo 106 isolados identificados como *C. tropicalis* com taxa de probabilidade que variou de 93,0 a 99,0% e média do percentual de probabilidade de 98,8%, conforme **Tabela 2**.

Tabela 2: Caracterização bioquímica dos isolados fúngicos oriundos de episódios de candidíase que ocorreram no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2017, identificados como *Candida tropicalis* pelo sistema Vitek® 2 YST Card.

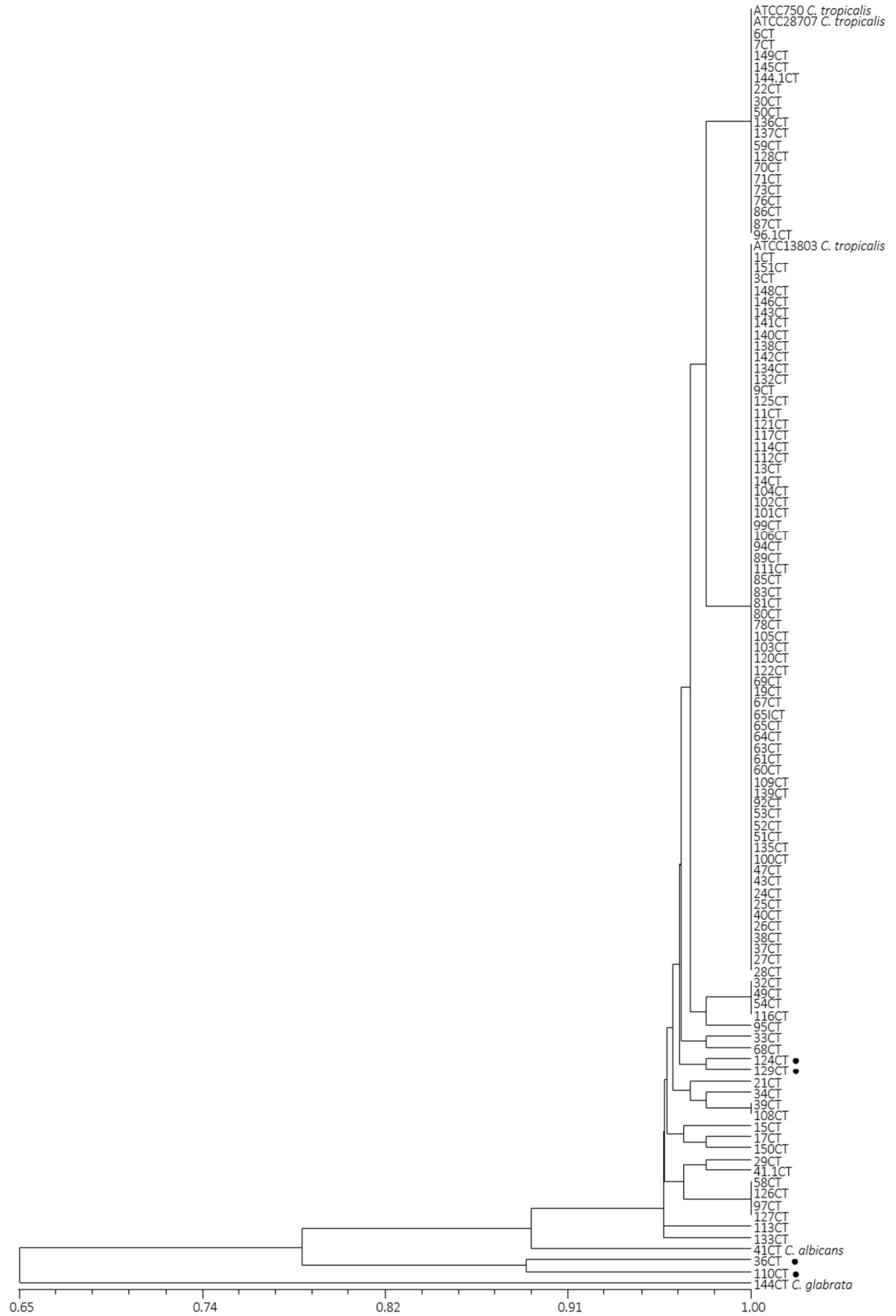
Método	n	Moda (%)	Mediana (%)	Média (%)	IC 95 (%)
Vitek® 2 YST Card	106	99,0	99,0	98,8	98,6 ó 99,0

IC, intervalo de confiança.

Dentre os demais isolados, 4 apresentaram baixa discriminação, mesmo após realização do teste em triplicata, 2 isolados apresentaram identificação distinta de *C. tropicalis* e foram excluídos das análises. O isolado 41CT foi identificado como *C. albicans* e o isolado 144CT identificado como *C. glabrata*, ambos com taxa de probabilidade de 99,0%.

Em análise de todos os 46 testes contidos no cartão YST Card foi gerado um dendrograma (**Figura 4**) onde foram observados 17 perfis bioquímicos distintos. Nesse dendrograma, os isolados que não foram identificados pelo sistema, encontram-se sinalizados e durante as análises correlativas, esses mesmos isolados foram agrupados em um décimo oitavo perfil.

Figura 4: Dendrograma baseado na análise dos perfis bioquímicos obtidos pelo Vitek® 2 YST Card.



A similaridade entre os perfis bioquímicos foi analisada pelo programa NTSYSpc version 2.0 com base no método UPGMA a partir da matriz de distância construída pelo coeficiente de similaridade de Rand. Os isolados assinalados com o símbolo • não foram identificados pelo sistema Vitek® 2 YST Card.

Os perfis em análise foram construídos com base na variação de 9 testes bioquímicos, incluindo os testes de assimilação de L-malato (IMLTa), metil- -D-glucopiranosídeo (MAdGa), D-celobiose (dCELa), xilitol (XLTa), L-arabinose (lARAA), D-galacturonato (dGATa), N-acetil-glucosamina (NAGa), e os testes de detecção de tirosina arilamidase (TyrA) e urease (URE), de acordo com a **Tabela 3**.

Tabela 3: Testes bioquímicos variáveis entre os perfis de 106 isolados clínicos identificados pelo sistema Vitek® 2 YST Card como *C. tropicalis*.

Perfil (P)	Nº de isolados	IMLTa	TyrA	MAdGa	dCELa	XLTa	URE	lARAA	dGATa	NAGa
P01	65	+	-	+	-	-	-	-	+	+
P02	19	+	-	+	-	+	-	-	+	+
P03	1	+	-	+	-	+	-	+	+	+
P04	1	+	-	-	-	+	-	-	+	+
P05	1	+	-	+	-	+	-	-	+	-
P06	4	+	-	+	-	-	-	-	+	-
P07	1	+	-	+	-	-	+	-	+	-
P08	1	+	-	+	-	+	+	-	+	+
P09	1	+	-	+	-	-	+	-	+	+
P10	1	+	+	+	-	+	-	-	+	+
P11	1	+	+	+	-	-	-	-	+	+
P12	1	+	-	+	+	-	-	-	+	+
P13	4	+	-	+	+	+	-	-	+	+
P14	1	-	-	+	-	+	-	-	+	+
P15	2	-	-	+	-	-	-	-	+	+
P16	1	-	-	+	+	-	-	-	+	+
P17	1	-	-	+	-	-	-	-	-	+

IMLTa, assimilação L-malato; TyrA, tirosina arilamidase; MAdGa, assimilação metil- -D-glucopiranosídeo; dCELa, assimilação D-celobiose; XLTa, assimilação xilitol; URE, detecção de urease; lARAA, assimilação L-arabinose; dGATa, assimilação D-galacturonato; NAGa, assimilação N-acetil-glucosamina;

As cepas de referência utilizadas como padrão na análise bioquímica foram classificadas em dois diferentes perfis. A cepa ATCC 13803 foi classificada dentro do perfil bioquímico 1, perfil de maior frequência dentre os isolados do estudo, enquanto as cepas ATCC 750 e ATCC 28707 foram classificadas dentro do perfil 2, segundo perfil mais frequente. A única diferença entre os perfis 1 e 2 está pautada na capacidade do isolado em assimilar xilitol (XLTa).

De acordo com a análise, os perfis 7, 8 e 9 exibiram o teste de detecção de urease (URE) positivo. Para confirmação da produção de urease, os isolados que compõem os perfis foram testados em duplicata por metodologia tradicional (CHRISTENSEN, 1946) e o resultado foi negativo para todos os isolados.

Dentre as variações bioquímicas, o perfil 3 foi o único capaz de assimilar L-arabinose (lARAA), os perfis 10 e 11 foram os únicos positivos para a detecção de tirosina arilamidase (TyrA), enquanto os perfis 12, 13 e 16 foram os únicos com a capacidade de assimilar D-

celobiose (dCELa). Já os perfis 4 e 7 foram os únicos perfis negativos para a assimilação de metil- β -D-glucopiranosídeo (MAdGa) e D-galacturonato (dGATa), respectivamente.

Em uma macroanálise dos testes fenotípicos é possível descrever a correspondência entre a identificação presuntiva em meio CHROMagar[®] *Candida* e a identificação bioquímica realizada pelo sistema Vitek[®] 2 YST Card. Dentre os 93 isolados que apresentaram coloração azul em meio cromogênico, 90 isolados foram identificados como *C. tropicalis*. Entretanto, foi possível observar incoerências na análise de 16 isolados, os quais assumiram cor verde inespecífica no meio de cultura, mas bioquimicamente foram identificados como *C. tropicalis* e na avaliação de 3 isolados que exibiram cor azul, mas o sistema Vitek[®] 2 YST Card não foi capaz de identificá-los.

Dos 110 isolados presuntivamente identificados como *C. tropicalis*, parte significativa exibiu morfologia micelial, coloração azul em meio cromogênico e perfil bioquímico 1 (18,2%), seguido dos isolados que exibiram morfologia cotonosa, coloração azul e perfil 1 (16,4%). Dentre os perfis bioquímicos, o perfil 1 foi o único que agrupou isolados de coloração azul e isolados de coloração verde que apresentaram as 4 variantes morfológicas observadas no estudo. Os isolados de coloração azul e perfil 2 também apresentaram todas as variantes morfológicas (**Figura 5**).

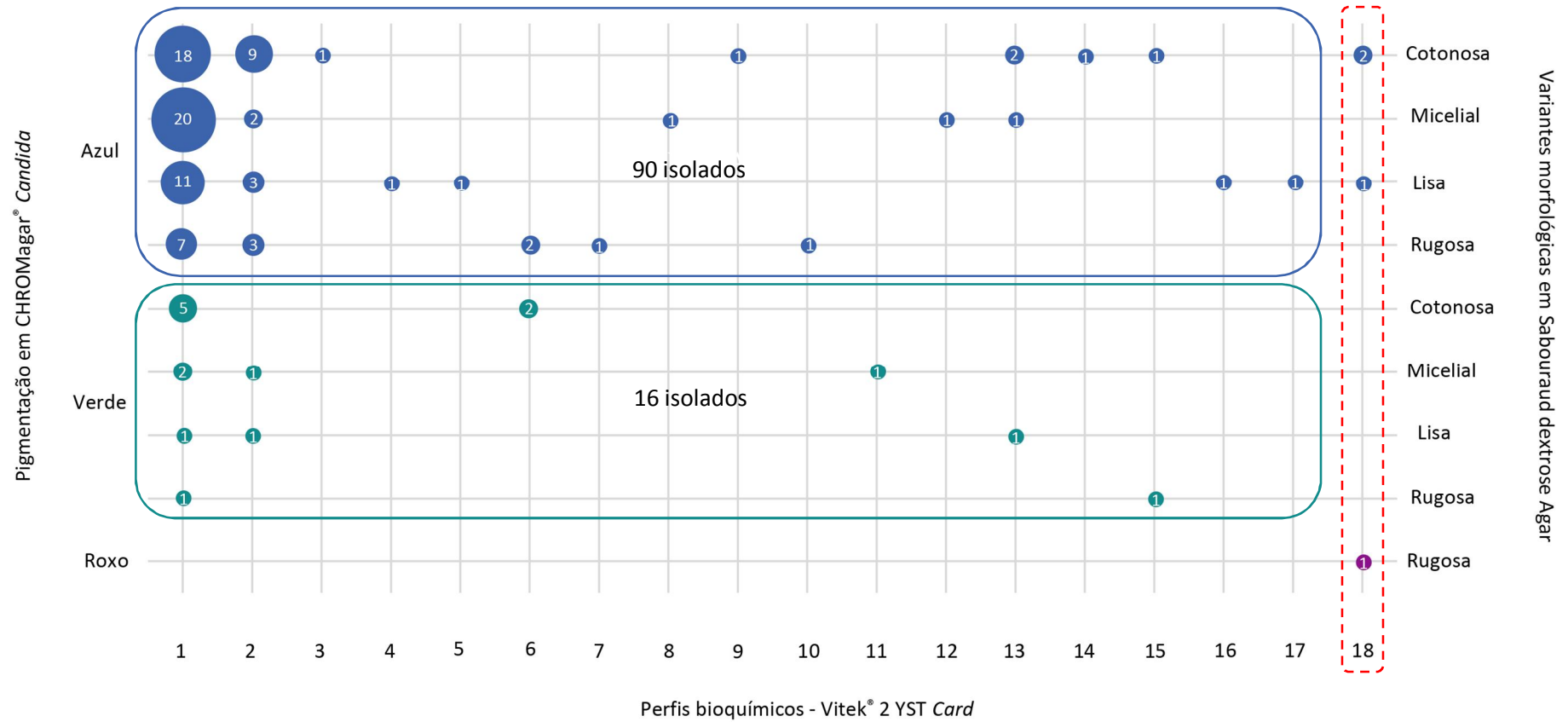
As correlações fenotípicas ainda permitem destacar a existência de 12 isolados que apresentaram uma combinação de características singulares. E cabe evidenciar o isolado de morfologia lisa e coloração roxa que manifestou perfil bioquímico que contradiz os perfis biológicos típicos de *C. tropicalis* devido a não assimilação de L-malato e citrato de sódio.

5.2 Identificação Molecular

5.2.1 Amplificação e Sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA

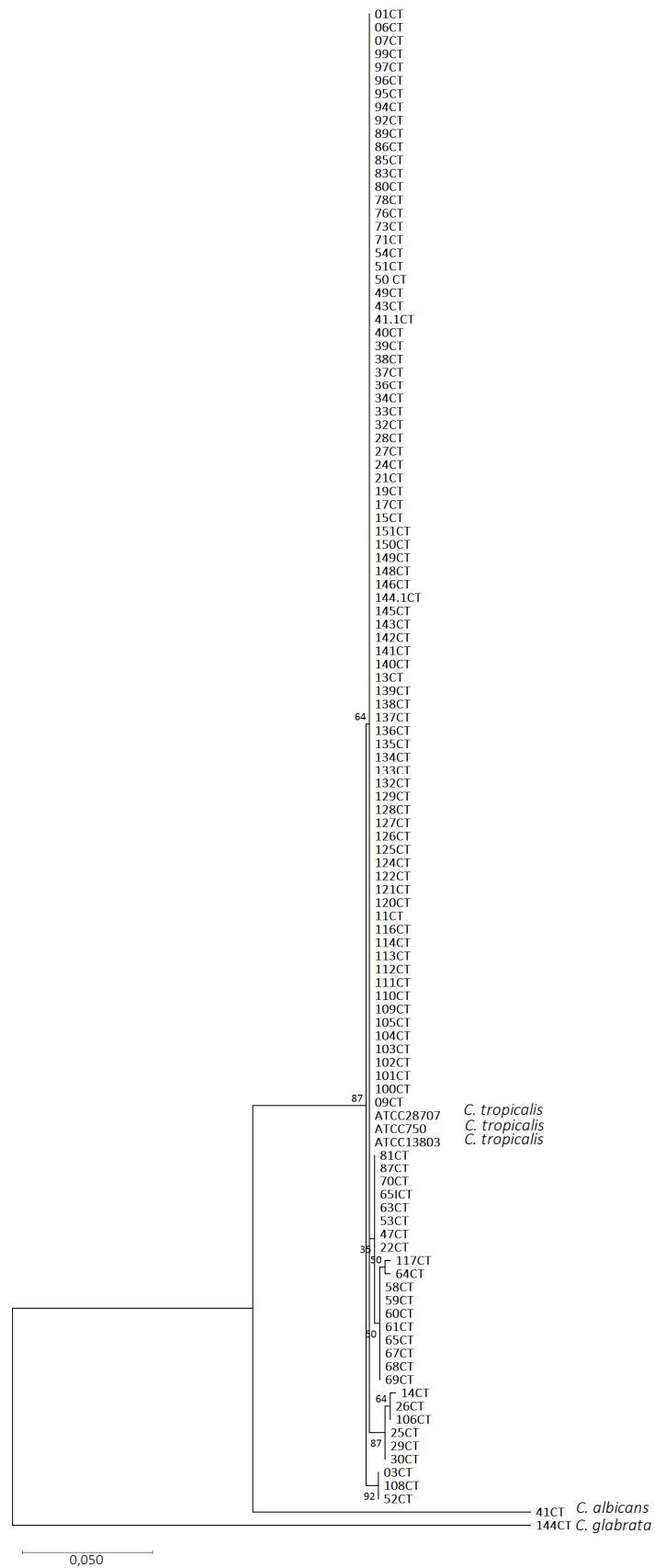
A identificação molecular dos isolados foi realizada pela amplificação e posterior sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal. Todos os 110 isolados foram identificados como *C. tropicalis*, com cobertura de consulta de 100% e percentual de identidade entre 99-100% quando comparados a sequência de referência de *C. tropicalis* KY102470.1 depositada no NCBI/GenBank. Os isolados 41CT e 144CT foram identificados como *C. albicans* e *C. glabrata*, respectivamente (**Figura 6**).

Figura 5: Análise de correlação entre os testes fenotípicos empregados no estudo dos 110 isolados presuntamente identificados como *C. tropicalis* por metodologia convencional.



A esfera que assinala a interseção dos eixos, dimensiona a frequência de isolados que exibiram as características interligadas; Os isolados que compõem os perfis bioquímicos de 1 a 17 foram identificados como *C. tropicalis* pelo sistema Vitek® 2 YST Card e o perfil 18 compreende os isolados não identificados pelo sistema.

Figura 6: Análise filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal.

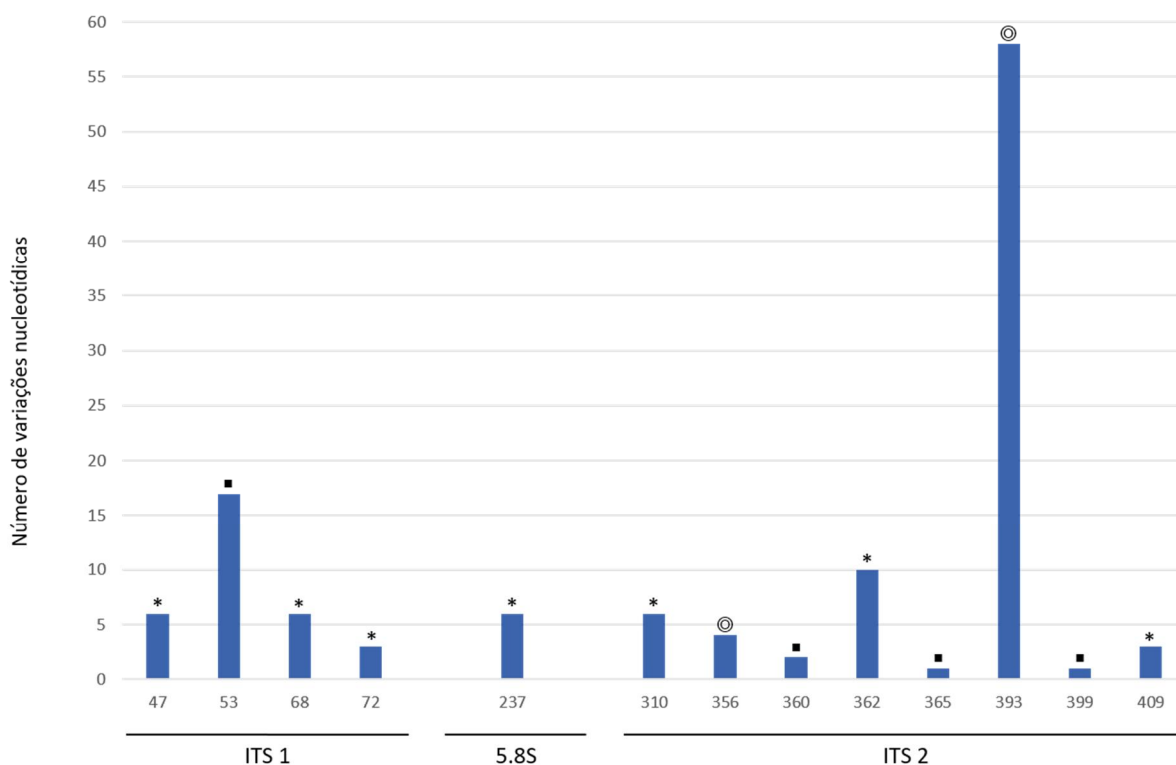


A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança baseado no modelo de Tamura-Nei (1993). A árvore inicial foi obtida automaticamente aplicando uma matriz de distâncias entre pares estimados usando a abordagem *Maximum Composite Likelihood*. O percentual dos agrupamentos ao utilizar um bootstrap de 1000 réplicas encontra-se ao lado dos ramos. A análise envolveu 115 sequências nucleotídicas (110 isolados e as cepas ATCCs 750, 13803 e 28707). Houve um total de 810 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA X (2018).

5.2.2 Análise da diversidade intraespecífica da região ITS1-5.8S-ITS2

A avaliação da diversidade polimórfica da região ITS1-5.8S-ITS2 envolveu 110 sequências do estudo e 3 sequências de isolados de referência (ATCC750, ATCC13803 e ATCC 28707). A comparação das sequências revelou que a região ITS do rDNA é formada por 437 pares de bases nitrogenadas e apresenta 13 sítios de variação nucleotídica, sendo 4 sítios polimórficos encontrados na região ITS1, 1 sítio na região 5.8s e 8 sítios na região ITS2. Dentre as variações polimórficas as transições foram as mais frequentes, seguida de 4 transversões e 2 deleções/inserções (**Figura 7**).

Figura 7: Análise polimórfica da região ITS1-5.8S-ITS2 de 113 sequências de *C. tropicalis*.



No eixo x estão representados os sítios polimórficos da região ITS1-5.8S-ITS2 (437pb). Variações polimórficas: * transição; ■ transversão; ⊙ deleção/inserção;

Com base nos resultados da análise das 113 sequências da região ITS do rDNA foi possível avaliar a existência de 12 haplótipos, com taxa de diversidade de haplótipos (Hd) igual a 0,7302 e diversidade de nucleotídeos de 0,0023 (**APÊNDICE A**). O haplótipo de maior frequência foi H1 que compreendeu 40 isolados clínicos e 2 cepas de referência, ATCC750 e ATCC28707, seguido do haplótipo H3 que compreendeu 40 isolados clínicos. Os

haplótipos 1 e 3 apresentam como diferença uma única alteração no sítio 393, dentro da região ITS2. Essa diferença envolve a deleção/inserção de uma adenina (**Tabela 4**). A cepa de referência ATCC13803 foi caracterizada como haplótipo H4.

Tabela 4: Diversidade haplotípica da região ITS1-5.8S-ITS2 de 113 sequências de *C. tropicalis*

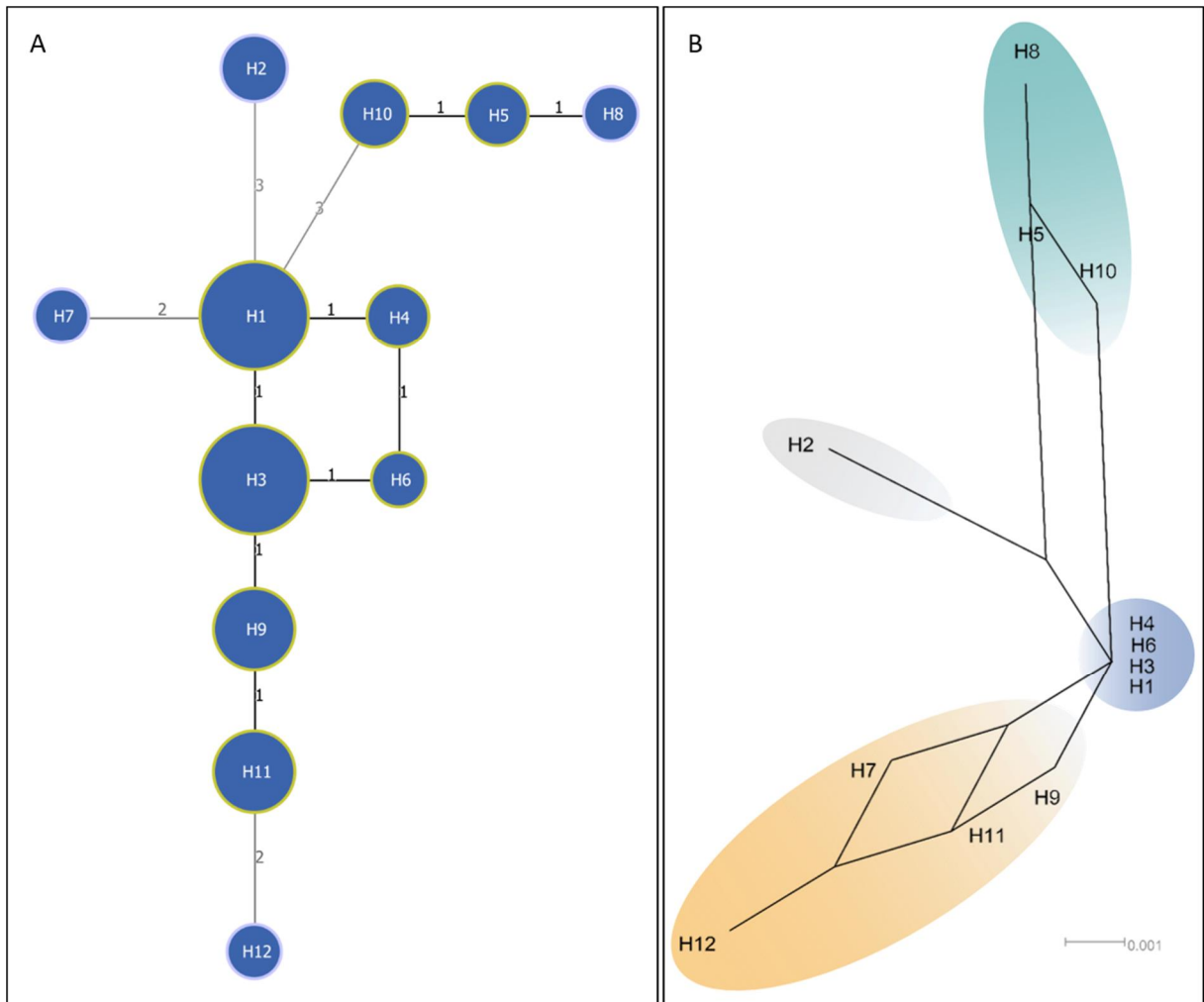
Sítios Polimórficos		47	53	68	72	237	310	356	360	362	365	393	399	409
Variação Haplotípica Básica		C	T	T	G	C	C	A	T	G	A	A	G	C
Haplótipo (H)	Nº de sequências													
H1	42
H2	3	.	.	.	A	.	T	T
H3	40	*	.	.
H4	3	*
H5	2	T	.	C	.	T	T
H6	1	*	.	.	.	*	.	.
H7	1	G	A
H8	1	T	.	C	.	T	T	C	.
H9	8	.	G	*	.	.
H10	3	T	.	C	.	T
H11	8	.	G	A	.	*	.	.
H12	1	.	G	G	A	C	*	.	.

A combinação de nucleotídeos de polimorfismo único mais frequente foi considerada como variante haplotípica básica. (A): Adenina; (G): Guanina; (T) Timina; (C) Citosina; (.) representação gráfica da ausência de divergência entre os haplótipos e a variante básica; (*) ausência de base nitrogenada.

A partir das análises foi construída a rede de haplótipos que permitiu inferir, com base na região ITS1-5.8S-ITS2, possíveis relações evolutivas centradas em um eixo precursor formado pelos haplótipos 1, 3, 4 e 6. Esses haplótipos apresentam alta similaridade e apenas dois pontos de divergência, relacionados aos sítios polimórficos 356 e 393 na região ITS2 (**Figura 8A**).

O centro precursor organiza a rede de haplótipos em 4 grupos. O grupo 1, formado pelos haplótipos 1, 3, 4 e 6, divide a rede de haplótipos em duas grandes regiões. Uma região institui o grupo haplotípico 2, formado pelos haplótipos 7, 9, 11 e 12 e a outra região estabelece o grupo 3, formado pelo haplótipo 2 e o grupo 4, formado pelos haplótipos 5, 8 e 10. Em uma análise mais aprofundada é possível observar que a divisão entre os grupos haplotípicos 3 e 4 está pautada no polimorfismo presente no sítio 237 na região 5.8S do rDNA (**Figura 8B**).

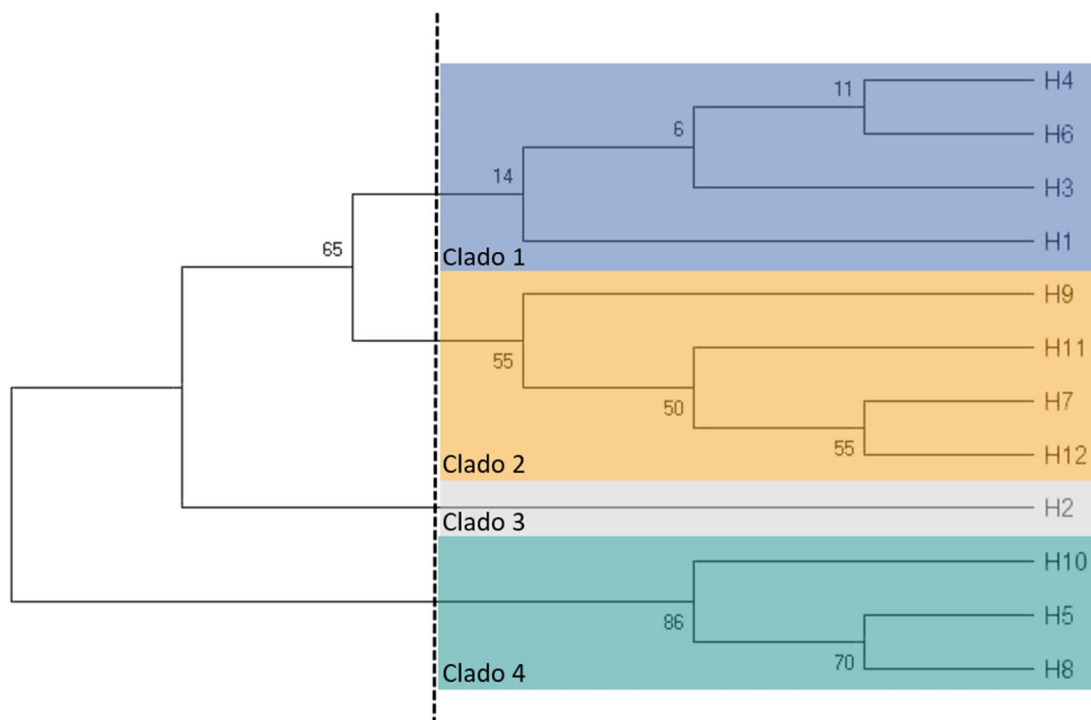
Figura 8: Diversidade genética de *C. tropicalis* com base na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal.



(A) Rede de haplótipos pelo método de *Median-Joining* de 113 seqüências de DNA de 110 isolados clínicos e 3 isolados de referência (ATCC750, ATCC13803 e ATCC28707). Cada círculo representa um haplótipo (H1-H12) e a circunferência do círculo é proporcional à frequência haplotípica do conjunto de dados. As etapas de mutação são representadas por linhas entre haplótipos e sua frequência pelos números; (B) Rede de haplótipos pelo método *Neighbor-Net* de transformação de distâncias.

A análise das seqüências dos 12 haplótipos pelo método da máxima verossimilhança confirmou as principais relações filogenéticas entre os mesmos, fato que reforça o agrupamento dos haplótipos em 4 clados. O clado 1 agrupa os haplótipos 1, 3, 4 e 6 e concentra 76% (n=83) dos isolados do estudo, o clado 2 agrupa os haplótipos 7, 9, 11 e 12 e responde por 16% (n=18) dos isolados, o clado 3 é formado pelo haplótipo 2 e apresenta 3% (n=3) dos isolados e o clado 4 agrupa os haplótipos 5, 8 e 10 e reúne 5% (n=6) dos isolados do estudo (**Figura 9**).

Figura 9: Análise filogenética baseada nas sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal de 12 haplótipos de *C. tropicalis*.



A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança baseado no modelo de Tamura-Nei (1993). A árvore inicial foi obtida automaticamente aplicando uma matriz de distâncias entre pares estimados usando a abordagem *Maximum Composite Likelihood*. O percentual dos agrupamentos ao utilizar um bootstrap de 1000 réplicas encontra-se ao lado dos ramos. A análise envolveu 12 sequências nucleotídicas. Houve um total de 437 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA X (2018).

As mesmas análises de variabilidade intraespecífica da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal foram aplicadas a um conjunto de 217 sequências de rDNA, das quais 110 são os isolados clínicos do estudo e as demais sequências foram obtidas no banco de dados do NCBI/*GenBank*. Destas sequências, 14 são de origem ambiental pertencentes a cepas isoladas de solo, resíduos agroindustriais, suco de laranja, água de piscina, água de oceano e de algas; 6 sequências são de origem animal, pertencentes a isolados de cão, gato, gado bovino e de um escaravelho; as demais 87 sequências são de origem clínica pertencentes a cepas isoladas de diversos sítios anatômicos.

As 107 sequências obtidas no banco de dados são de 18 diferentes países, sendo 2 países da América do Sul; 2 países da América do Norte; 8 países da Europa; 3 países do Oriente Médio; 2 países da Ásia Oriental e um país da Oceania. Além dessas regiões, também foi inserida no estudo uma sequência de origem no oceano Pacífico.

O estudo da diversidade polimórfica intraespecífica da região ITS1-5.8S-ITS2, com base nos resultados da análise das 217 sequências demonstrou a existência de 38 haplótipos, com taxa de diversidade de haplótipos igual a 0,7794 e diversidade de nucleotídeos de 0,0109. Os haplótipos H1 (n = 74) e H3 (n = 69) compreenderam 66% das sequências analisadas e ambos agruparam isolados de origem ambiental, animal e clínica. Os demais isolados de origem ambiental ficaram distribuídos entre os haplótipos 13, 19, 20 e 21, sendo o haplótipo 21, sequência relativa a um isolado de solo, o que apresentou maior divergência (14 sítios polimórficos) quando comparado ao eixo precursor (**Figura 10**).

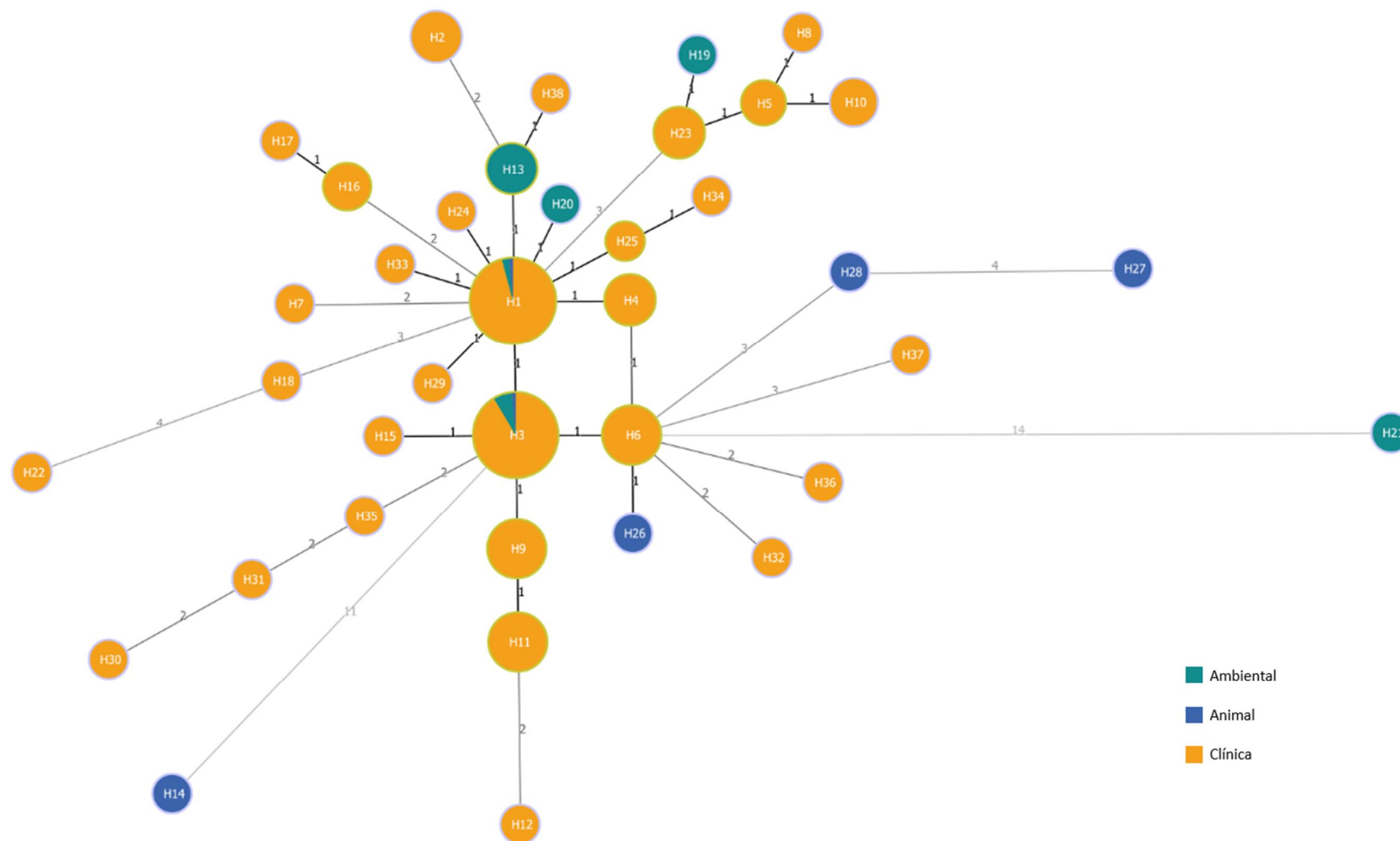
Dentre os isolados de origem animal, a maior divergência (11 sítios polimórficos) foi observada na avaliação do haplótipo 14, sequência relativa a um isolado do sedimento urinário de um gato. Os demais isolados de origem animal estão distribuídos entre os haplótipos 26, 27 e 28.

O estudo da dispersão haplotípica pelo globo (**Figura 11**) evidenciou a presença do haplótipo 1 em 13 países distribuídos pela Oceania, Ásia Oriental, Oriente Médio, Europa, América do Norte, América do Sul e no Oceano Pacífico, enquanto o haplótipo 3 foi identificado em 8 países também distribuídos entre as mesmas regiões. Os demais haplótipos que compõem o possível centro precursor apresentam uma menor dispersão, sendo o haplótipo 4 observado no Brasil, China e Irã e o haplótipo 6 no Brasil, China, Bélgica, Kuwait e Austrália. Ao passo que apenas o Brasil concentra exemplares dos haplótipos 1, 3, 4 e 6.

Relações de compartilhamento de haplótipos fora do eixo central da rede são observadas apenas no haplótipo 23 identificado no Brasil, China, Irã e Grécia e no haplótipo 16 identificado no Brasil e na França. Relações de exclusividade que envolvam sequências de origem clínica são observadas na Austrália (H34 e H35), Japão (H15), China (H22, H24 e H25), Omã (H32 e H33), Kuwait (H38), Bélgica (H36), Gales (H37) e no Brasil (H2, H5, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H17, H18, H29, H30 e H31).

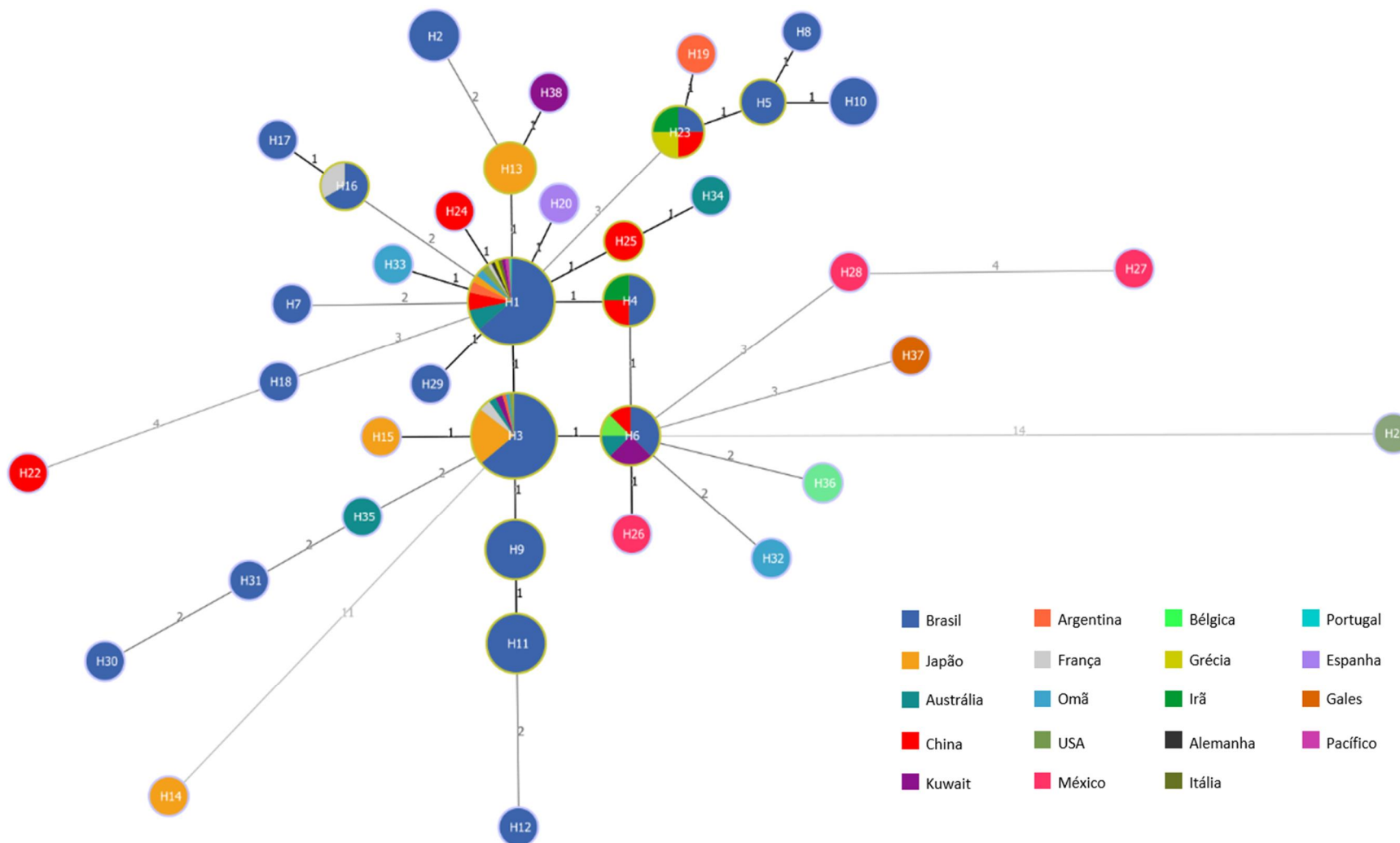
Os isolados brasileiros inseridos na análise são oriundos de 4 estados: Minas Gerais, São Paulo, Ceará e Paraná. Os haplótipos 1 e 3 foram identificados em todos os estados, haplótipo 6 em Minas Gerais, São Paulo e Paraná, haplótipo 2 em Minas Gerais e São Paulo e o haplótipo 16 em São Paulo e Ceará. Os haplótipos 23, 29 e 30 foram observados exclusivamente em São Paulo, 31 no Paraná, 17 e 18 no Ceará e os haplótipos 5, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 em Minas Gerais (**APÊNDICE B**).

Figura 10: Diversidade genética de *C. tropicalis* com base na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal e de acordo com a fonte de isolamento.



Rede de haplótipos pelo método de *Median-Joining* de 217 sequências de DNA de 197 isolados clínicos, 14 isolados ambientais e 6 isolados de origem animal. Cada círculo representa um haplótipo (H1-H38) e a circunferência do círculo é proporcional à frequência haplotípica do conjunto de dados. As etapas de mutação são representadas por linhas entre haplótipos e sua frequência pelos números;

Figura 11: Diversidade genética de *C. tropicalis* com base na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal e de acordo com o país de isolamento.

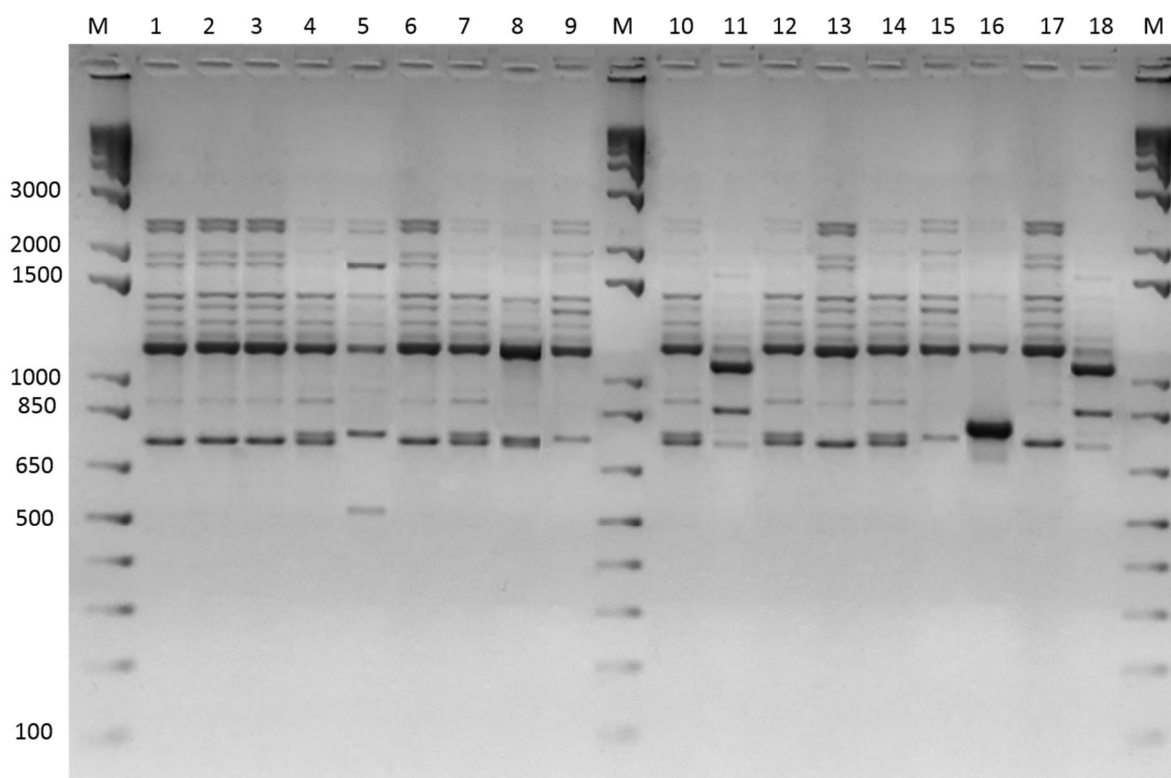


Rede de haplótipos pelo método de *Median-Joining* de 217 sequências de DNA de 19 diferentes regiões do globo. Cada círculo representa um haplótipo (H1-H38) e a circunferência do círculo é proporcional à frequência haplotípica do conjunto de dados. As etapas de mutação são representadas por linhas entre haplótipos e sua frequência pelos números;

5.2.3 DNA δ Fingerprinting: primer M13

Os isolados inseridos no estudo foram tipados pela amplificação das regiões repetitivas hipervariáveis (minissatélites) M13 (**Figura 12**). Em análise de todas as bandas visíveis, independente de sua intensidade, foi gerado um dendrograma (**Figura 13**) que evidenciou a existência de 7 perfis moleculares. O perfil molecular mais frequente foi o de número 2 (n = 55), seguido do perfil 1 (n = 25), perfil 4 (n = 11), perfil 7 (n = 10), perfil 5 (n = 7), perfil 3 (n = 1) e perfil 6 (n = 1). As cepas de referência ATCC 750, ATCC13803 e ATCC 28707 exibiram o perfil molecular 1.

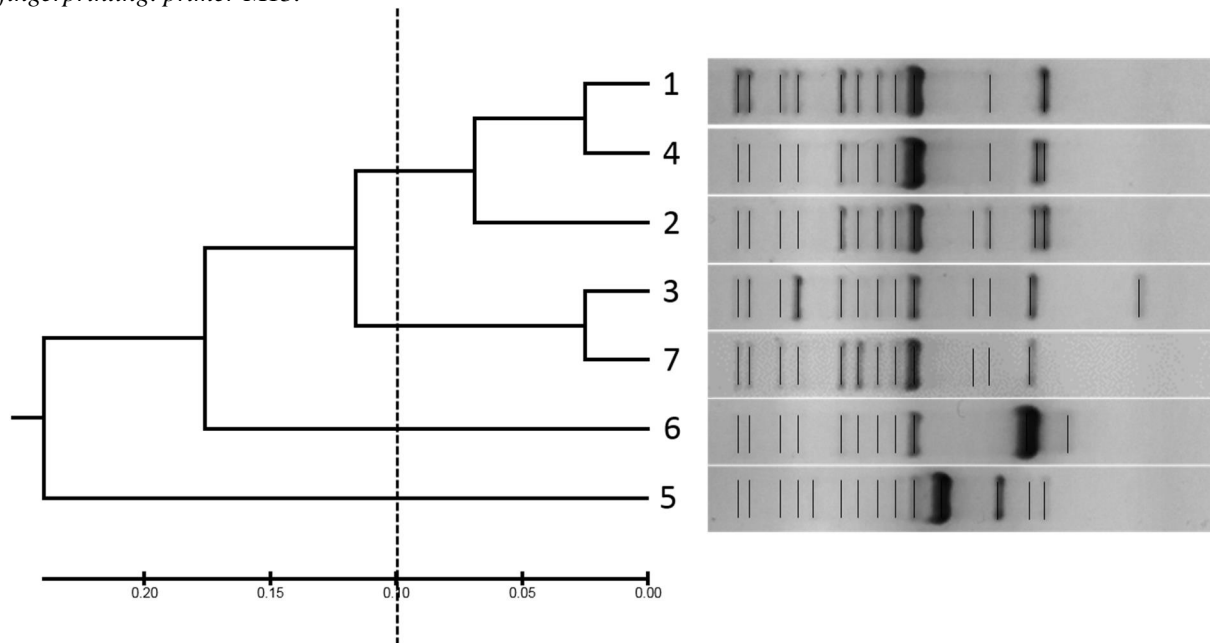
Figura 12: Gel representativo dos produtos do DNA *fingerprinting* - primer M13 de isolados de *C. tropicalis*.



Eletroforese dos produtos do DNA *fingerprinting* realizado em gel de agarose 1,4% a 5V/cm. Colunas M, marcador de peso molecular 1 Kb DNA *ladder plus*, sendo indicadas as posições de migrações dos fragmentos de pares de bases. Colunas de 1, 2 e 3: cepas de referências ATCC 750, ATCC 13803 e ATCC 28707, respectivamente. Colunas 4 a 18: isolados clínicos 01CT, 03CT, 06CT, 07CT, 09CT, 11CT, 13CT, 14CT, 15CT, 17CT, 19CT, 22CT, 21CT, 24CT, 25CT, respectivamente.

A análise de similaridade dos perfis moleculares permitiu estabelecer o agrupamento dos 7 perfis em 4 clados, sendo o clado 1 formado pelos perfis 1, 2 e 4, clado 2 formado pelos perfis 3 e 7, e os clados 3 e 4 formados pelos perfis 6 e 5, respectivamente. Ao passo que o clado 1 concentra 83% dos isolados clínicos do estudo.

Figura 13: Dendrograma baseado na análise dos perfis moleculares obtidos a partir dos produtos da PCR *fingerprinting*: *primer* M13.



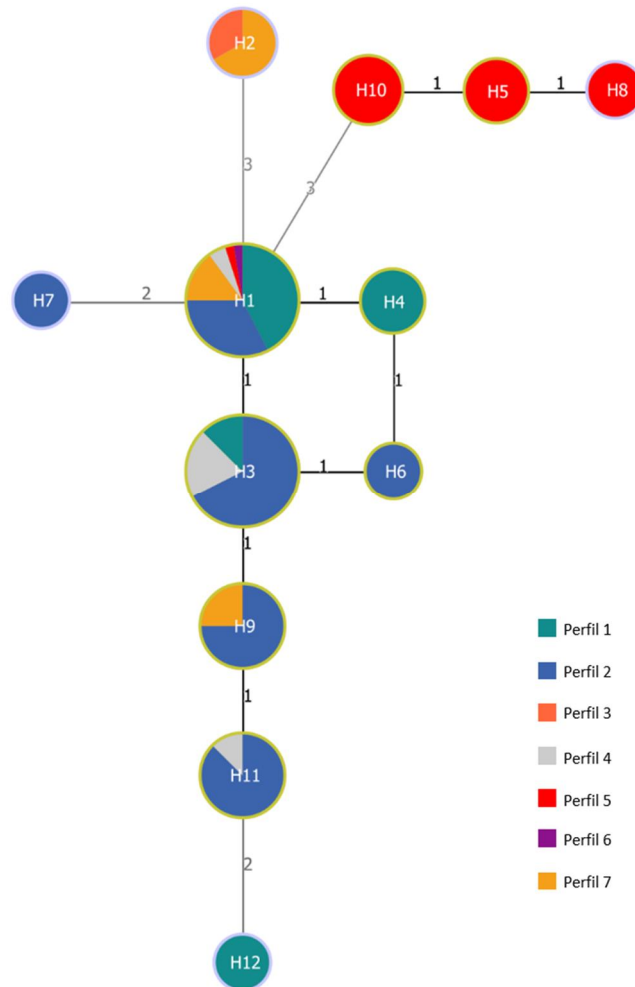
A similaridade entre os perfis moleculares foi analisada pelo programa NTSYSpc version 2.0 com base no método UPGMA a partir da matriz de distância construída pelo coeficiente de similaridade de Rand.

A avaliação da concordância entre as análises de diversidade genética com base na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal e a tipagem molecular pela amplificação das regiões repetitivas hipervariáveis M13 apresentou baixo grau de concordância com valor de kappa igual a 0,313. Entretanto, foi possível observar que o haplótipo 1 concentra isolados de 6 dos 7 perfis moleculares, sendo o perfil molecular 3 a exceção. O único isolado tipado com perfil 3 foi caracterizado como pertencente ao haplótipo 2 em conjunto com outros 2 isolados de perfil 7 (**Figura 14**).

Os haplótipos 3, 9 e 11 também exibiram isolados tipados em diferentes perfis moleculares, enquanto, relações de exclusividade foram observadas entre os haplótipos 4 e 12 que concentram apenas isolados tipados com perfil 1, haplótipos 6 e 7 que concentram apenas isolados tipados com perfil 2 e os haplótipos 5, 8 e 10 que agrupam 6 dos 7 isolados tipados com perfil molecular 5.

A análise também evidenciou que 25% ($n = 27$) dos isolados pertencem ao haplótipo 3 e exibem perfil molecular 2, seguido de 15% ($n = 17$) dos isolados que pertencem ao haplótipo 1 e exibem perfil molecular 1 (**APÊNDICE C**).

Figura 14: Diversidade genética de *C. tropicalis* com base na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal e sua relação com os perfis moleculares obtidos a partir dos produtos da PCR *fingerprinting*: *primer* M13.



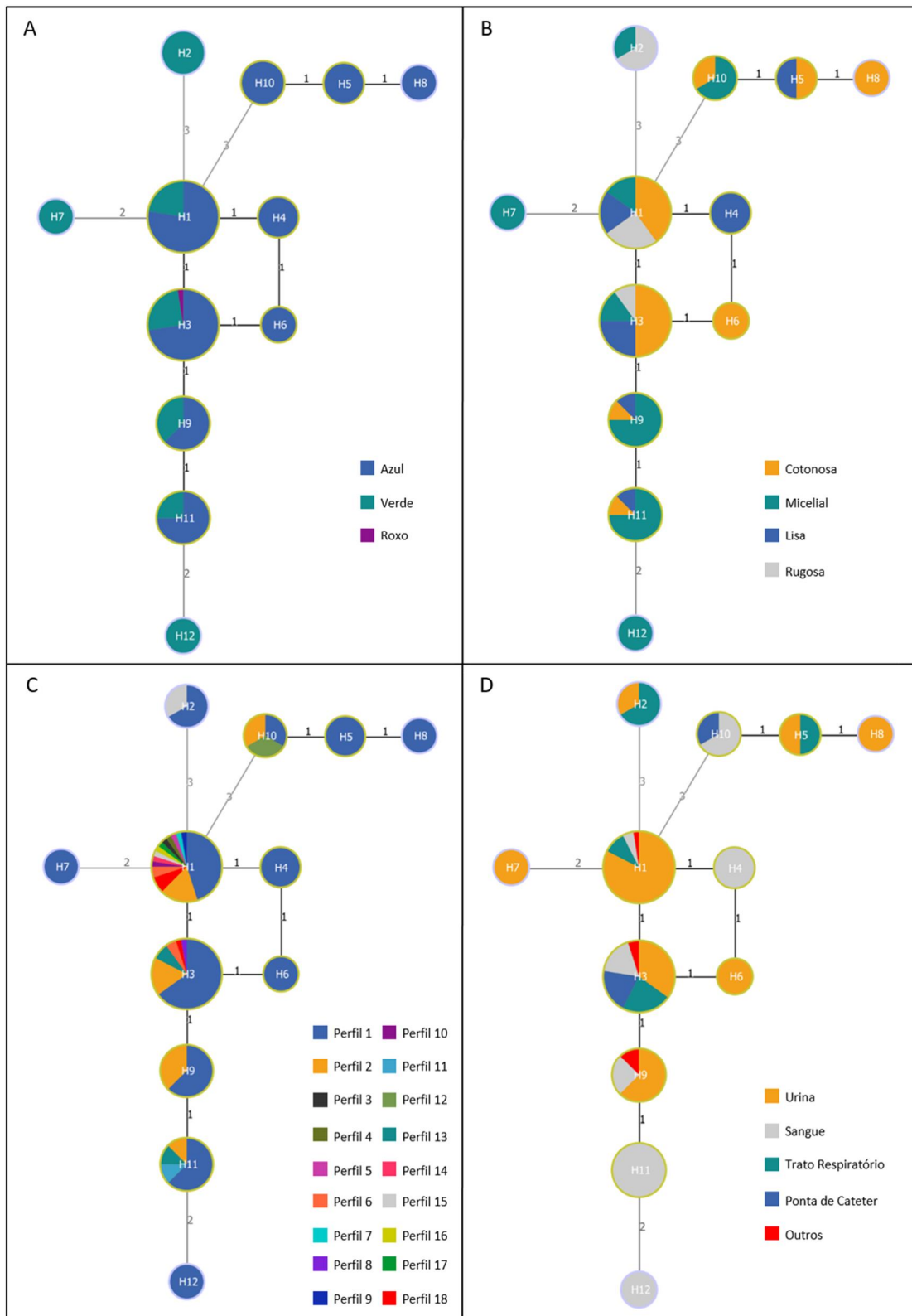
Rede de haplótipos pelo método de *Median-Joining* de 113 sequências de DNA de 110 isolados clínicos e 3 isolados de referência (ATCC750, ATCC13803 e ATCC28707). Cada círculo representa um haplótipo (H1-H12), a circunferência do círculo é proporcional à frequência haplotípica e a área dos setores dos círculos correspondem a frequência dos perfis moleculares observados dentre os haplótipos. As etapas de mutação são representadas por linhas entre haplótipos e sua frequência pelos números.

5.3 Correlações fenotípicas e genotípicas

A avaliação das correlações entre as características fenotípicas, genotípicas e os diferentes sítios de isolamento das amostras não evidenciaram agrupamentos específicos (APÊNDICES C e D). Contudo, as características: perfil bioquímico 1, haplótipo 3 e perfil molecular 2 foram observadas em 18% (n = 20) dos isolados avaliados no estudo.

Baseado na diversidade haplotípica foi observado que os haplótipos 1 e 3 agrupam 73% (n = 80) dos isolados estudados. Estes isolados foram identificados nos 5 sítios de isolamento descritos, entre eles: secreção abdominal, bile e líquido ascítico (Figura 15D).

Figura 15: Diversidade genética de *C. tropicalis* com base na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal e sua relação com as características fenotípicas e o sítio de isolamento.



Rede de haplótipos pelo método de *Median-Joining* de 113 sequências de DNA de 110 isolados clínicos e 3 isolados de referência (ATCC750, ATCC13803 e ATCC28707). Cada círculo representa um haplótipo (H1-H12), a circunferência do círculo é proporcional à frequência haplotípica e a área dos setores dos círculos correspondem às frequências observadas dentre os haplótipos. As etapas de mutação são representadas por linhas entre haplótipos e sua frequência pelos números. (A) Chromogam; (B) Morfologia; (C) Perfil Bioquímico; (D) Sítio de isolamento.

Os isolados agrupados nos haplótipos 1 e 3 também apresentaram respectivamente, em CHROMagar® *Candida* e em SDA, todas as variações de cor e morfologia descritas no estudo (**Figura 15A e B**). E exibiram a maior diversidade de perfis bioquímicos, cuja exceções foram os perfis 11 e 12 que mostraram positividade para os testes de detecção de tirosina arilamidase (TyrA) e assimilação de D-celobiose (dCELa), respectivamente (**Figura 15C**).

Frente aos resultados dos testes fenotípicos e tendo como padrão de identificação à amplificação e posterior sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal foi possível determinar a sensibilidade dos métodos fenotípicos de identificação de *C. tropicalis*. A identificação em meio CHROMagar® *Candida* apresentou sensibilidade de 84,96% [intervalo de confiança de 95% (IC) 78,42% - 91,49%], enquanto o sistema Vitek® 2 YST Card apresentou sensibilidade de 96,46% [IC95% 93,08% - 99,84%].

5.4 Avaliações Clínicas

Um número de 64 pacientes foi inicialmente inserido no estudo, entretanto durante a análise de viabilidade e pureza dos isolados, foi identificada a existência de dois perfis infecciosos mistos entre os casos. Dada a multiplicidade dos agentes fúngicos envolvidos nos quadros de candidíase, os pacientes foram excluídos dessa etapa do estudo.

Logo, a análise clínica e dos fatores de risco associados a candidíase invasiva por *C. tropicalis* envolveu um total de 62 pacientes, dos quais 48% (30) eram do sexo feminino e 52% (32) do sexo masculino. A distribuição dos pacientes de acordo com a idade evidenciou que 44% (27) apresentava idade inferior a 60 anos e 56% (35) apresentava 60 anos ou mais no momento da internação, sendo a mediana de idade observada de 61,7 anos.

Os pacientes foram internados na unidade hospitalar pelos mais diversos motivos. Motivos esses, agrupados de acordo com a classificação internacional de doenças (CID-10) em 4 grupos com distribuição de 5% (3) dos pacientes internados devido a causas externas, 16% (10) devido a doenças infecciosas, 32% (20) por apresentarem doenças hematológicas e/ou neoplasias e em 47% (29) o motivo da internação foi atribuído a acometimentos crônicos.

A análise dos hábitos sociais como uso de álcool, drogas e cigarros foi inviabilizada devido à ausência dessas informações em prontuário. Da mesma forma, as avaliações de importantes comorbidades como hipertensão arterial sistêmica, diabetes *mellitus* e HIV foram prejudicadas de forma parcial, visto que 26% dos prontuários não apresentavam as

informações ou exames comprobatórios. Entretanto, foi possível determinar a existência de 18 pacientes diabéticos, 34 pacientes hipertensos e 4 pacientes soropositivos para HIV envolvidos no estudo.

A avaliação da evolução clínica dos pacientes demonstrou que a mediana de tempo de internação foi de 29 dias e que 79% dos pacientes passaram pelo menos uma vez pelo CTI com mediana de tempo de internação nessa unidade de 25 dias. Durante o período de internação hospitalar, 34 pacientes foram diagnosticados com infecção do trato urinário, 10 pacientes com candidemia isolada, 10 pacientes com candidíase disseminada, 6 pacientes com infecções pulmonares e 2 pacientes com outras formas de candidíase por *C. tropicalis*.

O diagnóstico do quadro infeccioso foi estabelecido com base na avaliação microscópica das amostras clínicas coradas pela coloração de Gram, onde foram observadas estruturas leveduriformes em todos os materiais, e posterior cultura e identificação do agente etiológico por metodologia convencional.

Dada a realização de culturas quantitativas nas avaliações de infecções do trato geniturinário (TGU) e trato respiratório inferior (TRI), causadas por *C. tropicalis*, foi possível observar que 75% dos casos de candidúria apresentaram contagem superior a 100000 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). As demais infecções do trato geniturinário apresentaram contagens com valores entre 18000 ó 80000 UFC/mL. Já as avaliações quantitativas das infecções do TRI permitiram observar que 62% das infecções apresentaram valores $\times 10^6$ UFC/mL e as demais evidenciaram valores entre 1,2 ó $8,4 \times 10^5$ UFC/mL.

As abordagens farmacoterapêuticas utilizadas para os quadros de candidíase invasiva envolveram o uso de fluconazol 200mg/100mL e anfotericina B desoxicolato 50mg em distintos esquemas. Contudo, 27% dos pacientes não receberam qualquer esquema antifúngico. O uso de corticosteroides como hidrocortisona 100mg, prednisona 20mg, dexametasona 4mg e metilprednisolona succinato 500mg, foi evidenciado em 69% dos pacientes. Observou-se também que 98% dos pacientes receberam antibioticoterapia de amplo espectro, dos quais 43% não apresentavam qualquer coinfeção bacteriana.

A análise do hemograma, coletado na data do isolamento do agente etiológico, evidenciou que os pacientes inseridos no estudo apresentavam eritrograma com valores médios característicos de uma anemia normocrômica e normocítica com grau moderado de anisocitose, leucometria global normal e leucometria específica com prevalência de polimorfonucleares e desvio a esquerda em 77% dos casos. Dentre os 62 pacientes, 13% apresentavam quadro neutropênico.

Como desfecho clínico, 69% (43) dos pacientes foram a óbito e 31% (19) obtiveram alta hospitalar. A avaliação descritiva das principais condições clínicas e dos fatores predisponentes de acordo com o desfecho clínico (**Tabela 5**), demonstrou não existir diferenças estatisticamente significativas para as variáveis de sexo, faixa etária, motivo da internação, tempo de internação e tempo de internação no CTI entre os diferentes desfechos ($p > 0,05$).

No entanto, foi possível observar um maior número de óbitos dentre os pacientes que foram submetidos a fatores predisponentes como internação no CTI, uso de nutrição enteral, ventilação mecânica, sonda urinária, cateter central, uso de corticosteroides ou que tenham recebido transfusão sanguínea ($p < 0,05$).

Dentre os pacientes que receberam tratamento antifúngico, a principal abordagem terapêutica utilizada para os quadros de candidíase invasiva foi o uso de anfotericina B desoxicolato 50 mg em monoterapia, seguido de proporções iguais de pacientes tratados com fluconazol 200mg/100mL em monoterapia e pacientes que receberam esquema de associação desses antifúngicos. O maior número de óbitos foi observado dentre os pacientes tratados com associação dos fármacos, no entanto a análise univariada não apresentou diferença significativa entre os diferentes esquemas de tratamento e o desfecho clínico.

Durante o período de internação hospitalar, 85% pacientes apresentaram quadro de candidíase em apenas um sítio anatômico, enquanto 25% exibiram um quadro de disseminação envolvendo dois ou mais sítios. A correlação entre o número de sítios acometidos e o desfecho clínico não demonstrou significância estatística ($p > 0,05$).

Na busca de investigar a existência de correlações entre os perfis genotípicos dos isolados de *C. tropicalis* e o desfecho clínico do paciente, os isolados foram agrupados em clados de acordo com as análises filogenéticas dos haplótipos geradas na avaliação da região ITS1-5.8S-ITS2 e dos perfis de DNA *fingerprinting* pelo *primer M13* (região minissatélites). No entanto, dentre os 62 pacientes inseridos no estudo observou-se 25 casos em que os pacientes apresentavam múltiplos isolados de *C. tropicalis* (**APÊNDICE E**).

A avaliação desses pacientes evidenciou 12 casos que apresentavam isolados de perfil genotípico idêntico, 10 casos em que os isolados exibiram perfis genotípicos distintos, mas estreitamente relacionados, fato que permitiu o agrupamento dos perfis dentro dos clados propostos. E 3 casos onde os isolados exibiam grande diferença genotípica, sendo atribuído a esses pacientes a infecção pelos isolados agrupados dentro do clado mais raro. Contudo, a análise estatística univariada não demonstrou qualquer relação entre os perfis genotípicos dos isolados de *C. tropicalis* e o desfecho clínico dos pacientes ($p > 0,05$).

Tabela 5: Fatores associados ao desfecho clínico de 62 pacientes com candidíase invasiva por *C. tropicalis*.

Variáveis		Alta (n = 19)	Óbito (n = 43)	p-valor
Sexo	Feminino	12 (63%)	18 (42%)	0.120
	Masculino	7 (37%)	25 (58%)	
Faixa Etária (anos)	< 60	8 (42%)	19 (44%)	0.880
	× 60	11 (58%)	24 (56%)	
Tempo de Internação (dias)		21.0 (8.0, 56.0)	30.0 (13.0, 84.0)	0.080
Tempo de Internação ao Isolamento (dias)		9.0 (3.0, 12.0)	12.0 (6.0, 31.0)	0.180
Tempo do Isolamento ao Desfecho (dias)		11.0 (3.0, 30.0)	15.0 (5.0, 53.0)	0.380
Internação no CTI	Não	11 (58%)	2 (5%)	<0.001
	Sim	8 (42%)	41 (95%)	
Tempo de Internação no CTI (dias)		26.0 (13.0, 47.5)	24.0 (11.0, 46.0)	0.780
Nutrição Enteral	Não	8 (42%)	3 (7%)	<0.001
	Sim	11 (58%)	40 (93%)	
Ventilação Mecânica	Não	6 (32%)	2 (5%)	0.004
	Sim	13 (68%)	41 (95%)	
Sonda Urinária	Não	12 (63%)	2 (5%)	<0.001
	Sim	7 (37%)	41 (95%)	
Cateter Central	Não	10 (53%)	1 (2%)	<0.001
	Sim	9 (47%)	42 (98%)	
Transusão	Não	15 (79%)	17 (40%)	0.004
	Sim	4 (21%)	26 (60%)	
Neutropenia	Não	18 (95%)	36 (84%)	0.230
	Sim	1 (5%)	7 (16%)	
Esquema Antifúngico	Anfotericina B	5 (26%)	12 (28%)	0.054
	Fluconazol	4 (21%)	10 (23%)	
	Associação Fluconazol e Anfotericina B	1 (5%)	13 (30%)	
Uso de Corticosteroide	Não	9 (47%)	8 (19%)	0.002
	Sim	11 (58%)	35 (81%)	
Uso de Antimicrobiano	Não	1 (5%)	0 (0%)	0.130
	Sim	18 (95%)	43 (100%)	
Coinfecção Bacteriana	Não	10 (53%)	16 (37%)	0.260
	Sim	9 (47%)	27 (63%)	
Sítio do Primeiro Isolamento	Abcesso dedo mão	1 (5%)	0 (0%)	0.150
	Bile	1 (5%)	0 (0%)	
	Ponta de Cateter	1 (5%)	3 (7%)	
	Sangue	1 (5%)	8 (19%)	
	Secreção Abdominal	1 (5%)	0 (0%)	
	Trato Respiratório	2 (11%)	9 (21%)	
	Urina	12 (63%)	23 (53%)	
Número de Sítios de Isolamento	1	18 (95%)	35 (81%)	0.360
	2	1 (5%)	6 (14%)	
	3	0 (0%)	2 (5%)	
Motivo da Internação	Causas externas	2 (11%)	1 (2%)	0.350
	Doenças Crônicas	9 (47%)	20 (47%)	
	Doenças Infeciosas	4 (21%)	6 (14%)	
	Doenças do Sangue e Neoplasias	4 (21%)	16 (37%)	
Agrupamento ITS	Clado 1	16 (84%)	33 (77%)	0.360
	Clado 2	3 (16%)	4 (9%)	
	Clado 3	0 (0%)	3 (7%)	
	Clado 4	0 (0%)	3 (7%)	
Agrupamento M13	Clado 1	15 (79%)	32 (74%)	0.910
	Clado 2	3 (16%)	7 (16%)	
	Clado 3	0 (0%)	1 (2%)	
	Clado 4	1 (5%)	3 (7%)	

As variáveis categóricas são apresentadas em número absoluto, seguido de seu valor percentual; As variáveis contínuas são representadas pela mediana e seu respectivo intervalo interquartil; CTI: Centro de Terapia Intensiva.

Já a análise multivariada (**Tabela 6**) dos fatores de risco associados ao quadro de candidíase invasiva, nos permitiu inferir que o uso de sonda urinária [*odds ratio* (OR) 84,4, IC95% 4,4-1634,2], submissão ao procedimento de transfusão sanguínea [OR 8,0, IC95% 1,1-56,8], internação no CTI [OR 77,7, IC95% 3,7-1651,3] e o não uso de antifúngicos [OR 4,5, IC95% 1,3-15,1] foram associados a um aumento da chance de óbito.

Tabela 6: Fatores associados ao desfecho clínico de 62 pacientes com candidíase invasiva por *C. tropicalis* por análise multivariada.

Variáveis	Odds ratio	Intervalo de Confiança 95%	p-valor
Sonda urinária	84,4	4,4 ó 1634,2	0,003
Transfusão	8,0	1,1 ó 56,8	0,038
Internação no CTI	77,7	3,7 ó 1651,3	0,005
Não tratamento Antifúngico	4,5	1,3 ó 15,1	0,015

CTI: Centro de Terapia Intensiva.

A avaliação descritiva dos fatores associados a evolução clínica dos 62 pacientes agrupados pela diversidade intraespecífica da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (**Tabela 7**) e agrupados pela diversidade dos perfis moleculares obtidos a partir dos produtos do DNA *fingerprinting: primer* M13 (**Tabela 8**) não evidenciaram diferenças estatísticas entre os clados. Ao passo que ausência de significância ($p > 0,05$) descreve um cenário uniforme entre os pacientes agrupados nos clados, onde a faixa etária, sexo, exposição a fatores predisponentes, motivos de internação, tempo de internação ou mesmo o desfecho clínico não evidenciam diferenças entre os clados.

A proporcionalidade dos eventos e exposições, evidenciada na análise univariada descreveu o contexto, mas não permitiu estabelecer inferências de temporalidade que correlacionem a diversidade genética, sítio de infecção e esquemas antifúngicos ao desfecho clínico. Para compreender o tempo como covariante do desfecho, foram realizadas 6 análises de sobrevivência com base no potencial patogênico de cada isolado, onde o desfecho considerado foi o óbito, a censura, a alta hospitalar, e o tempo avaliado compreendeu o período da data de coleta do espécime clínico até o desfecho clínico do paciente (**Figura 16**).

Tabela 7: Análise comparativa dos fatores associados a evolução clínica de 62 pacientes com candidíase invasiva por *C. tropicalis* agrupados pela diversidade intraespecífica da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal.

Variáveis		Clado 1 (n = 49)	Clado 2 (n = 7)	Clado 3 (n = 3)	Clado 4 (n = 3)	p-valor
Sexo	Feminino	23 (47%)	4 (57%)	1 (33%)	2 (67%)	0.820
	Masculino	26 (53%)	3 (43%)	2 (67%)	1 (33%)	
Faixa Etária (anos)	< 60	21 (43%)	5 (71%)	0 (0%)	1 (33%)	0.200
	× 60	28 (57%)	2 (29%)	3 (100%)	2 (67%)	
Tempo de Internação (dias)		30.0 (13.0, 72.0)	45.0 (16.0, 51.0)	23.0 (11.0, 28.0)	30.0 (10.0, 126.0)	0.850
Tempo de Internação ao Isolamento (dias)		10.0 (6.0, 29.0)	12.0 (5.0, 31.0)	5.0 (3.0, 18.0)	10.0 (4.0, 25.0)	0.760
Tempo do Isolamento ao Desfecho (dias)		15.0 (4.0, 44.0)	13.0 (8.0, 36.0)	6.0 (4.0, 25.0)	5.0 (0.0, 122.0)	0.800
Internação no CTI	Não	10 (20%)	3 (43%)	0 (0%)	0 (0%)	0.300
	Sim	39 (80%)	4 (57%)	3 (100%)	3 (100%)	
Tempo de Internação no CTI (dias)		26.0 (13.0, 58.0)	22.0 (9.0, 33.5)	11.0 (8.0, 25.0)	26.0 (10.0, 111.0)	0.530
Nutrição Enteral	Não	10 (20%)	1 (14%)	0 (0%)	0 (0%)	0.660
	Sim	39 (80%)	6 (86%)	3 (100%)	3 (100%)	
Ventilação Mecânica	Não	7 (14%)	1 (14%)	0 (0%)	0 (0%)	0.810
	Sim	42 (86%)	6 (86%)	3 (100%)	3 (100%)	
Sonda Urinária	Não	13 (27%)	1 (14%)	0 (0%)	0 (0%)	0.480
	Sim	36 (73%)	6 (86%)	3 (100%)	3 (100%)	
Cateter Central	Não	10 (20%)	1 (14%)	0 (0%)	0 (0%)	0.660
	Sim	39 (80%)	6 (86%)	3 (100%)	3 (100%)	
Transfusão	Não	23 (47%)	4 (57%)	3 (100%)	2 (67%)	0.310
	Sim	26 (53%)	3 (43%)	0 (0%)	1 (33%)	
Neutropenia	Não	43 (88%)	6 (86%)	3 (100%)	2 (67%)	0.660
	Sim	6 (12%)	1 (14%)	0 (0%)	1 (33%)	
Esquema Antifúngico	Anfotericina B	14 (29%)	3 (43%)	0 (0%)	0 (0%)	0.330
	Fluconazol	10 (20%)	2 (29%)	2 (67%)	0 (0%)	
	Associação Fluconazol e Anfotericina B	10 (20%)	1 (14%)	1 (33%)	2 (67%)	
Uso de Corticosteroide	Não	15 (31%)	1 (14%)	0 (0%)	1 (33%)	0.440
	Sim	13 (27%)	3 (43%)	2 (67%)	1 (33%)	
Uso de Antimicrobiano	Não	36 (73%)	4 (57%)	1 (33%)	2 (67%)	0.970
	Sim	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Coinfecção Bacteriana	Não	48 (98%)	7 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	0.560
	Sim	20 (41%)	2 (29%)	2 (67%)	2 (67%)	
Sítio do Primeiro Isolamento	Abcesso dedo mão	29 (59%)	5 (71%)	1 (33%)	1 (33%)	0.510
	Bile	0 (0%)	1 (14%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Ponta de Cateter	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Sangue	4 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Secreção Abdominal	7 (14%)	1 (14%)	0 (0%)	1 (33%)	
	Trato Respiratório	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Urina	8 (16%)	0 (0%)	2 (67%)	1 (33%)	
		28 (57%)	5 (71%)	1 (33%)	1 (33%)	

Número de Sítios de Isolamento	1	42 (86%)	6 (86%)	3 (100%)	2 (67%)	0.130
	2	6 (12%)	1 (14%)	0 (0%)	0 (0%)	
	3	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33%)	
Motivo da Internação	Causas externas	3 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.960
	Doenças Crônicas	22 (45%)	3 (43%)	2 (67%)	2 (67%)	
	Doenças Infecciosas	8 (16%)	2 (29%)	0 (0%)	0 (0%)	
Agrupamento M13	Doenças do Sangue e Neoplasias	16 (33%)	2 (29%)	1 (33%)	1 (33%)	<0.001
	Clado 1	42 (86%)	5 (71%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Clado 2	5 (10%)	2 (29%)	3 (100%)	0 (0%)	
	Clado 3	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Desfecho	Clado 4	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0.360
	Alta	16 (33%)	3 (43%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Óbito	33 (67%)	4 (57%)	3 (100%)	3 (100%)	

As variáveis categóricas são apresentadas em número absoluto, seguido de seu valor percentual; As variáveis contínuas são representadas pela mediana e seu respectivo intervalo interquartil; CTI: Centro de Terapia Intensiva.

Tabela 8: Análise comparativa dos fatores associados a evolução clínica de 62 pacientes com candidíase invasiva por *C. tropicalis* agrupados pela diversidade dos perfis moleculares obtidos a partir dos produtos do DNA *fingerprinting*: primer M13.

Variáveis		Clado 1 (n = 47)	Clado 2 (n = 10)	Clado 3 (n = 1)	Clado 4 (n = 4)	p-valor
Sexo	Feminino	23 (49%)	5 (50%)	0 (0%)	2 (50%)	0.810
	Masculino	24 (51%)	5 (50%)	1 (100%)	2 (50%)	
Faixa Etária (anos)	< 60	23 (49%)	3 (30%)	0 (0%)	1 (25%)	0.450
	× 60	24 (51%)	7 (70%)	1 (100%)	3 (75%)	
Tempo de Internação (dias)		30.0 (13.0, 70.0)	19.5 (12.0, 45.0)	99.0 (99.0, 99.0)	43.0 (20.0, 91.0)	0.440
Tempo de Internação ao Isolamento (dias)		10.0 (6.0, 29.0)	5.0 (3.0, 11.0)	38.0 (38.0, 38.0)	17.5 (7.0, 27.0)	0.150
Tempo do Isolamento ao Desfecho (dias)		15.0 (7.0, 44.0)	6.5 (4.0, 25.0)	61.0 (61.0, 61.0)	16.0 (2.5, 74.5)	0.520
Internação no CTI	Não	11 (23%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0.680
	Sim	36 (77%)	8 (80%)	1 (100%)	4 (100%)	
Tempo de Internação no CTI (dias)		26.0 (12.5, 47.5)	18.5 (11.0, 44.5)	18.0 (18.0, 18.0)	19.5 (11.5, 68.5)	0.970
Nutrição Enteral	Não	9 (19%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0.760
	Sim	38 (81%)	8 (80%)	1 (100%)	4 (100%)	
Ventilação Mecânica	Não	6 (13%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0.760
	Sim	41 (87%)	8 (80%)	1 (100%)	4 (100%)	
Sonda Urinária	Não	10 (21%)	3 (30%)	0 (0%)	1 (25%)	0.880
	Sim	37 (79%)	7 (70%)	1 (100%)	3 (75%)	
Cateter Central	Não	8 (17%)	2 (20%)	0 (0%)	1 (25%)	0.940
	Sim	39 (83%)	8 (80%)	1 (100%)	3 (75%)	
Transusão	Não	21 (45%)	7 (70%)	1 (100%)	3 (75%)	0.250
	Sim	26 (55%)	3 (30%)	0 (0%)	1 (25%)	
Neutropenia	Não	40 (85%)	10 (100%)	1 (100%)	3 (75%)	0.510
	Sim	7 (15%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	
Esquema	Anfotericina B	15 (32%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0.510
	Fluconazol	9 (19%)	3 (30%)	1 (100%)	1 (25%)	
	Associação Fluconazol e Anfotericina B	11 (23%)	1 (10%)	0 (0%)	2 (50%)	
Uso de Corticosteroide	Não	12 (26%)	4 (40%)	0 (0%)	1 (25%)	0.400
	Sim	13 (28%)	4 (40%)	1 (100%)	1 (25%)	
Uso de Antimicrobiano	Não	34 (72%)	6 (60%)	0 (0%)	3 (75%)	0.960
	Sim	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Coinfecção Bacteriana	Não	46 (98%)	10 (100%)	1 (100%)	4 (100%)	0.770
	Sim	19 (40%)	5 (50%)	0 (0%)	2 (50%)	
Sítio do Primeiro Isolamento	Abcesso dedo mão	28 (60%)	5 (50%)	1 (100%)	2 (50%)	0.670
	Bile	0 (0%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Ponta de Cateter	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Sangue	4 (9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Secreção Abdominal	8 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	
	Trato Respiratório	0 (0%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Urina	8 (17%)	2 (20%)	0 (0%)	1 (25%)	
		26 (55%)	6 (60%)	1 (100%)	2 (50%)	

Número de Sítios de Isolamento	1	39 (83%)	10 (100%)	1 (100%)	3 (75%)	0.170
	2	7 (15%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	3	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	
Motivo da Internação	Causas externas	1 (2%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0.110
	Doenças Crônicas	18 (38%)	7 (70%)	1 (100%)	3 (75%)	
	Doenças Infecciosas	10 (21%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Agrupamento ITS	Doenças do Sangue e Neoplasias	18 (38%)	1 (10%)	0 (0%)	1 (25%)	<0.001
	Clado 1	42 (89%)	5 (50%)	1 (100%)	1 (25%)	
	Clado 2	5 (11%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Clado 3	0 (0%)	3 (30%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Clado 4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (75%)	
Desfecho	Alta	15 (32%)	3 (30%)	0 (0%)	1 (25%)	0.910
	Óbito	32 (68%)	7 (70%)	1 (100%)	3 (75%)	

As variáveis categóricas são apresentadas em número absoluto, seguido de seu valor percentual; As variáveis contínuas são representadas pela mediana e seu respectivo intervalo interquartil; CTI: Centro de Terapia Intensiva.

A distribuição de sobrevida para o agrupamento dos clados ITS (**Figura 16A**) evidenciou que pacientes acometidos por isolados tipados como pertencentes ao clado ITS 3 (H2) e clado ITS 2 (H7, H9, H11 e H12) apresentaram os menores valores de sobrevida, com mediana de 6 e 8 dias, respectivamente. Enquanto os pacientes acometidos por isolados do clado ITS 4 (H5, H8 e H10) exibiram o maior tempo de sobrevida, com mediana de 122 dias. A mediana de sobrevida de 50 dias foi descrita para os pacientes relacionados aos episódios de infecções causadas por isolados do clado ITS 1.

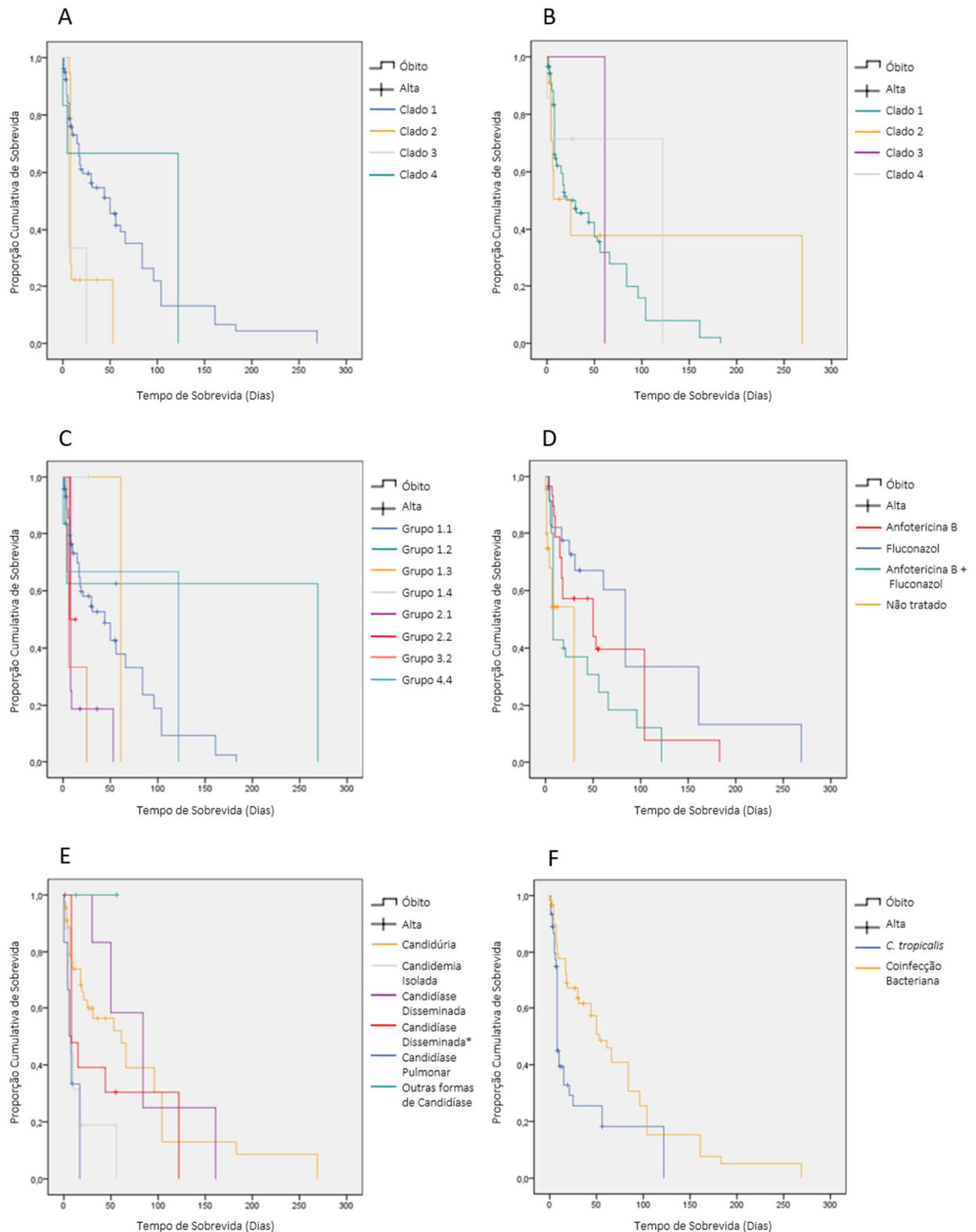
Resultados similares não foram observados na avaliação da sobrevida do agrupamento dos clados M13 (**Figura 16B**), pois o estimador de Kaplan Meier não foi capaz de evidenciar diferenças significativas para a sobrevida dos clados ($p > 0,05$). No entanto, a aplicação do teste aos agrupamentos dos clados ITS e M13 (**Figura 16C**) foi capaz de descrever um valor de *log rank* significativo ($p = 0,006$), o que permite o teste prever com propriedade as diferenças de sobrevida observadas nos primeiros seguimentos da análise.

A avaliação concatenada dos clados evidencia que os isolados classificados nos grupos 3.2 (isolados pertencentes ao clado ITS 3 e clado M13 2), 2.2 e 2.1 exibiram menor tempo de sobrevida, enquanto o maior tempo foi observado dentre os isolados do grupo 4.4. Cabe ressaltar que a análise não descreveu óbitos associados ao grupo 1.4.

A estimativa de sobrevida dos pacientes agrupados de acordo com a classificação dos quadros de candidíase por *C. tropicalis* (**Figura 16E**) demonstrou que os pacientes que apresentavam infecção pulmonar isolada e candidemia isolada evoluíram ao óbito em um menor período de tempo, enquanto os pacientes diagnosticados com candidíase disseminada com envolvimento sanguíneo exibiram mediana de sobrevida 10 vezes menor que os quadros disseminados onde não havia relato de hemocultura positiva. Entre os casos de candidúria a medida de sobrevida foi de 61 dias e entre os casos classificados como outras formas de candidíase não evidenciaram óbitos.

O estudo da sobrevida dos pacientes com base nas abordagens farmacoterapêuticas utilizadas para tratar as infecções por *C. tropicalis* (**Figura 16D**) demonstrou que os pacientes que receberam fluconazol em associação a anfotericina B evoluíram ao óbito em um menor período de tempo, enquanto pacientes que não receberam esquema antifúngico revelaram ter mediana de sobrevida de 30 dias. Dentre os esquemas, a maior sobrevida foi observada entre os pacientes tratados em esquema de fluconazol em monoterapia.

Figura 16: Análise de sobrevivência de 62 pacientes com candidíase invasiva por *C. tropicalis*.



Estimador de Kaplan Meier: teste de igualdade de distribuições de sobrevivência (*Log Rank, Breslow e Tarone-Ware*) para diferentes níveis: **(A) Clados ITS** ($p = 0,003$; $p = 0,028$; $p = 0,009$); **(B) Clados M13** ($p = 0,355$; $p = 0,610$; $p = 0,623$); **(C) Análise Concatenada dos Clados ITS.M13** ($p = 0,006$; $p = 0,194$; $p = 0,065$) / Candidíase Disseminada* - candidíase disseminada com envolvimento sanguíneo; **(D) Esquema antifúngico** ($p = 0,000$; $p = 0,001$; $p = 0,001$); **(E) Classificação dos quadros de candidíase** ($p = 0,000$; $p = 0,000$; $p = 0,000$); **(F) Coinfecção bacteriana** ($p = 0,002$; $p = 0,001$; $p = 0,001$);

Frente a existência de pacientes com coinfeção bacteriana, foi possível determinar a influência da associação fungo-bactéria no tempo de sobrevivência dos pacientes (**Figura 16F**). A análise de Kaplan Meier demonstrou que os casos em que o paciente apresentou quadro de infecção apenas por *C. tropicalis* a mediana de sobrevivência foi de 8 dias [IC95% 7,5-8,5], enquanto em pacientes coinfectados a mediana de sobrevivência observada foi de 53 dias [IC95% 34,8-71,2].

As análises de sobrevivência pelo estimador de Kaplan Meier evidenciaram importantes diferenças na sobrevivência dos pacientes inseridos no estudo, no entanto para estimar o efeito das covariáveis e a proporcionalidade dos riscos ao longo do tempo de observação foi construído um modelo de regressão de Cox (**Tabela 9**).

Tabela 9: Fatores de risco associados ao desfecho clínico de 62 pacientes com candidíase invasiva por *C. tropicalis* estimado por regressão de Cox.

Variáveis		Hazard Ratio	Intervalo de Confiança 95%	p-valor
Sonda urinária	Sim	22,31	4,230 ó 117,635	0,000
Uso de Corticosteroide	Sim	0,327	0,130 ó 0,826	0,018
Esquema Antifúngico	Anfotericina B	0,133	0,055 ó 0,320	0,000
	Fluconazol	0,078	0,028 ó 0,217	0,000
Associação Fluconazol e Anfotericina B		0,236	0,098 ó 0,568	0,001
Coinfeção Bacteriana	Não	2,252	1,152 - 4,400	0,018
Agrupamento ITS	Clado 1	6,176	2,020 ó 18,881	0,001
	Clado 2	9,653	2,957 ó 31,506	0,000
	Clado 3	12,495	2,270 ó 68,770	0,004

A regressão de Cox demonstrou que o paciente em uso de sonda urinária tem um risco 22,31 vezes maior de ir a óbito que aquele que não fez uso do dispositivo invasivo. O mesmo efeito foi atribuído aos pacientes que exibiram quadro infeccioso apenas por *C. tropicalis*. Para esses pacientes o risco de óbito é 2,25 vezes maior comparado ao risco de óbito dos pacientes coinfectados por bactérias.

O modelo também estima que infecções causadas por isolados agrupados no clado ITS 3 (H2) expõe o paciente a um risco de óbito 12,5 vezes maior quando equiparado aos quadros infecciosos desenvolvidos por isolados do clado ITS 4 (H5, H8 e H10). Relações de proteção foram atribuídas ao uso de corticoides e ao uso dos diferentes esquemas antifúngicos.

6 DISCUSSÃO

O aumento exponencial da prevalência de infecções causadas por *C. tropicalis* descreve essa espécie como um patógeno emergente em escala mundial (KOTHAVADE et al., 2010; PFALLER et al., 2014). Em países como Paquistão e Índia, *C. tropicalis* é o agente etiológico predominante dentre os casos de candidíase (VERMA et al., 2003; KOTHARI; SAGAR, 2009), na América Latina, Ásia e Oriente Médio é a CNA mais frequente dentre os casos de candidemias nosocomiais (WANG; XU; HSUEH, 2016; DA MATTA; SOUZA; COLOMBO, 2017). E em grupos de patogenias específicas como as malignidades hematológicas ou neoplasias, está associada não só a frequência de acometimentos, mas também ao prolongamento do período de internação (TANG et al., 2014; DEWAN et al., 2015; DILHARI, et al., 2016).

Os fundamentos do predomínio ou mesmo dos mecanismos de patogenicidade desse microrganismo, bem como o funcionamento da resposta imune do hospedeiro a uma infecção por *C. tropicalis* ainda não foram elucidados (KOTHAVADE et al., 2010). Muitos estudos apontam a via endógena como a principal via de infecção hematogênica, sendo a translocação dos microrganismos que compõem a microbiota do trato gastrointestinal a fonte das infecções. Fatores que alteram a microbiota ou determinem alterações no tecido epitelial de revestimento do trato gastrointestinal podem potencializar o fenômeno de translocação (COLE; HALAWA; ANAISSIE, 1996; NUCCI; ANAISSEIA, 2001; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Esse fenômeno somado a fatores predisponentes como o aumento no número de casos de pacientes gravemente imunocomprometidos eleva as taxas de morbimortalidade associadas às infecções por *C. tropicalis* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PFALLER et al., 2014; VALLABHANENI et al., 2016). Frente a esse cenário o manejo clínico correto e a determinação de um diagnóstico rápido e de qualidade têm influência direta no prognóstico do paciente acometido por um quadro de candidíase invasiva.

Na busca de realizar investigações cada vez mais eficientes e melhorar o fluxo de trabalho nos laboratórios de microbiologia clínico, surge na década de 90 o meio de cultura CHROMagar® Candida (BD Difco). Estudos descreveram o meio como uma ferramenta extremamente útil na identificação presuntiva das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* e na identificação de culturas mistas (ODDS; BERNAERTS, 1994; PFALLER; HOUSTON; COFFMANN, 1996).

No entanto, sucessivos trabalhos vêm colocando em questão a sensibilidade do teste na identificação da espécie *C. tropicalis*. Araújo e colaboradores (2005) relatam em estudo

realizado com 53 isolados, previamente identificadas por metodologia convencional, que duas das sete leveduras da espécie *C. tropicalis* identificadas no trabalho apresentaram coloração verde no meio de cultura CHROMagar® Candida (BD Difco). Sivakumar e colaboradores (2009) em avaliação de 135 casos de candidíase orofaríngea em pacientes HIV, identificaram por metodologia convencional 87 *C. tropicalis*, no entanto 2 apresentaram coloração esverdeada no meio cromogênico, dificultando a determinação da espécie.

Os achados do presente estudo corroboram com o questionamento apontado, uma vez que entre os 110 isolados identificados como *C. tropicalis* por amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr, 16 isolados exibiram coloração verde e 1 isolado apresentou coloração roxa em meio CHROMagar® Candida (BD Difco). De acordo com os dados deste estudo, o meio cromogênio apresentou sensibilidade de 84,96% [IC95% 78,42% - 91,49%] para a identificação de leveduras da espécie *C. tropicalis*. O baixo valor de sensibilidade aumenta a probabilidade de resultados falso negativos, fato que traz ressalvas a utilização do meio CHROMagar® Candida (BD Difco) como método de identificação de *C. tropicalis*.

Da mesma forma as avaliações da macromorfologia das colônias em meio de cultura SDA também não permitem a distinção de *C. tropicalis* das demais espécies do gênero *Candida*. As colônias de *C. tropicalis* cultivadas em meio SDA normalmente exibem cor creme, com variações de branco a cinza, aspecto maciço e cremoso, com superfícies que oscilam de lisa a rugosa (SUZUKI; MIYAMAE; ISHIDA, 1991; MORALEZ et al., 2014). As mesmas variações foram observadas nesse estudo, com destaque para a diversidade nos perfis de rugosidade exibidos pelos isolados.

Moralez e colaboradores (2014) demonstram que isolados de *C. tropicalis* alternam sua morfologia de forma espontânea, reversível e em alta frequência. Capacidade que inviabiliza a descrição de um perfil morfológico padrão na espécie. Essa competência exibida pela espécie está relacionada aos eventos de comutação fenotípica que permitem o microrganismo alterar suas características morfológicas, fisiológicas e patogênicas (LAN et al., 2002).

Dada a confirmação da competência da espécie em realizar comutação, as variações observadas em testes fenotípicos de identificação podem ser atribuídas em certo grau a alterações fisiológicas do isolado e não necessariamente a uma falha do teste. No entanto, a falta de capacidade de o método prever tais eventos se torna uma limitação para o seu uso. As alterações de cores observadas no estudo, para os isolados de *C. tropicalis* semeados em meio CHROMagar® Candida (BD Difco) é um exemplo relacionado a uma provável alteração

da fisiologia do microrganismo, uma vez que o teste é um método fenotípico baseado na degradação enzimática de substrato cromógeno.

Variações fisiológicas também foram observadas durante avaliação bioquímica dos isolados em sistema Vitek® 2 YST Card. A análise automatizada apresentou 17 perfis bioquímicos distintos compatíveis com a identificação de *C. tropicalis*. No entanto, o sistema não conseguiu identificar 4 dos 110 isolados testados. De acordo com os dados deste estudo, o método descreveu sensibilidade de 96,46% [IC95% 93,08% - 99,84%] para a identificação de *C. tropicalis*. Resultado superior ao publicado por Nath e colaboradores (2017) que descreveram sensibilidade de 88,89% para a identificação dessa espécie no sistema.

Apesar dos expressivos valores de sensibilidade as metodologias fenotípicas não oferecem aporte de dados suficientes que permita identificar a diversidade de espécies patogênicas pertencentes ao gênero *Candida*, uma vez que novas espécies vem sendo relatadas continuamente, a exemplo das espécies de *C. africana* e *C. auris* (LEE et al., 2011; BORMAN, et al., 2013; CHOWDHARY et al., 2013). Mesmo com todos os esforços realizados até o momento, ainda existem problemas na discriminação de espécies crípticas do gênero *Candida*, devido à proximidade entre as espécies (ROMEO; CRISEO, 2010; BRANDT; LOCKHART, 2012).

Contudo, a aplicação de técnicas moleculares de avaliação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr tem se mostrado a principal alternativa na identificação dos agentes etiológicos fúngicos. A região do DNA ribossomal apresenta alta conservação intraespecífica e exibe variações entre as diferentes espécies, fato que permite sua aplicabilidade na identificação de leveduras de importância médica (IRINYI et al., 2015).

A amplificação e posterior sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr foi adotada neste trabalho como padrão de referência para a identificação dos isolados. A avaliação da região foi capaz de identificar todos os isolados do estudo com alto percentual de identidade. Além de fornecer bases sólidas para a compreensão da diversidade genética intraespecífica, por meio da tipagem dos isolados de acordo com os polimorfismos de nucleotídeo único encontrados na sequência do DNA ribossomal.

Em estudo similar, Merseguel e colaboradores (2015) avaliaram a diversidade genética intraespecífica em 41 isolados de *C. tropicalis* obtidos de pacientes com candidíase disseminada e descreveram a espécie como tendo uma região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr com 437 pb de comprimento, 11 sítios de variabilidade nucleotídica e diversidade haplotípica de 0,7500. O trabalho apontou 5 sítios de variação na região ITS1, 1 sítio de variação na região

5.8S e outros 5 sítios na região ITS2, dentre os quais o maior número de polimorfismos foi descrito na posição 356 (MERSEGUEL et al., 2015).

Os resultados obtidos neste estudo também descrevem a região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr da espécie com 437 pb de comprimento, apontam 13 sítios de variabilidade nucleotídica, entre os quais 6 (68, 72, 237, 237, 310, 356 e 393) são concordantes com os pontos de polimorfismos apresentados por Merseguel e colaboradores (2015), com destaque para o polimorfismo do sítio 237 que ocorre dentro da região 5.8S. No entanto, o maior número de alterações nucleotídicas foi descrito na posição 393.

Em outro importante estudo da região ITS, Irinyi e colaboradores (2015) avaliaram 27 cepas de *C. tropicalis*, descreveram 13 sítios de polimorfismo e diversidade nucleotídica de 0,00352, valor esse superior ao apresentado por Merseguel e colaboradores (2015) de 0,00182 e o observado neste estudo de 0,00230. Essa medida sugere um expressivo número médio de diferenças por sítios entre as sequências avaliadas.

O alto valor de diversidade haplotípica observado no presente estudo corrobora com os achados já descritos na literatura e sugere que a espécie *C. tropicalis* apresenta uma alta variabilidade intraespecífica. Característica essa que vêm sendo observada em espécies comensais que apresentam um perfil endógeno de infecção e sugere a existência de adaptação genética as microvariações nos diferentes sítios anatômicos por mecanismos que aumentam a variabilidade genética (NISHIKAKU; MELO; COLOMBO, 2010; MERSEGUEL et al., 2015). A considerar que a reprodução assexuada de *C. tropicalis* apresenta uma natureza clonal, os eventos de mutabilidade genética podem estar associados a um ciclo reprodutivo parasexual, onde os eventos de recombinação podem ocorrer por permutação gênica mitótica ou haploidização (SEERVAI et al., 2013).

A investigação polimórfica da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr ainda foi capaz de discriminar os isolados do estudo em 12 haplótipos que descrevem a epidemiologia da espécie na unidade hospitalar estudada. Mas não delinea relação espacial específica o que corrobora com o sugerido por Al-Obaid e colaboradores (2017) que descrevem a transmissão nosocomial de *C. tropicalis* como um evento que se dá de forma rara entre pacientes hospitalizados.

A avaliação das redes haplotípicas apresenta a hipótese de um eixo precursor formado pelos haplótipos H1, H3, H4 e H6, que edifica a rede em 4 öclustersö. Essa estrutura, pautada em um centro organizador também foi visualizada no estudo da rede de haplótipos construída com base nas sequências depositadas no NCBI/GenBank, onde podemos observar o

agrupamento de isolados de diferentes origens e a distribuição global desses haplótipos precursores (Figuras 10 e 11).

A partir do eixo hipotético é possível notar a predominância de uma relação de exclusividade entre haplótipos e seus países, o que pode sugerir envolvimento das características ambientais no processo de variabilidade genética das leveduras. Relações de compartilhamento de haplótipos específicos fora do eixo central da rede são apenas observadas nos haplótipos H23 (São Paulo, China, Irã e Grécia) e H16 (São Paulo, Ceará e na França). Dessa forma, frente às relações filogenéticas e ao fato de *C. tropicalis* pertencer à microbiota anfibiôntica, cabe questionar a influência dos processos de globalização e fluxo migratório de pessoas na dispersão de haplótipos específicos, ou mesmo a interferência de relações coloniais como as estabelecidas entre França e a região nordeste do Brasil.

Contudo, a avaliação das redes haplotípicas centrada na ideia de um eixo precursor formado pelos haplótipos H1, H3, H4 e H6 fundamenta a hipótese de um processo de especiação, mas apenas uma análise com um maior número de sequências e que avalie a ancestralidade dos isolados poderia embasar ou refutar essa hipótese. Diante dos resultados, o estudo também apresenta dados que apontam a avaliação do polimorfismo da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr como um ótimo marcador genético, não só aplicável a identificação de espécies, mas também ao estudo das relações filogenéticas em um contexto clínico (MERSEGUEL et al., 2015).

Frente a necessidade da utilização de ferramentas moleculares que permitam avaliar a diversidade genética, determinar eventos de infecções multitypos ou processos de seleção de microrganismos, cresce a aplicação da técnica de DNA *õFingerprintingö* como uma alternativa de baixo custo. Meyer e colaboradores (1997) e Ásmundsdóttir e colaboradores (2008) relatam o caráter discriminatório dos iniciadores (*primers*): T3B (*primer* universal), M13 (*primer* minissatélite), (GTG)₅ e (GACA)₄ (*primers* microssatélites) aplicados no estudo de isolados do gênero *Candida*.

A aplicação DNA *õFingerprintingö primer* M13 neste trabalho, demonstrou o poder discriminatório da técnica para a tipagem de leveduras da espécie *C. tropicalis*. Os sete perfis moleculares caracterizados no estudo exibiram um sinal de identidade formado por 4 bandas com tamanhos entre 1000 ó 1500 pb observado em todos os perfis. Relações de alta similaridade foram observadas entre os perfis 1, 2 e 4 (Clado M13 1) e entre os perfis 3 e 7 (Clado M13 2). Além dessas características, também destacou-se a correspondência entre os isolados tipados com o perfil 5 (Clado M13 4) e o agrupamento dos mesmo nos haplótipos H5, H8 e H10 (Clado ITS 4). Essa correlação específica se destaca por agrupar cepas que

apresentam polimorfismo no sítio 237 da região 5.8S do DNA ribossomal, onde de acordo com Elela e colaboradores (1994) mutações podem alterar a capacidade funcional do RNA ribossômico no processo de alongamento da proteína.

No entanto, a técnica de DNA *õFingerprintingö primer* M13 demonstrou baixo grau de concordância ($kappa = 0,313$) com os haplótipos descritos na análise da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr, fato compreensível uma vez que as técnicas avaliam regiões distintas do genoma da levedura. Enquanto a análise do DNA ribossômico se atém a um fragmento específico, a técnica de DNA *õFingerprintingö* avalia as diferentes regiões minissatélites encontradas em todo o genoma.

Na avaliação clínica dos 62 casos inseridos no estudo foi observado um perfil de acometidos que corrobora com a literatura (COLOMBO et al., 2014; FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2015) onde o paciente em geral apresenta idade superior a 60 anos e busca o atendimento hospitalar principalmente devido a progressão de doenças crônico-degenerativas ou discrasias hematológicas e/ou neoplásicas. Durante o período de internação os pacientes apresentaram um quadro de anemia normocrômica e normocítica com grau moderado de anisocitose, característico de pacientes de alta complexidade.

O quadro anêmico de alguns dos pacientes pode ser descrito, dentro da multifatorialidade que envolve as alterações dos índices hematológicos, como uma anemia de doença crônica, uma síndrome clínica que acomete paciente que apresentam doenças infecciosas crônicas, inflamatórias ou neoplásicas. Essa síndrome tem como aspecto peculiar a presença de anemia associada à hipoferremia e redução da capacidade total de ligação do ferro, embora a concentração de ferro medular possa ou não estar alterada (CANÇADO; CHUATTONE, 2002).

Um dos três principais mecanismos patológicos envolvidos nessa síndrome é a diminuição da sobrevivência da hemácia (CANÇADO; CHUATTONE, 2002), fato que hipoteticamente pode ser potencializado ou estar associado ao quadro da candidíase por *C. tropicalis*. Segundo as descrições de Furlaneto e colaboradores (2015), essa espécie quando na presença de eritrócitos humanos é induzida a aumentar a expressão fenotípica do fator hemolítico e dos níveis transcricionais do gene *HLPt*. No entanto, novos ensaios controlados precisam ser realizados para confirmar essa hipótese.

No que tange o perfil leucocitário dos pacientes foi observado que menos de 40% desenvolveram leucocitose, dado que corrobora com o descrito por Blot e colaboradores (2002). Cabe ainda destacar que a leucometria específica descreve uma prevalência de células polimorfonucleadas dentre esses leucócitos.

A avaliação da evolução clínica demonstrou que 69% dos pacientes inseridos no estudo foram a óbito em um período de tempo médio de 15 dias e que fatores de risco como uso de sonda urinária [OR 84,4, IC95% 4,4-1634,2], submissão ao procedimento de transfusão sanguínea [OR 8,0, IC95% 1,1-56,8], internação no CTI [OR 77,7, IC95% 3,7-1651,3] e o não uso de antifúngicos [OR 4,5, IC95% 1,3-15,1] estão associados a um aumento da probabilidade de óbito.

Colombo e colaboradores (2014) descreveram em estudo retrospectivo que avaliou 1392 episódios de candidemia que idade avançada e tratamento com corticosteroides são preditores de mortalidade, enquanto o tratamento com equinocandina foi associado a uma maior probabilidade de sobrevivência. Liu e colaboradores (2019) em avaliação a 248 casos de candidemia por *C. tropicalis* evidenciaram uma mortalidade bruta em um período de 30 dias de 52%, onde o alto índice de comorbidade [OR 2,09, IC95% 1,22-3,59], e um quadro de neutropenia [OR 4,61, IC95% 1,42-15,00] foram associados a desfecho.

Agravante ao quadro descrito Liu e colaboradores (2019) estudo descreve o risco da disseminação hematogênica da espécie *C. tropicalis* estimando como fatores: idade [OR: 1,01; *p*-valor = 0,05], leucemia subjacente [OR: 4,77; *p*-valor = 0,001] e doença pulmonar crônica [OR: 2,62; *p*-valor = 0,002], no entanto, a remoção precoce do cateter venoso central exerceu papel protetor (FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2015).

Na busca de investigar as possíveis correlações entre as características genotípicas dos isolados e os aspectos clínicos dos quadros de candidíase, a análise de sobrevida evidenciou a existência de diferença estatisticamente significativa entre o tempo de sobrevivência dos pacientes acometidos por diferentes genótipos. Genótipos esses definidos pela avaliação de polimorfismo da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr. A análise descreveu que os pacientes que apresentaram infecção por cepas pertencentes ao clado ITS 3 (H2) exibiram o menor tempo de sobrevida e maior risco de óbito [*Hazard Ratio* (HR) 12,49, IC95% 2,27-68,77] comparados aos pacientes acometidos por isolados do clado ITS 4 (H5, H8 e H10) que sobreviveram por maior tempo. As cepas agrupadas no clado ITS 4 apresentam mutação na região 5.8S e provável alteração no mecanismo de síntese proteica, fato que pode alterar produção de fatores de virulência e por conseguinte a capacidade patogênica do isolado.

Dentre as diversas metodologias de avaliação genotípica, Bai (2014) destaca a aplicação da técnica de DNA *õFingerprintingö* na tipagem molecular de isolados de *C. albicans* e sua relação com a descoberta de associações entre genótipos específicos e tipos de infecções, e a perfis de sensibilidade aos azólicos. No entanto, neste estudo a análise de sobrevida, quando aplicada aos genótipos determinados pela técnica DNA *õFingerprintingö*

primer M13, não demonstrou resultado significativamente estatístico, fato que pode ser atribuído a destruição desigual de isolado entre os perfis moleculares, a exemplo do perfil molecular 6 que apresenta apenas um isolado que sozinho representa o clado M13 3. Essa limitação também se estende a análise de sobrevida dos genótipos concatenados.

A avaliação da sobrevida dos pacientes de acordo com a classificação dos quadros de candidíase evidenciou que os quadros de infecções disseminadas associadas a fungemias exibem sobrevida 10 vezes menor que os quadros disseminados que não apresentam hemocultura positiva. Essas observações concordam com o exposto por Chen e colaboradores (2014) que relatam o aumento da taxa de óbitos relacionada a quadros de disseminação com envolvimento hematogênico comprovado. A análise estatística também evidencia que os quadros de candidúria exibiram o maior tempo de sobrevida, no entanto 65% dos casos evoluíram ao óbito. Fato que corrobora com as descrições que associam os eventos de candidúria a altas taxas morbimortalidade e ao prolongamento do tempo de hospitalização, atribuindo alto custo para o sistema de saúde (GARCÍA-AGUDO; RODRÍGUEZ-IGLESIAS; CARRANZA-GONZÁLEZ, 2018).

Outro agravante a esse cenário é o aumento de cepas de *C. tropicalis* resistentes aos antifúngicos (DA MATTA; SOUZA; COLOMBO, 2017). Liu e colaboradores (2019) em avaliação dos casos de candidemia por *C. tropicalis* em 5 hospitais terciária de Taiwan, observaram a relação da espécie com altas taxas de mortalidade e descreveram o uso de tratamento antifúngico à base de fluconazol ou voriconazol como fator protetor, independente das concentrações inibitórias mínimas, quando comparados aos pacientes não tratados. Fernández-Ruiz e colaboradores (2015) descreveram os mesmos achados em estudo envolvendo 29 unidades hospitalares na Espanha.

Os resultados deste estudo corroboram com os dados apresentados, uma vez que descreve o efeito protetor do uso fluconazol [HR 0,078, IC95% 0,028-0,217], no entanto o uso de anfotericina B desoxicolato [HR 0,133, IC95% 0,055-0,320] e o uso da associação desses fármacos [HR 0,236, IC95% 0,098-0,568] exibiram um maior efeito protetor. Outros estudos também descreveram o aumento da probabilidade de sobrevivência dos pacientes em uso de formulação lipídica de anfotericina B e de equinocandinas (COLOMBO et al., 2014; BASSETTI et al., 2015).

Dada a multifatorialidade dos quadros também foi observado que mesmo utilizando o esquema antifúngico de maior efeito protetor, os pacientes que utilizaram o esquema de associação apresentaram uma menor sobrevida. Tal fato pode estar associado a gravidade dos casos, ao status imunológico do paciente e as doenças de base relacionadas.

Com o aumento do número de casos de coinfeções envolvendo agentes fúngicos e bacterianos surge a necessidade de compreender as interações existentes nessa relação comensal. Estudos desenvolvidos no modelo *C. albicans* associam a virulência da espécie, dentre outras características, a sua capacidade de oscilar entre um estado morfológico leveduriforme comensal e um estado filamentosamente oportunista (GOW et al., 2012; HUANG, 2012). Entretanto essa capacidade de realizar comutação morfológica é afetada pela presença da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (HOGAN; VIK; KOLTER, 2004). O potencial inibitório dessa bactéria não fermentadora também foi descrita sobre a atividade patogênica das espécies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (XU et al., 2014).

Dentre os pacientes inseridos no estudo 58% apresentavam coinfeção bacteriana, em determinados casos envolvendo múltiplos agentes. No entanto, as duas bactérias mais frequentes nas coinfeções foram o Grupo *Acinetobacter baumannii* (64%) e *Pseudomonas aeruginosa* (42%), ambos bacilos gram negativo não fermentadores. A interação desses microrganismos com a *C. tropicalis* pode estar diretamente relacionada ao aumento da sobrevivência dos pacientes coinfectados, enquanto, a monoinfeção por *C. tropicalis* aumenta o risco de óbito [HR 2,25, IC95% 1,15-4,40] entre esses pacientes.

A análise multivariada ainda descreveu como fatores independentemente associados à mortalidade o uso de sonda vesical de demora [HR 22,31, IC95% 4,23-117,64], informação contundente com a literatura. Mas, a análise atribuiu um efeito protetor ao uso de corticosteroides [HR 0,327, IC95% 0,130-0,826] dado contrário ao que normalmente vem sendo apresentado na literatura, a exemplo do estudo de Klingspor e colaboradores (2015) que descreve o uso de corticosteroides associado ao aumento do risco de óbito [HR 1,5, *p*-valor = 0,03]. Para o maior entendimento dessa informação em específico, será necessário avaliar não somente o uso, mas também o esquema adotado na terapêutica.

A avaliação dos diferentes episódios de infecção com múltiplos isolados de *C. tropicalis* associados (APÊNDICE E), envolveu uma análise concatenada baseada na rede de haplótipos gerada pela análise da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr, nos perfis moleculares estabelecidos pelo DNA *õFingerprintingõ primer* M13, nos padrões cromogênicos determinados em meio CHROMagar® Candida (BD Difco), nos perfis bioquímicos determinados pelo sistema Vitek® 2 YST Card e na análise da morfologia das colônias em meio de cultura SDA.

Dentre os 25 casos que detinham múltiplos isolados relacionados ao quadro de candidíase, evidenciou que 9 pacientes apresentavam cepas de perfis genotípicos idênticos identificadas no mesmo sítio anatômico, em amostras coletadas em diferentes períodos de

tempo. Outros 4 pacientes exibiam cepas isoladas em pelo menos dois diferentes sítios, no entanto essas cepas apresentavam perfis genotípicos idênticos. Os achados sugerem que a infecção foi desenvolvida em ambos os casos por um único genótipo e reforça o potencial da espécie *C. tropicalis* em se disseminar (FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2015). Os perfis haplotípicos predominantes nesses indivíduos foram H1, H3 e H4 oriundos do eixo precursor (Clado ITS 1) e perfis M13 1, 2 e 4 (Clado M13 1).

Ainda em análise desses 13 casos, nos quais há evidências de que a infecção foi desenvolvida por um único genótipo é possível observar padrões fenotípicos distintos, esta observação corrobora com a descrição da capacidade de isolados de *C. tropicalis* realizarem comutação fenotípica para se adaptar aos diferentes microambientes (LIAN et al., 2003; LAFFEY; BUTLER, 2005; ZANG, et al., 2016). Alguns autores afirmam que essa mudança fenotípica, provavelmente induz alterações na fisiologia e patogenicidade do microrganismo sendo considerado de grande importância na sua adaptação a mudanças ambientais e durante o processo de invasão do hospedeiro (LIAN et al., 2003; LAFFEY; BUTLER, 2005; ODDS et al., 2006).

Cabe destacar, que três casos dentre os 13 em discussão, apresentaram cepas de perfis genotípicos e fenotípicos idênticos nas distintas amostras, sugerindo nestes isolados uma aparente estabilidade genética e conseqüentemente perfis de expressão gênica preservados (Casos 5, 17 e 23).

Como discutindo anteriormente, a baixa concordância entre as discriminações realizadas pelos diferentes marcadores moleculares utilizados no estudo, permitiu a observação de 7 casos (6, 10, 13, 18, 20, 22, 25) em que os isolados envolvidos na infecção apresentavam o mesmo haplótipo, porém perfis M13 distintos. Soll e colaboradores (2000) preconiza que técnicas moleculares que visam avaliar subtipos genotípicos devem ter a capacidade de discriminar cepas não relacionadas, reconhecer cepas idênticas em amostras distintas e reconhecer cepas relacionadas, embora não idênticas, como as cepas envolvidas em processos de microevolução.

As metodologias aplicadas neste estudo evidenciaram nos casos 2, 3, 6, 8, 10, 11 e 16 a presença de dois ou mais genótipos isolados do mesmo paciente, representada pela presença de haplótipos e perfil M13 completamente distintos. No caso 11, além de ter sido possível observar a presença de três haplótipos distintos H5, H8 e H10 o perfil M13 5 foi idêntico e associado a todos os haplótipos.

O caso 6 foi considerado o mais impactante, onde obtivemos a presença de 12 isolados e 3 haplótipos diferentes H9, H11, H12 mostrando uma dinâmica informativa do ponto de

vista epidemiológico. A estratificação dos achados correlacionados a fungemia descreve o envolvimento de dois diferentes genótipos (haplótipo H11 de perfil M13 2 e haplótipo H11 de perfil M13 4) que se alternaram durante a evolução clínica e a inserção de outros dois genótipos (haplótipo H9 de perfil M13 2 e haplótipo H12 de perfil M13 1), evento possível correlacionado com o trânsito do paciente da unidade TMO para o CTI. Durante a evolução do paciente ainda foi descrito a disseminação do patógeno pelo isolamento do genótipo haplótipo H9 de perfil M13 2, em amostra de urina. As ocorrências dos eventos podem estar relacionadas a um processo de microevolução ou mesmo que raro, a uma contaminação cruzada no ato do cuidado de saúde (AL-OBAID et al., 2017).

As metodologias empregadas nesse estudo demonstraram robustez e poder discriminatório para avaliar os perfis genotípicos possivelmente circulantes na unidade hospitalar, elucidando aspectos epidemiológicos, identificando prováveis correlações clínicas e fundamentando a base do conhecimento para desenvolvimento de políticas de saúde com foco na redução das taxas de morbimortalidade das infecções causadas por *C. tropicalis*.

7 CONCLUSÃO

A identificação de *C. tropicalis* em meio CHROMagar® Candida apresentou baixo valor de sensibilidade, fato que aumenta a probabilidade de resultados falso negativos e institui ressalvas quanto a utilização do meio como método de identificação da espécie.

Dada a alta frequência de alternância morfológica dos isolados de *C. tropicalis*, as avaliações da macromorfologia das colônias em meio de cultura SDA não permitem descrição de um perfil morfológico padrão na espécie.

Os resultados gerados pelo sistema Vitek® 2 YST Card mostrou uma grande diversidade de perfis bioquímico compatíveis a identificação correta de *C. tropicalis*. No entanto, as perdas possivelmente não estão relacionadas apenas a prováveis erros, mas também a variações na expressão gênica ou eventos de comutação fenotípica.

De acordo com a variabilidade fenotípica observada dentre os isolados de *C. tropicalis* torna-se recomendável o uso de uma abordagem de taxonomia polifásica para determinar o correto diagnóstico da espécie.

O estudo apresenta dados que apontam a avaliação do polimorfismo da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr como um ótimo marcador genético, não só aplicável a identificação de isolado de *C. tropicalis*, mas também ao estudo da diversidade genética intraespecífica, por meio da tipagem dos isolados de acordo com os polimorfismos de nucleotídeo único encontrados na sequência do DNA ribossomal.

A avaliação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr de isolados de *C. tropicalis* exibiu uma alta variabilidade intraespecífica.

A rede haplotípica dos isolados de acordo com os polimorfismos de nucleotídeo único encontrados na sequência do DNA ribossomal de isolados de *C. tropicalis* evidenciou a organização de um eixo precursor formado por haplótipos que estão distribuídos globalmente.

A aplicação do DNA *õFingerprintingö primer* M13 neste trabalho, demonstrou o poder discriminatório da técnica para a tipagem de leveduras da espécie *C. Tropicalis*, permitindo classificar isolados altamente relacionados e em menor densidade estratificou perfis que agruparam isolados que apresentavam mutações em regiões críticas do DNA ribossomal.

Ambas as metodologias moleculares exibiram boa capacidade discriminatória. No entanto, as técnicas apresentaram relativa concordância entre seus resultados.

A região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr foi parcialmente robusta para o entendimento da distribuição dos perfis M13, entretanto nota-se com veemência que há necessidade de inserção da análise de outros genes que sejam capazes de estratificar os perfis M13 (1,2,4,5,6,7) presente no haplótipo H1.

Não foram evidenciadas relações específicas entre os genótipos e as unidades do hospital ou mesmo entre os distintos quadros de candidíase.

A variabilidade intraespecífica encontrada na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr analisada em uma rede haplotípica promoveu inferências importantes para um maior entendimento na epidemiologia da *C. tropicalis* no que tange aos haplótipos circulantes e em sua relação/influencia na sobrevida do paciente.

O estudo do curso clínico dos quadros de candidíase por *C. tropicalis* descreve alta mortalidade e atribui risco ao uso de dispositivo vesical de demora e a não adoção de um esquema terapêutica antifúngico, no entanto descreve efeito protetor nos eventos de coinfeção bacteriana.

REFERÊNCIAS

- ABBEELE, A. V. et al. Denture contamination by yeasts in the elderly. **Gerodontology**, Oxford, v. 25, n. 4, p.222-228, dez. 2008.
- ALBY, K.; SCHAEFER, D.; BENNETT, R. J. Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. **Nature**, London, v. 460, n. 7257, p. 8906893, 2009.
- AL-OBAID, K.; ASADZADEH, M.; AHMAD, S. et al. Population structure and molecular genetic characterization of clinical *Candida tropicalis* isolates from a tertiary-care hospital in Kuwait reveal infections with unique strains. **PloS one**, San Francisco, v. 12, n. 8, p. e0182292, 2017.
- ALP, S.; ARIKAN-AKDAGLI, S.; GULMEZ, D. et al. Epidemiology of candidaemia in a tertiary care university hospital: 10-year experience with 381 candidaemia episodes between 2001 and 2010. **Mycoses**, Berlin, v.58, n.8, p.498-505, aug. 2015.
- ARAUJO, C. R, MIRANDA, K. C, PASSOS, X. S. et al. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMagarR *Candida*. **Revista De Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 1, p. 37-42, 2005.
- ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M., SILVA, S. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. **Trens in Microbiology**, Cambridge, v.25, n.1, p.62-75, jan. 2017.
- ÁSMUNDSDÓTTIR, L. R. et al. Molecular Epidemiology of Candidemia: Evidence of Clusters of Smoldering Nosocomial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 47, n. 2, p.17-24, jul. 2008.
- BAI, F.Y. Association of genotypes with infection types and antifungal susceptibilities in *Candida albicans* as revealed by recent molecular typing strategies. **Mycology**, Abingdon, v. 5, n. 1, p. 169, 2014.
- BALASUNDARAM, S. V.; ENGH, I. B.; SKREDE, I. et al. How many DNA markers are needed to reveal cryptic fungal species? **Fungal Biology**, Amsterdam, v.119, n.10, p.940-5, out. 2015.
- BARBEDO, L.S.; SGARBI, D. B. G. Candidiase. DST ó **Jornal Brasileiro de Doencas Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v.22, n.1, p.22-38, 2010.
- BASSETTI, M.; MERELLI, M.; ANSALDI, F.; et al. Clinical and Therapeutic Aspects of Candidemia: A Five Year Single Centre Study. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 5, p. e0127534, 2015.
- BENSON, P. M.; ROTH, R. R.; HICKS, C. B. Nodular subcutaneous abscesses caused by *Candida tropicalis*. **Journal of the American Academy Dermatology**, St. Louis, v. 16, p. 6236624, mar, 1987.

BERMAN, J.; HADANY, L. Does stress induce (para) sex? Implications for *Candida albicans* evolution. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v.28, n.5, p.197-203, fev. 2012.

BLOT, S. I.; VANDEWOUDE, K. H.; HOSTE, E. A. et al. Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 113, n. 6, p. 480-485, 2002.

BORMAN, A. M.; SZEKELY, A.; LINTON, C. J. et al. Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity of *Candida africana* isolates from the United Kingdom. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.51, n.3, p.967-72, mar. 2013.

BOUGNOUX, M. E.; MORAND, S.; D'ENFERT, C. Usefulness of Multilocus Sequence Typing for Characterization of Clinical Isolates of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 4, p.1290-1297, 1 abr. 2002.

BRANDT, M. E.; LOCKHART, S. R. Recent Taxonomic Developments with *Candida* and Other Opportunistic Yeasts. **Current Fungal Infection Reports**, Philadelphia, v. 6, n. 3, p.170-177, 24 jun. 2012.

BURNIE, J. P.; ODDS, F. C.; LEE, W.; WEBSTER, C.; WILLIAMS, J. D. Outbreak of systemic *Candida albicans* in intensive care unit caused by cross infection. **British Medical Journal (Clinical Research Ed.)**, London, v. 290, n. 6470, p. 746-748, mar. 1985.

CANÇADO, R. D.; CHIATTONE, C. S. Anemia de doença crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 127-136, 2002.

CARVALHO, A. et al. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. **Medical Mycology**, Oxford, v. 45, n. 7, p. 619-627, nov. 2007.

CASTELLANI, A. Observations on the fungi found in tropical bronchomycosis. **The Lancet**, Kidlington, v.179, p.13-15, jan. 1912.

CHAI, L. Y.; DENNING, D. W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews In Microbiology**, London, v. 36, n. 4, p.282-298, 30 set. 2010.

CHAI, Y. A. et al. Predominance of *Candida tropicalis* bloodstream infections in a Singapore teaching hospital. **Medical Mycology**, Oxford, v. 45, n. 5, p.435-439, jan. 2007.

CHAKRABARTI, A.; REDDY, T. C.; SINGHI, S. Does candiduria predict candidaemia? **The Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.106, n.6, p. 513-516, dez. 1997.

CHANDER, J.; SINGLA, N.; SIDHU, S. K. et al. Epidemiology of *Candida* blood stream infections: experience of a tertiary care centre in North India. **The Journal of Infection in Developing Countries**, [S.I.], v. 7, n. 09, p. 670-675, 2013.

CHAPMAN, B.; SLAVIN, M.; MARRIOTT, D. Changing epidemiology of candidaemia in Australia. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.72, n.4, p. 1103-1108, abr. 2017.

CHARONE, S.; PORTELA, M. B.; MARTINS, K. O. et al. Role of *Candida* species from HIV infected children in enamel caries lesions: an in vitro study. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v.25, n.1, p.53-60, jan. 2017.

CHEN, Y. L.; YU, S. J.; HUANG, H. Y. et al. Calcineurin controls hyphal growth, virulence, and drug tolerance of *Candida tropicalis*. **Eukaryotic Cell**, Washington, v.13, n.7, p.844-54, jul. 2014.

CHOU, H. H.; LO, H. J.; CHEN, K. W.; LIAO, M. H.; LI, S. Y. Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows clonal cluster enriched in isolates with resistance or trailing growth of fluconazole. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 58, n. 4, p.427-433, ago. 2007.

CHOWDHARY, A. et al. An outbreak of candidemia due to *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit. **Mycoses**, Berlin, v. 46, n. 8, p. 2876292, ago. 2003.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; DUGGAL, S. et al. New Clonal Strain of *Candida auris*, Delhi, India. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 19, n. 10, p.1670-1673, out. 2013.

CHRISTENSEN, W. B. Urea Decomposition as a Means of Differentiating Proteus and Paracolon Cultures from Each Other and from Salmonella and Shigella Types. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 52, n. 4, p. 4616466, out. 1946.

CIARDO, D. E.; LUCKE, K.; IMHOF, A.; BLOEMBERG, G.V.; BOTTGER, E. C. Systematic Internal Transcribed Spacer Sequence Analysis for Identification of Clinical Mold Isolates in Diagnostic Mycology: a 5-Year Study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 8, p.2809-2813, 23 jun. 2010.

CLARK, T. A.; SLAVINSKI, S. A.; MORGAN, J. et al. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 10, p. 44686-4472, out. 2004.

COLE, G. T.; HALAWA, A. A.; ANAÏSSE, E. J. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 22, p. 73-88, 1996.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R. et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 34, n. 4, p. 2816286, 1999.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. [Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp]. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 5, p. 5996607, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J. et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44, n.8, p.2816-2823, ago. 2006.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SUKIENIK, T. et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 40, n. 10, p. 1489-1498, 2014.

COOKE, V. M.; MILES, R. J.; PRICE, R. G. et al. New Chromogenic Agar Medium for the Identification of *Candida* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 7, p.3622-3627, 1 jul. 2002.

CORZO-LEON, D. E.; ALVARADO-MATUTE, T.; COLOMBO, A. L. et al. Surveillance of *Candida* spp Bloodstream Infections: Epidemiological Trends and Risk Factors of Death in Two Mexican Tertiary Care Hospitals. **Plos One**, San Francisco, v.9, n.5, e97325, 2014.

COSTA, C. R. et al. Species Distribution and Antifungal Susceptibility Profile of Oral *Candida* Isolates from HIV-infected Patients in the Antiretroviral Therapy Era. **Mycopathologia**, The Hague, v. 162, n. 1, p.45-50, jul. 2006.

CRISEO, G.; SCORDINO, F.; ROMEO, O. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 111, p.50-56, abr. 2015.

CULLEN, P. J.; SPRAGUE, G. F.; The Regulation of Filamentous Growth in Yeast. **Genetics**, Austin, v. 190, n. 1, p. 23649, 2012.

DA COSTA, V. G.; QUESADA, R. M.; ABE, A. T. et al. Nosocomial Bloodstream *Candida* Infections in a Tertiary-Care Hospital in South Brazil: A 4-Year Survey. **Mycopathologia**, The Hague, v. 178, n. 364, p. 2436250, 2014.

DAEF, E.; MOHARRAM, A.; ELDIN, S. S. et al. Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. **Brazilian Journal Microbiology**, Rio de Janeiro, v.45, n.1, p.255-62, 2014.

DA MATTA, D. A.; DE ALMEIDA, L. P.; MACHADO, A. M. et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v.57, n.4, p.399-404, abr. 2007.

DA MATTA, D. A.; SOUZA, A. C. R.; COLOMBO, A. L. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. **Journal of Fungi**, Basel, v.3, n.2, pii: E24, mai. 2017.

DE FREITAS, E. M.; NOBRE, S. A. M.; PIRES, M. B. O. Oral *Candida* species in head and neck cancer patients treated by radiotherapy. **Auris Nasus Larynx**, Tokyo, v.40, n.4, p.400-404, ago. 2013.

DE MELLO, T. P.; DE SOUZA RAMOS, L.; BRAGA-SILVA, L. A. et al. Fungal Biofilm - A Real Obstacle against an Efficient Therapy: Lessons from *Candida*. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 17, n. 17, p. 1-18, 2017.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. **International Journal of Microbiology**, Nasr City, v.2014, p.456878, 2014.

DEWAN, E.; BISWAS D.; KAKATI, B. et al. Epidemiological and mycological characteristics of candidemia in patients with hematological malignancies attending a tertiary-care center in India. **Hematology Oncology Stem Cell Therapy**, Riyadh, v.8, n.3, p.99-105, set. 2015.

DIGNANI, M.; SOLOMKIM, J.; ANAÏSSE, E. Candida. In: ANAÏSSE, E.; MCGINNIS, M.R.; PFALLER, M.A. editors. **Medical Mycology**. 1. ed. Filadélfia: Churchill Livingstone, 2003.

DILHARI, A.; WEERASEKERA, M. M.; SIRIWARDHANA, A. et al. *Candida* infection in oral leukoplakia: an unperceived public health problem. **Acta Odontologica Scandinavica**, Stockholm, v.74, n.7, p.565-569, out. 2016.

DOEBBELING, B. N. et al. Comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis with Isoenzyme Profiles as a Typing System for *Candida tropicalis*. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 16, n. 3, p.377-383, mar. 1993.

DORKO, E.; VIRAGOVA, S.; PILIPCINEC, E.; TKACIKOVA, L. *Candida* agent of the diaper dermatitis? **Folia Microbiologica (Praha)**, New York, v. 48, n. 3, p. 3856388, 2003.

ELELA, S. A.; GOOD, L.; MELEKHOVETS, Y. F. et al. Inhibition of protein synthesis by an efficiently expressed mutation in the yeast 5.8S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, n. 4, p. 6866693, 1994.

ELIAKIM-RAZ, N.; BABAOFF, R.; YAHAV, D. et al. Epidemiology, microbiology, clinical characteristics, and outcomes of candidemia in internal medicine wards—a retrospective study. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v.52, p.49-54, nov. 2016.

ELLEPOLA, A. N. B.; MORRISON, C. J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 43, n. 1, p. 65684, 2005.

ESPINEL-INGROFF, A.; QUART, A.; STEELE-MOORE, L. et al. Molecular karyotyping of multiple yeast species isolated from nine patients with AIDS during prolonged fluconazole therapy. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Abingdon, v. 34, n. 2, p. 1116116, mar ó abr. 1996.

ESPINEL-INGROFF, A.; VAZQUEZ, J. A.; BOIKOV, D.; PFALLER, M. A. Evaluation of DNA-based typing procedures for strain categorization of *Candida spp.* **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 33, n. 4, p.231-239, abr. 1999.

FAN, X.; XIAO, M.; WANG, H. et al. Multilocus sequence typing indicates diverse origins of invasive *Candida tropicalis* isolates in China. **Chinese Medical Journal**, Peking, v.127, n.24, p.4226-34, 2014.

FATIMA, A.; BASHIR, G.; WANI, T. et al. Molecular identification of *Candida* species isolated from cases of neonatal candidemia using polymerase chain reaction-restriction

fragment length polymorphism in a tertiary care hospital. **Indian Journal of Pathology e Microbiology**, Chandigarh, v.60, n.1, p.61-65, jan. 2017.

FAVERO, D.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L. et al. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*: Haemolytic factor in *Candida tropicalis*. **Mycoses**, Berlin, v. 54, n. 6, p. 816-820, 2011.

FAVERO, D.; FURLANETO-MAIA, L.; FRANÇA, E. J. G. et al. Hemolytic Factor Production by Clinical Isolates of Candida Species. **Current Microbiology**, New York, v. 68, n. 2, p. 1616166, 2014.

FERNÁNDEZ-RUIZ, M.; PUIG-ASENSIO, M.; GUINEA, J. et al. *Candida tropicalis* bloodstream infection: Incidence, risk factors and outcome in a population-based surveillance. **Journal of Infection**, London, v. 71, n. 3, p. 3856394, 2015.

FISHER, J. F.; NEWMAN, C. L.; SOBEL, J. D. Yeast in the Urine: Solutions for a Budding Problem. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 20, n. 1, p.183-189, 1 jan. 1995.

FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Hemolytic capability and expression of a putative haem oxygenase-encoding gene by blood isolates of *Candida tropicalis* are influenced by iron deprivation and the presence of hemoglobin and erythrocytes. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 105, p. 2356239, 2017.

FRASER, V. J. et al. Candidemia in a Tertiary Care Hospital: Epidemiology, Risk Factors, and Predictors of Mortality. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 15, n. 3, p.414-421, 1 set. 1992.

FREYDIÈRE, A. M.; BUCHAILLE, L.; GILLE, Y. Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of *Candida* species in clinical specimens. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 16, n. 6, p.464-467, jun. 1997.

FREYDIÈRE, A. M.; GUINET, R.; BOIRON, P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. **Medical Mycology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 9633, 2001.

FURLANETO, M. C.; FAVERO, D.; FRANÇA, E. J. G. et al. Effects of human blood red cells on the haemolytic capability of clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Journal of Biomedical Science**, Basel, v. 22, n. 1, 2015.

GALÁN-LADERO, M. A.; BLANCO, M. T.; SACRISTÁN, B. et al. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. **Medical Mycology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 2076210, 2010.

GARCÍA-AGUDO, L.; RODRÍGUEZ-IGLESIAS, M.; CARRANZA-GONZÁLEZ, R. Nosocomial Candiduria in the Elderly: Microbiological Diagnosis. **Mycopathologia**, The Hague, v. 183, n. 3, p. 5916596, 2018.

GARCZEWSKA, B. S.; JARZYŃKA, S.; KUS, J. et al. Fungal infection of cystic fibrosis patients - single center experience. **Pneumonologia Alergologia Polska**, Warszawa, v.84, n.3, p.151-159, 2016.

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**, The Hague, v. 164, n. 6, p. 2656269, 2007.

GOW, N. A. R.; VAN DE VEERDONK, F. L.; BROWN, J.P.; et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 10, n. 2, p. 1126122, 2012.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v.20 Suppl 6, p.5-10, jun. 2014.

GUINEA, J.; ZARAGOZA, Ó.; ESCRIBANO, P. et al. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility of Yeast Isolates Causing Fungemia Collected in a Population-Based Study in Spain in 2010 and 2011. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.58, n.3, p 1529-1537, dec. 2014.

HARRIS, P. A. et al. Research electronic data capture (REDCap) - A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. **Journal of Biomedical Informatics**, San Diego, v. 42, n. 2, p.377-381, abr. 2009.

HATA, D.J. et al. Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 4, p. 1087-1092, 2007.

HEELAN, J. S.; SOTOMAYOR, E.; COON, K.; D'AREZZO, J. B. Comparison of the rapid yeast plus panel with the API20C yeast system for identification of clinically significant isolates of *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 5, p. 144361445, mai. 1998.

HOGAN, D. A.; VIK, A.; KOLTER, R. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology: *Pseudomonas* inhibition of *C. albicans* filamentation. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 54, n. 5, p. 121261223, 2004.

HOLLAND, J.; YOUNG, M. L.; LEE, O.; CHEN, A. Vulvovaginal carriage of yeasts other than *Candida albicans*. **Sexually Transmitted Infections**, London, v. 79, n. 3, p. 2496250, 2003.

HOROWITZ, B. J.; EDELSTEIN, S. W.; LIPPMAN, L. *Candida tropicalis* vulvovaginitis. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 66, n. 2, p. 2296232, 1985.

HOSPENTHAL, D. R.; BECKIUS, M. L.; FLOYD, K. L. et al. Presumptive Identification of *Candida* species Other than *C. Albicans*, *C. Krusei*, and *C. Tropicalis* with the Chromogenic Medium CHROMagar *Candida*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, v. 5, p. 1, jan. 2006.

HUANG, G.; YI, S.; SAHNI, N. et al. N-Acetylglucosamine Induces White to Opaque Switching, a Mating Prerequisite in *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. e1000806, 2010.

HUANG, G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Virulence**, Austin, v. 3, n. 3, p. 2516261, 2012.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular biology and evolution**, New York, v. 23, n. 2, p. 254-267, Feb. 2006.

IOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 2256234, 2010.

IRINYI, L.; SERENA, C.; GARCIA-HERMOSO, D. et al. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database-the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v. 53, n. 4, p.3136337, 2015.

JANG, S. J. et al. PFGE-based epidemiological study of an outbreak of *Candida tropicalis* candiduria: the importance of medical waste as a reservoir of nosocomial infection. **Japanese Journal Infectious Diseases**, Tokyo, v. 58, p. 2636267, mai. 2005.

JAUTOVA, J.; VIRAGOVA, S.; ONDRASOVIC, M.; HOLODA, E. Incidence of *Candida* species isolated from human skin and nails: a survey. **Folia Microbiologica (Praha)**, New York, v. 46, n. 4, p. 3336337, 2001.

JIANG, C.; DONG, D.; YU, B. et al. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 68, n. 4, p. 7786785, 2013.

JIANG, C.; LI, Z.; ZHANG, L.; TIAN, Y., DONG, D.; PENG, Y. Significance of hyphae formation in virulence of *Candida tropicalis* and transcriptomic analysis of hyphal cells. **Microbiological research**, Jena, v. 192, p. 65-72, 2016.

JOHNSON, E. M. Rare and emerging *Candida* species. **Current Fungal Infection Reports**, Philadelphia, v. 3, n. 3, p.152-159, 26 ago. 2009.

KAKEYA, H.; YAMADA, K.; KANEKO, Y. National Trends in the Distribution of *Candida* Species Causing Candidemia in Japan from 2003 to 2014. **Medical Mycology Journal**, Tokyo, v.59, n.1, E19-E22, 2018.

KAM, A. P.; XU, J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 43, n. 1, p.19-28, maio 2002.

KIDD, S.; HALLIDAY, C.; ALEXIOU, H. et al. **Description of Medical Fungi**. 3. ed. Australia: CutCut Digital, p.50, 2016.

KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 49, n. 2, p. 1716177, 2011.

KLEINEGGER, C. L.; LOCKHART, S. R.; VARGAS, K.; SOLL, D. R. Frequency intensity species and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 9, p. 224662254, set. 1996.

KLINGSPOR, L.; TORTORANO, A. M.; PEMAN, J. et al. Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (200662008). **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 21, n. 1, p. 87.e1-87.e10, 2015.

KOTHARI, A; SAGAR, V. Epidemiology of candida bloodstream infections in a tertiary care institute in India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, New Delhi, v. 27, n. 2, p. 171, 2009.

KOTHAVADE, R. J.; KURA, M. M.; VALAND, A. G. et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 59, n. 8, p. 8736880, 2010.

KREUSCH, A.; KARSTAEDT, A. S. Candidemia among adults in Soweto, South Africa, 1990-2007. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v.17, n.8, p.e621-3, aug. 2013.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, Washington, v. 35, p.1547-1549, 2018.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Amsterdam: Elsevier, 2011.

KWOK, Y. K.; TAY, Y. K.; GOH, C. L. et al. Epidemiology and in vitro activity of antimycotics against candidal vaginal/skin/nail infections in Singapore. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 37, n. 2, p.145-149, fev. 1998.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; et al. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. In: Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 44, n. 5, p. 2976298, 2002.

LAFHEY, S. F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, Washington, v. 151, n. 4, p. 107361081, 2005.

LAN, C. Y.; NEWPORT, G.; MURILLO, L. A. et al. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, n. 23, p. 14907614912, 2002.

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

- LEE, W. G.; SHIN, J. H.; UH, Y. et al. First Three Reported Cases of Nosocomial Fungemia Caused by *Candida auris*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 9, p.3139-3142, 29 jun. 2011.
- LEUNG, A. Y. et al. *Candida tropicalis* fungaemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors. **Journal of Hospital Infection**, New York, v. 50, n. 4, p.316-319, abr. 2002.
- LEUNG, W. K.; DASSANAYAKE, R. S.; YAU, J. Y. et al. Oral colonization phenotypic and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated dentate xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 6, p. 2219-2226, jun. 2000.
- LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, Washington, v. 149, n. 2, p. 353-362, 2003.
- LI, B.; GUO, T.; CHEN Y.; XIE, J.; NIU H.; LIU D. et al. Genome sequence of *Candida tropicalis* no. 121, used for RNA production. **Genome Announcements**, Washington, v. 2, n. 3, p. e00316-14, 2014.
- LIAN, C.; ZHAO, J.; ZHANG, Z. et al. Genotype of *Candida* species associated with different conditions of vulvovaginal candidosis. **Mycoses**, Berlin, v. 47, n. 11-12, p. 495-502, 2003.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, England, v. 25, n. 11, p.1451-1462, jun. 2009.
- LIM, C. S. Y.; ROSLI, R.; SEOW, H. F. et al. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 31, n. 1, p. 21-31, 2012.
- LIN, D.; LEHMANN, P. F. Random amplified polymorphic DNA for strain delineation within *Candida tropicalis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Abingdon, v. 33, n. 4, p. 241-246, jul-ago. 1995.
- LIU, W. L.; HUANG, Y. T.; HSIEH, M. H. et al. Clinical characteristics of *Candida tropicalis* fungaemia with reduced triazole susceptibility in Taiwan: a multicentre study. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 185-189, 2019.
- LOCKHART, S. R.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA D. J. *Lodderomyces elongisporus* Masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 1, p.374-376, 24 out. 2007.
- LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M. et al. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford v. 8, n. 2, p. 76-81, 2002.
- LUQUE, A. G. et al. Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. **Mycoses**, Berlin, v. 52, n. 1, p.53-59, jan. 2009.

MAGEE, B. B.; MAGEE, P. T. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. **Science**, New York, v. 289, n. 5477, p. 3106313, 2000.

MAGRI, M. M. C.; GOMES-GOUVÊA, M. S.; FREITAS, V. L. T. et al. Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows the presence of different clonal clusters and fluconazole susceptibility profiles in sequential isolates from candidemia patients in Sao Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.51, n.1, p.268-77, jan. 2013.

MALDONADO, I.; CATALDI, S.; GARBASZ, C. et al. Identificación de levaduras del género *Candida*: los métodos convencionales frente a MALDI-TOF MS. **Revista Iberoamericana De Micología**, Barcelona, v. 35, n. 3, p. 1516154, 2018.

MANNS, J. M.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 62, n. 11, p. 515465156, 1994.

MARCO, F.; LOCKHART, S.R.; PFALLER, M.A. et al. Elucidating the origins of nosocomial infections with *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the complex probe Ca3. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n. 9, p. 281762828, set. 1999.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E. et al. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida spp.* isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v.304, n.8, p.119261198, set. 2014.

MARIE, C.; WHITE, T. C. Genetic basis of antifungal drug resistance. **Current Fungal Infection Reports**, Philadelphia, v. 3, n. 3, p. 1636169, 2009.

MÁRQUEZ, F.; ITURRIETA, I.; CALVO, M. et al. Epidemiología y susceptibilidad antifúngica de especies causantes de candidemia en la ciudad de Valdivia, Chile. **Revista chilena de infectología**, Santiago, v. 34, n. 5, p. 441-446, out. 2017.

MARTIN, M. V.; WILKINSON, G.R. The oral yeast flora of 10-year-old school children. **Sabouraudia**, Abingdon, v. 21, n. 2, p.129-135, jan. 1983.

MASSEY, S. E.; MOURA, G.; BELTRÃO, P. et al. Comparative Evolutionary Genomics Unveils the Molecular Mechanism of Reassignment of the CTG Codon in *Candida spp.* **Genome Research**, New York, v. 13, n. 4, p. 5446557, 2003.

MENDES GIANNINI, M. J. S.; BERNARDI, T.; SCORZONI, L. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 62, n. 1, p. 10624, 2013.

MERSEGUEL, K. B. et al. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 15, n. 1, p.15-57, 13 fev. 2015.

MESA-ARANGO, A. C.; FORASTIERO, A. F.; BERNAL-MARTÍNEZ, L. et al. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal

pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Medical Mycology**, Oxford, v.51, n.5, p.461-72, jul. 2013.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 11, n. 2, p.142-151, fev. 2011.

MILLER, D. J.; MEJICANO, G. C. Vertebral osteomyelitis due to *Candida* species: case report and literature review. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.33, n.15, p.5236530, ago. 2001.

MILLER M. G.; JOHNSON, A. D. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. **Cell**, Cambridge, v.110, n.3, p. 2936302, ago. 2002.

MOHD TAP, R.; LIM, T. C.; KAMARUDIN, N. A. et al. A Fatal Case of *Candida auris* and *Candida tropicalis* Candidemia in Neutropenic Patient. **Mycopathologia**, Netherlands, jan. 2018. doi: 10.1007/s11046-018-0244-y.

MONGE, R. A.; ROMAN, E.; NOMBLEA, C.; PLA, J. The MAP kinases signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, Washington, v.152, n.2, p. 905-912, 2006.

MORACE, G.; BORGHI, E. Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics. **Minerva Anestesiologica**, Torino, v.76, n.11, p. 950-956, 2010.

MORALEZ, A. T. P.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L. et al. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical Mycology**, Oxford, v.52, n.1, p.106-14, jan. 2014.

MORROW, C. A.; FRASER, J. A. Ploidy variation as an adaptive mechanism in human pathogenic fungi. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v.24, n.4, p.3396 346, fev. 2013.

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 47, n. 2, p. 946106, 2010.

MURGU, A. M.; CRISCOV, I. G.; FOTEA, S. et al. Particularities of the management and the treatment in a rare sepsis with *Candida tropicalis* of a Collodion baby: Case report. **Medicine**, Hagerstown, v.96, n.51, p.e9387, dez. 2017.

NATH, R.; BORA, R.; BORKAKOTY, B. et al. Clinically relevant yeast species identified by sequencing the internal transcribed spacer region of r-RNA gene and Vitek 2 compact (YST card) commercial identification system: Experience in a Tertiary Care Hospital in Assam, Northeast India. **Indian journal of Medical Microbiology**, New Delhi, v. 35, n. 4, p. 588, 2017.

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. et al. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v.31, n.7, p.1399-412, jul. 2012.

NEGRI, M.; SILVA, S.; CAPOCI, I. R. G. et al. *Candida tropicalis* Biofilms: Biomass, Metabolic Activity and Secreted Aspartyl Proteinase Production. **Mycopathologia**, The Hague v.181, n.3-4, p.217-24, abr. 2015.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M. et al. Examination of Potential Virulence Factors of *Candida tropicalis* Clinical Isolates From Hospitalized Patients. **Mycopathologia**, The Hague, v. 169, n. 3, p. 175-182, 2010.

NEPPELENBROEK, K. H.; SEÓ, R. S.; URBAN, V. M. et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral Diseases**, Houndmills, v.20, n.4, p.329-44, mai. 2013.

NEUFELD, P. M.; MELHEM, M. S. C.; SZESZS, M. W. et al. Nosocomial candidiasis in Rio de Janeiro State: Distribution and fluconazole susceptibility profile. **Brazilian Journal Microbiology**, Rio de Janeiro, v.46, n.2, p.477-84, jun. 2015.

NIELSEN, K.; HEITMAN, J. Sex and Virulence of Human Pathogenic Fungi. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 57, [S.I.], p. 143-173, 2007.

NISHIKAKU, A. S.; MELO, A. S. A.; COLOMBO, A. L. Geographic Trends in Invasive Candidiasis. **Current Fungal Infection Reports**, Philadelphia, v. 4, n. 4, p. 210-218, 2010.

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

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. Revisiting the Source of Candidemia: Skin or Gut? **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 33, n. 12, p. 1959-1967, 2001.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 58, n. 1, p. 77-82, may. 2007.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A.M. et al. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 8, p.1923-1929, ago. 1994.

ODDS F. C.; GOW, N. A. R.; BROWN, A.J. Toward a molecular understanding of *candida albicans* virulence. In: HEITMAN, J. et al. **Molecular Principles of Fungal Pathogenesis**, Washington: ASM, Press; 2006. p. 305-319.

O'HARA, A. M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. **EMBO reports**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 688-693, 2006.

OLY, S.; PUJOL, C.; SCHRÖPPEL, K. et al. Development of two species-specific *fingerprinting* probes for broad computer-assisted epidemiological studies of *Candida tropicalis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 12, p. 3063-3071, 1996.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; ALEXANDER, B. D.; KETT, D. H. et al. Multicenter Clinical Evaluation of the (1->3) -D-Glucan Assay as an Aid to Diagnosis of Fungal Infections in Humans. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 41, n. 5, p. 654-659, 2005.

OZCAN, K.; IIKIT, M.; ATES, A.; TURAC-BICER, A.; DEMIRHINDI, H. Performance of Chromogenic *Candida* Agar and CHROMagar *Candida* in recovery and presumptive identification of monofungal and polyfungal vaginal isolates. **Medical Mycology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 29-34, jan. 2010.

PAIVA, L. C. F.; VIDIGAL, P. G.; DONATTI, L. et al. Assessment of in vitro biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. **Micron**, Oxford, v. 43, n. 263, p. 497-502, 2012.

PANNANUSORN, S.; FERNANDEZ, V.; RÖMLING, U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection: Biofilm formation of *Candida* species. **Mycoses**, Berlin, v. 56, n. 3, p. 264-272, 2013.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; LEE, J. et al. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 37, n. 5, p. 634-643, 2003.

PARAZZINI, F.; DI-CINTIO, E.; CHIANTERA, V.; GUASCHINO, S. Determinants of different *Candida* species infections of the genital tract in women. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 93, n. 2, p.141-145, dez. 2000.

PAUL, N.; MATHAI, E.; ABRAHAM, O. C.; MATHAI, D. Emerging Microbiological Trends in Candiduria. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 39, n. 11, p.1743-1744, dez. 2004.

PERERA, F. P.; HERBSTMAN, J. B. Emerging technology in molecular epidemiology: what epidemiologists need to know. **Epidemiology**, Cambridge, v.19, n.2, p.350-2, mar. 2008.

PFALLER, M. A.; HUSTON, A.; COFFMAN, S. Application of CHROMagar *Candida* Medium for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 1, p. 56-61, 1996.

PFALLER, M. A.; ANDES, D. R.; DIEKEMA, D. J. et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: Data from the prospective antifungal therapy (PATH) Registry 2004-2008. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 7, p.1-12, 3 jul. 2014.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 1, p.133-163, 1 jan. 2007.

PFALLER, M. A.; RHINE-CHALBERG, J.; REDDING, S. W. et al. Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 1, p. 59664. Jan. 1994.

PONTÓN, J.; DEL PALACIO, A. Advances and limitations in the early diagnosis of invasive yeast infections. **Revista Iberoamericana De Micología**, Barcelona, v. 24, n. 3, p. 1816186, 2007.

PORMAN, A. M., ALBY, K.; HIRAKAWA, M.P. et al. Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America**, Washington, v.108, n.52, p.21158621163, dez. 2011.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v.31, n.1, p.42-8, jan. 2014.

R CORE DEVELOPMENT TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.

RIBEIRO, A. L. R.; MENEZES, T. O. A.; ALVES-JUNIOR, S. M. et al. Oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients during highly active antiretroviral therapy (HAART) in Belém, Brazil. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, New York, v. 120, n. 1, p. 29-33, 2015.

RICHTER, S. S. et al. Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 5, p.2155-2162, 1 maio 2005.

RIVETT, A. G.; PERRY, J. A.; COHEN, J. Urinary candidiasis: a prospective study in hospital patients. **Urological Research**, Berlin, v. 14, n. 4, p. 1836186, 1986.

RODRIGUEZ, L.; BUSTAMANTE, B.; HUAROTO, L. et al. A multi-centric Study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. **PloS one**, San Francisco, v. 12, n. 4, p. e0175172, 2017.

ROILIDES, E. et al. *Candida tropicalis* in a Neonatal Intensive Care Unit: Epidemiologic and Molecular Analysis of an Outbreak of Infection with an Uncommon Neonatal Pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 2, p.735-741, 1 fev. 2003.

ROILIDES, E. et al. Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 23, n. 10, p.745-750, 16 set. 2004.

ROMEO, O.; CRISEO, G. *Candida africana* and its closest relatives. **Mycoses**, Berlin, v. 54, n. 6, p.475-486, 28 jul. 2010.

SANTOS, M. A. S.; GOMES, A. C.; SANTOS, M. C. et al. The genetic code of the fungal CTG clade. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 334, n. 869, p. 6076611, 2011.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C. et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, Berlin, v. 48, n. 6, p. 365-377, 2005.

SEERVAI, R. N. H.; JONES, S. K. Jr.; HIRAKAWA, M. P. et al. Parasexuality and ploidy change in *Candida tropicalis*. **Eukaryotic Cell**, Washington, v.12, n.12, p.1629-1640, out. 2013.

SENEVIRATNE, C. J.; RAJAN, S.; WONG, S. S. W. et al. Antifungal Susceptibility in Serum and Virulence Determinants of Candida Bloodstream Isolates from Hong Kong. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 1-8, 2016.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SILVA-DIAS, A.; MIRANDA, I. M.; BRANCO, J. et al. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 1-8, 2015.

SIVAKUMAR, V. G.; SHANKAR, P.; NALINA, K. et al. Use of CHROMagar in the differentiation of common species of Candida. **Mycopathologia**, The Hague, v. 167, n. 1, p. 47-49, 2009.

SOBEL, J. D. et al. Candiduria: a randomized double-blind study of treatment with fluconazole and placebo. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Mycoses Study Group. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 30, n. 1, p. 19-24, jan. 2000.

SOBEL, J. D. The emergence of *non-albicans Candida* species as causes of invasive candidiasis and candidemia. **Current Infectious Disease Reports**, Philadelphia, v. 8, n. 6, p.427-433, nov. 2006.

SOLL, D. R. The ins and outs of DNA *fingerprinting* the infectious fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 2, p. 332-370, 2000.

STAPLETON, A. Urinary tract infections in patients with diabetes. **The American Journal Of Medicine**, New York, v. 113, n. 1A, p.80-84, jul. 2002.

STEFFAN, P.; VAZQUEZ, J. A.; BOIBOV, D. et al. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 8, p.2031-2039, ago. 1997.

SUZUKI, T.; MIYAMAE, Y.; ISHIDA, I. Variation of colony morphology and chromosomal rearrangement in *Candida tropicalis* pK233. **Journal of General Microbiology**, London, v. 137, n. 1, p.161-167, 1 jan. 1991.

SYMERSKY, J.; MONOD, M.; FOUNDLING, S. I. High-Resolution Structure of the Extracellular Aspartic Proteinase from *Candida tropicalis* Yeast. **Biochemistry**, Washington, v. 36, n. 42, p. 12700-12710, 1997.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, Washington, v. 10, p.512-526, 1993.

TANG, H. J.; LIU, W. L.; LIN, H. L. et al. Epidemiology and prognostic factors of candidemia in cancer patients. **PLoS One**, San Francisco, v.9, n.6, p.e99103, jun. 2014.

TAVANTI, A. et al. Multilocus Sequence Typing for Differentiation of Strains of *Candida tropicalis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 11, p.5593-5600, 1 nov. 2005b.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A.; MAIDEN, M. C.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 1, p.284-292, 1 jan. 2005a.

THAWEBOON, S.; THAWEBOON, B.; SRITHAVAJ, T.; CHOONHARUANGDEJ, S. Oral colonization of *Candida* species in patients receiving radiotherapy in the head and neck area. **Quintessence International**, Berlin, v. 39, n. 2, p. 52657, jan. 2008.

TIRABOSCHI, I. N.; POZZI, N. C.; FARÍAS, L. et al. Epidemiología, especies, resistencia antifúngica y evolución de las candidemias en un hospital universitario de Buenos Aires, Argentina, durante 16 años. **Revista chilena de infectología**, Santiago, v.34, n.5, p.431-440, out. 2017.

TORTORANO, A. M. et al. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) prospective survey of candidaemia: report from one Italian region. **Journal of Hospital Infection**, New York, v. 51, n. 4, p.297-304, ago. 2002.

TORTORANO, A. M.; KIBBLER, C.; PEMAN, J. et al. Candidaemia in Europe: Epidemiology and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 27, n. 5, p.359-366, mai. 2006.

TREVIÑO-RANGEL, R. J.; BODDEN-MENDOZA, B. A.; MONTOYA, A. M. et al. Phenotypical characterization and molecular identification of clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 35, n. 1, p. 17621, 2018.

TUMBARELLO, M. et al. Analysis of the risk factors associated with the emergence of azole resistant oral candidosis in the course of HIV infection. **The Journal of Antimicrobial Chemother**, London, v. 38, p. 6916699, 1996.

TURNER, S. A.; BUTLER, G. The *Candida* pathogenic species complex. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, Dublin, v. 4, n. 9, p. 019778, 2014.

UDAYALAXMI, J. S.; DøSouza, D. Comparison Between Virulence Factors of *Candida albicans* and Non-*Albicans* Species of *Candida* Isolated from Genitourinary Tract. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, India, v. 8, n. 11, p. 15-17, 2014.

VALLABHANENI, S.; MODY, R. K.; WALKER, T.; CHILLER, T. The Global Burden of Fungal Diseases. **Infectious Diseases Clinics of North America**, Philadelphia, v. 30, p. 1-11, 2016.

VASSART, G.; GEORGES, M.; MONSIEUR, R.; BROCAS, H.; LEQUARRE, A. S.; CHRISTOPHE, D. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. **Science**, New York, v. 235, n. 4789, p.6836684, 1987.

VERMA, A .K.; PRASAD, K. N.; SINGH, M. et al. Candidaemia in patients of a tertiary health care hospital from north India. **The Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.117, p. 1226128, 2003.

VERSTREPEN, K. J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 5615, 2006.

VINCENT, J. L.; RELLO J.; MARSHALL, J. et al. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. **JAMA**, Chicago, v. 302, n. 21, p. 2323, 2009.

VIVIANI, M. A.; COGLIATI, M.; ESPOSTO, M. C.; PRIGITANO, A.; TORTORANO, A. M. Four-Year Persistence of a Single *Candida albicans* Genotype causing Bloodstream Infections in a Surgical Ward Proven by Multilocus Sequence Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 1, p.218-221, 1 jan. 2006.

WANG, H.; XU, Y. C.; HSUEH, P. R. Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility in invasive *Candida* species in the Asia-Pacific region. **Future Microbiology**, London, v.11, p.1461-1477, out. 2016.

WINGARD, J. R. Importance of *Candida* Species Other than *C. albicans* as Pathogens in Oncology Patients. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 20, n. 1, p.115-125, 1 jan. 1995.

WOLFSON, J. S.; SOBER, A. J.; RUBIN, R. H. Dermatologic manifestations of infections in immunocompromised patients. **Medicine (Baltimore)**, Hagerstown, v. 64, n. 2, p. 1156133, mar. 1985.

WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTIONS (WFCC). Guideline for the establishment as operation of collections of cultures of microorganisms. **WFCC**, Brussels, 3rd edition, p.1-19, feb. 2010.

WU, Y.; ZHOU, H. J.; LI, W. G. et al. Multilocus microsatellite markers for molecular typing of *Candida tropicalis* isolates. **BMC Microbiology**, London, v. 14, n. 20, p. 245-256, nov. 2014.

XIE, J.; DU, H.; GUAN, G. et al. N-acetylglucosamine induces white-to-opaque switching and mating in *Candida tropicalis*, providing new insights into adaptation and fungal sexual evolution. **Eukaryotic Cell**, Washington, v.11, n.6, p.7736782, abr. 2012.

XU, L.; WANG, F.; SHEN, Y. et al. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of pathogenic fungi: *In vitro* and *in vivo* studies. **Experimental and Therapeutic Medicine**, Athens, v. 7, n. 6, p. 151661520, 2014.

YANG, C. W.; BARKHAM, T. M.; CHAN, F. Y.; WANG, Y. Prevalence of *Candida* Species, Including *Candida dubliniensis*, in Singapore. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 1, p.472-474, 1 jan. 2003.

YANG, Y. L.; CHENG, M. F.; WANG, C. W. et al. The distribution of species and susceptibility of amphotericin B and fluconazole of yeast pathogens isolated from sterile sites in Taiwan. **Medical Mycology**, Oxford, v. 48, n. 2, p.328-334, mar. 2010.

YAP, H. Y. et al. Epidemiology and outcome of *Candida* bloodstream infection in an intensive care unit in Hong Kong. **Hong Kong Medical Journal**, Hong Kong, v. 15, n. 4, p. 255-261, ago. 2009.

YUCESOY, M.; OZTEK, O. A.; MAROL, S. Comparison of three differential media for the presumptive identification of yeasts. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 11, n. 3, p.245-247, mar. 2005.

ZHANG, Q.; TAO, L.; YUE, H. et al. Regulation of filamentation in the human fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.99, n.3, p.528-45, fev. 2016.

ZHANG, L. J.; YU, S. B.; LI, W. G. et al. Polymorphism analysis of virulence-related genes among *Candida tropicalis* isolates: **Chinese Medical Journal**, Peking, v. 132, n. 4, p. 446-453, 2019.

ZUZA-ALVES, D. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.8, p.1927-1952, out. 2017.

APÊNDICE A ó Análise geral dos 110 isolados de *Candida tropicalis* oriundos de episódios de candidíase que ocorreram no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2017.

Código	Origem	Sítio de Isolamento	Chromagar	Morfologia	Perfil Bioquímico	Haplótipo ITS	Perfil M13
1 CT	HU TMO	Sangue	Azul	Rugosa	P1	H1	2
3 CT	HU MM	Urina	Verde	Micelial	P1	H2	3
6 CT	HU CTI	Urina	Azul	Cotonosa	P2	H1	1
7 CT	HU CTI	Urina	Azul	Rugosa	P2	H1	2
9 CT	HU CTI	Urina	Azul	Cotonosa	P1	H3	4
11 CT	HU CTI	Outros	Azul	Rugosa	P1	H1	7
13 CT	HU MH	Urina	Azul	Micelial	P1	H1	2
14 CT	HU MH	Urina	Azul	Cotonosa	P1	H8	5
15 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Micelial	P8	H3	2
17 CT	HU CTI	Urina	Azul	Cotonosa	P9	H1	1
19 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Azul	Cotonosa	P1	H3	2
21 CT	HU MH	Urina	Azul	Cotonosa	P14	H1	6
22CT	HU MM	Outros	Azul	Cotonosa	P2	H9	7
24 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Rugosa	P1	H1	1
25 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Micelial	P1	H10	5
26 CT	HU CTI	Urina	Azul	Lisa	P1	H5	5
27 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Cotonosa	P1	H3	2
28 CT	HU CTI	Urina	Verde	Cotonosa	P1	H3	2
29 CT	HU CTI	Ponta de Cateter	Azul	Micelial	P12	H10	5
30 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Cotonosa	P2	H10	5
32 CT	HU CTI	Ponta de Cateter	Verde	Cotonosa	P6	H3	1
33 CT	HU CTI	Urina	Azul	Rugosa	P10	H1	1
34 CT	HU CH	Urina	Azul	Lisa	P17	H1	7
36 CT	HU MH	Urina	Azul	Lisa	P18	H1	2
37 CT	HU CTI	Urina	Azul	Rugosa	P1	H3	2
38 CT	HU CTI	Urina	Azul	Rugosa	P1	H1	1
39 CT	HU CTI	Urina	Azul	Cotonosa	P15	H1	1
40 CT	HU CTI	Urina	Azul	Micelial	P1	H3	2
41.1 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Azul	Lisa	P16	H1	2
43 CT	HU CTI	Urina	Azul	Lisa	P1	H3	2
47 CT	HU CTI	Urina	Azul	Micelial	P1	H9	2
49 CT	HU CTI	Urina	Azul	Rugosa	P6	H3	4
50 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Micelial	P2	H3	4
51 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Micelial	P1	H3	4
52 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Verde	Rugosa	P1	H2	7
53 CT	HU CTI	Urina	Azul	Micelial	P1	H9	2
54 CT	HU CTI	Urina	Azul	Rugosa	P6	H1	7
58 CT	HU TMO	Sangue	Azul	Micelial	P13	H11	2

59 CT	HU TMO	Sangue	Azul	Cotonosa	P2	H11	4
60 CT	HU TMO	Sangue	Azul	Micelial	P1	H11	2
61 CT	HU TMO	Sangue	Azul	Micelial	P1	H11	2
63 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Micelial	P1	H9	2
64 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Micelial	P1	H12	1
65 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Micelial	P1	H11	2
65 I CT	HU CTI	Sangue	Verde	Micelial	P1	H9	2
67 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Micelial	P1	H11	2
68 CT	HU CTI	Sangue	Verde	Micelial	P11	H11	2
69 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Lisa	P1	H11	2
70 CT	HU CTI	Urina	Azul	Micelial	P2	H9	2
71 CT	HU CTI	Urina	Azul	Rugosa	P2	H1	7
73 CT	HU MH	Urina	Azul	Cotonosa	P2	H1	5
76 CT	HU MH	Trato Respiratório	Azul	Cotonosa	P2	H3	1
78 CT	HU MH	Urina	Azul	Micelial	P1	H1	1
80 CT	HU CTI	Urina	Azul	Rugosa	P1	H1	1
81 CT	HU MH	Urina	Azul	Micelial	P1	H9	2
83 CT	HU CTI	Urina	Azul	Micelial	P1	H1	1
85 CT	HU PED	Ponta de Cateter	Azul	Lisa	P1	H3	2
86 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Azul	Lisa	P2	H3	1
87 CT	HU CTI	Urina	Azul	Lisa	P2	H9	7
89 CT	HU CTI	Urina	Verde	Cotonosa	P1	H3	2
92 CT	HU MH	Urina	Azul	Lisa	P1	H1	2
94 CT	HU CM	Urina	Azul	Micelial	P1	H1	1
95 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Azul	Lisa	P5	H1	2
96.1 CT	HU CH	Urina	Verde	Lisa	P2	H1	1
97 CT	HU MH	Sangue	Verde	Lisa	P13	H3	2
99 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Azul	Cotonosa	P1	H3	2
100 CT	HU MH	Sangue	Azul	Lisa	P1	H3	2
101 CT	HU CTI	Urina	Azul	Cotonosa	P1	H3	2
102 CT	HU CTI	Urina	Azul	Cotonosa	P1	H3	2
103 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Lisa	P1	H4	1
104 CT	HU CTI	Sangue	Azul	Lisa	P1	H4	1
105 CT	HU CH	Outros	Azul	Lisa	P1	H3	2
106 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Azul	Cotonosa	P1	H5	5
108 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Verde	Rugosa	P15	H2	7
109 CT	HU CTI	Urina	Azul	Micelial	P1	H1	1
110 CT	HU MM	Urina	Roxo	Lisa	P18	H3	2
111 CT	HU CTI	Urina	Azul	Cotonosa	P1	H6	2
112 CT	HU CH	Urina	Verde	Lisa	P1	H3	2
113 CT	HU MM	Urina	Azul	Lisa	P4	H1	2
114 CT	HU CTI	Urina	Azul	Micelial	P1	H1	2
116 CT	HU MM	Urina	Verde	Cotonosa	P6	H1	1
117 CT	HU MM	Urina	Azul	Micelial	P1	H7	2

120 CT	HU CTI	Urina	Verde	Cotonosa	P1	H1	1
121 CT	HU CTI	Urina	Verde	Cotonosa	P1	H1	1
122 CT	HU CTI	Urina	Verde	Cotonosa	P1	H1	1
124 CT	HU CTI	Urina	Azul	Cotonosa	P18	H1	2
125 CT	HU MM	Urina	Azul	Cotonosa	P1	H1	2
126 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Azul	Cotonosa	P13	H3	4
127 CT	HU CTI	Ponta de Cateter	Azul	Cotonosa	P13	H3	2
128 CT	HU CTI	Ponta de Cateter	Verde	Micelial	P2	H3	2
129 CT	HU CTI	Urina	Azul	Cotonosa	P18	H1	2
132 CT	HU MM	Sangue	Azul	Lisa	P1	H3	2
133 CT	HU CTI	Urina	Azul	Cotonosa	P3	H1	7
134 CT	HU CTI	Ponta de Cateter	Azul	Cotonosa	P1	H3	2
135 CT	HU CTI	Ponta de Cateter	Azul	Cotonosa	P1	H3	2
136 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Azul	Cotonosa	P2	H3	4
137 CT	HU MH	Ponta de Cateter	Azul	Rugosa	P2	H3	2
138 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Azul	Cotonosa	P1	H3	4
139 CT	HU CTI	Ponta de Cateter	Azul	Rugosa	P1	H3	1
140 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Azul	Cotonosa	P1	H3	2
141 CT	HU MH	Urina	Azul	Lisa	P1	H3	2
142 CT	HU MH	Urina	Azul	Cotonosa	P1	H3	2
143 CT	HU CTI	Outros	Azul	Micelial	P1	H3	4
144.1CT	HU CTI	Trato Respiratório	Azul	Cotonosa	P2	H1	2
145 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Azul	Cotonosa	P2	H3	2
146 CT	HU CTI	Trato Respiratório	Azul	Cotonosa	P1	H1	4
148CT	HU CH	Urina	Azul	Cotonosa	P1	H1	1
149CT	HU CH	Urina	Azul	Lisa	P2	H1	4
150CT	HU CTI	Urina	Azul	Rugosa	P7	H1	7
151CT	HU MM	Urina	Azul	Cotonosa	P1	H3	1

Haplótipos definidos com base na avaliação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal de 110 sequências de DNA analisadas pelo método de *Median-Joining*. M13: perfil molecular dos 110 isolados com base na DNA *øfingerprinting* - primer M13; Chromagar: Variantes de pigmentação das colônias em Chromagar® *Candida*; Morfologia: Variantes morfológicas das colônias de *Candida tropicalis* em Sabouraud dextrose ágar. Perfil Bioquímico: definido a partir dos resultados do sistema Vitek® 2 YST Card; Origem: unidade hospitalar de internação; CTI: Centro de Terapia Intensiva; TMO: Unidade de transplante de medula óssea; MH: Enfermaria da medicina dos homens; MM: Enfermaria da medicina das mulheres; CH; Enfermaria cirúrgica dos homens; CM: Enfermaria cirúrgica das mulheres; Outros: Líquido ascítico, bile, secreções e abscessos;

APÊNDICE B ó Sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal de *C. tropicalis* obtidas no banco de dados do NCBI/*GenBank*

Código	Haplótipo ITS	Local	Origem
AM117838.1	H1	Oceano Pacífico	Ambiental
LT837798.1	H3	Kuwait	Clínica
LT837797.1	H6	Kuwait	Clínica
LT837796.1	H6	Kuwait	Clínica
LT837795.1	H38	Kuwait	Clínica
LT837794.1	H3	Kuwait	Clínica
AB861491.1	H17	Brasil	Clínica
AB861490.1	H16	Brasil	Clínica
HG970740.1	H1	Kuwait	Clínica
AB861493.1	H18	Brasil	Clínica
AB861492.1	H1	Brasil	Clínica
AB437087.1	H3	Japão	Animal
AB437086.1	H3	Japão	Clínica
AB437085.1	H1	Japão	Clínica
AB437084.1	H6	Brasil	Clínica
AB437083.1	H15	Japão	Clínica
AB437082.1	H3	Japão	Clínica
AB437081.1	H3	Japão	Clínica
AB437080.1	H3	Japão	Clínica
AB437079.1	H3	Japão	Clínica
AB437078.1	H1	Itália	Animal
AB437077.1	H14	Japão	Animal
AB437076.1	H3	Japão	Clínica
AB437075.1	H3	Japão	Clínica
AB437074.1	H1	Japão	Clínica
AB437073.1	H3	Japão	Clínica
AB437071.1	H3	Japão	Clínica
AB437068.1	H3	USA	Clínica
AB437065.1	H13	Japão	Ambiental
AB437064.1	H13	Japão	Ambiental
AB437063.1	H13	Japão	Ambiental
AB437062.1	H13	Japão	Ambiental
AB437061.1	H3	Japão	Ambiental
AB437060.1	H3	Japão	Ambiental
AB437059.1	H3	Japão	Ambiental
AB437058.1	H3	Japão	Ambiental
AB437057.1	H3	Japão	Ambiental
AF268095.1	H19	Argentina	Ambiental
MG459432.1	H4	Irã	Clínica
EU288196.1	H3	França	Clínica
JN606259.1	H25	China	Clínica
JN606253.1	H24	China	Clínica
GQ280297.1	H23	China	Clínica

FJ697166.1	H22	China	Clínica
FJ662410.1	H1	China	Clínica
FJ662409.1	H1	China	Clínica
EF568042.2	H1	Austrália	Clínica
EF568041.1	H3	Austrália	Clínica
EF568040.1	H3	Austrália	Clínica
EF568039.1	H6	Austrália	Clínica
EF568038.1	H1	Austrália	Clínica
JN016736.1	H3	Argentina	Clínica
JN016735.1	H1	Argentina	Clínica
JN016734.1	H1	Argentina	Clínica
JN016733.1	H1	Argentina	Clínica
KT067762.1	H1	USA	Clínica
KT067761.1	H1	USA	Clínica
LC042146.1	H1	China	Clínica
LC042145.1	H6	China	Clínica
LC042144.1	H4	China	Clínica
JN391306.1	H1	China	Clínica
JN391305.1	H1	China	Clínica
KJ451708.1	H3	Brasil	Clínica
KJ451647.1	H3	Brasil	Clínica
KJ451642.1	H31	Brasil	Clínica
KJ451635.1	H1	Brasil	Clínica
KP860079.1	H1	Brasil	Ambiental
KP131819.1	H6	Bélgica	Clínica
KP131818.1	H36	Bélgica	Clínica
KP131816.1	H3	França	Clínica
KP131815.1	H16	França	Clínica
KP131814.1	H1	França	Clínica
KP131813.1	H3	França	Clínica
KP131812.1	H1	Portugal	Clínica
KP068771.1	H35	Austrália	Clínica
KP068770.1	H1	Austrália	Clínica
KP068769.1	H34	Austrália	Clínica
KP068768.1	H1	Austrália	Clínica
KP068767.1	H1	Austrália	Clínica
KP068766.1	H3	Omã	Clínica
KP068765.1	H33	Omã	Clínica
KP068764.1	H1	Omã	Clínica
KP068763.1	H1	Omã	Clínica
KP068762.1	H32	Omã	Clínica
KP068761.1	H1	Austrália	Clínica
KC254014.1	H23	Grécia	Clínica
KC254013.1	H23	Irã	Clínica
GQ376071.1	H1	Grécia	Clínica
KJ740185.1	H3	Brasil	Clínica
KJ740184.1	H1	Brasil	Clínica
KJ740183.1	H1	Brasil	Clínica

KJ740180.1	H1	Brasil	Clínica
JQ292921.1	H28	México	Animal
JQ292920.1	H27	México	Animal
JQ292919.1	H26	México	Animal
L47112.1	H37	Gales	Clínica
EF392687.1	H21	USA	Ambiental
AY939801.1	H1	Alemanha	Clínica
AF321539.1	H20	Espanha	Ambiental
KC408972.1	H16	Brasil	Clínica
KC408971.1	H30	Brasil	Clínica
KC408970.1	H23	Brasil	Clínica
KC408969.1	H2	Brasil	Clínica
KC408968.1	H6	Brasil	Clínica
KC408967.1	H1	Brasil	Clínica
KC408966.1	H29	Brasil	Clínica
KC408965.1	H3	Brasil	Clínica

Haplótipos definidos com base na avaliação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal de 217 seqüências de DNA de 19 diferentes regiões do globo, analisadas pelo método de *Median-Joining*.

P17	1	1
P18	3	.	1	4
Total Geral	40	3	40	2	2	1	1	1	8	3	8	1	110

Sítio de Isolamento	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	Total Geral
Urina	33	1	14	.	1	1	1	1	5	.	.	.	57
Sangue	2	.	7	2	2	2	8	1	24
Trato Respiratório	4	2	9	.	1	16
Ponta de Cateter	.	.	8	1	.	.	9
Outros	1	.	2	1	.	.	.	4
Total Geral	40	3	40	2	2	1	1	1	8	3	8	1	110

Haplótipos definidos com base na avaliação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal de 110 sequências de DNA analisadas pelo método de *Median-Joining*. M13: perfil molecular dos 110 isolados com base na DNA *õfingerprintingö* - primer M13; Chromagar: Variantes de pigmentação das colônias em Chromagar® *Candida*; Morfologia: Variantes morfológicas das colônias de *Candida tropicalis* em Sabouraud dextrose ágar. Perfil Bioquímico: definido a partir dos resultados do sistema Vitek® 2 YST *Card*; Outros: Líquido ascético, bile, secreções e abscessos.

APÊNDICE D - Análise de correlação entre o perfil molecular M13 e os testes fenotípicos empregados no estudo dos 110 isolados presuntivamente identificados como *C. tropicalis* por metodologia convencional.

Chromagar	Perfil M13							Total Geral
	1	2	3	4	5	6	7	
Azul	19	47	.	11	7	1	8	93
Verde	6	7	1	.	.	.	2	16
Roxo	.	1	1
Total Geral	25	55	1	11	7	1	10	110
Morfologia	1	2	3	4	5	6	7	Total Geral
Cotonosa	11	18	.	6	4	1	2	42
Micelial	5	18	1	3	2	.	.	29
Lisa	4	15	.	1	1	.	2	23
Rugosa	5	4	.	1	.	.	6	16
Total Geral	25	55	1	11	7	1	10	110
Perfil Bioquímico	1	2	3	4	5	6	7	Total Geral
P1	16	37	1	5	4	.	2	65
P2	4	6	.	4	2	.	3	19
P3	1	1
P4	.	1	1
P5	.	1	1
P6	2	.	.	1	.	.	1	4
P7	1	1
P8	.	1	1
P9	1	1
P10	1	1
P11	.	1	1
P12	1	.	.	1
P13	.	3	.	1	.	.	.	4
P14	1	.	1
P15	1	1	2
P16	.	1	1
P17	1	1
P18	.	4	4
Total Geral	25	55	1	11	7	1	10	110
Sítio de Isolamento	1	2	3	4	5	6	7	Total Geral
Urina	17	26	1	3	3	1	6	57
Sangue	4	15	.	3	2	.	.	24
Trato Respiratório	2	7	.	4	1	.	2	16
Ponta de Cateter	2	6	.	.	1	.	.	9
Outros	.	1	.	1	.	.	2	4
Total Geral	25	55	1	11	7	1	10	110

M13: perfil molecular dos 110 isolados com base na DNA *õfingerprintingõ* - *primer* M13; Chromagar: Variantes de pigmentação das colônias em Chromagar® *Candida*; Morfologia: Variantes morfológicas das colônias de

Candida tropicalis em Sabouraud dextrose ágar. Perfil Bioquímico: definido a partir dos resultados do sistema Vitek® 2 YST Card; Outros: Líquido ascético, bile, secreções e abscessos.

APÊNDICE E - Análise da evolução de 25 casos que apresentaram múltiplos isolado de *C. tropicalis*.

Casos	Desfecho	Amostra	Data da Coleta	Origem	Código	ITS	M13	Chromagar	Bioquímica	Morfologia
1	Óbito	Sangue	03/12/2014	HU CTI	50 CT	H3	4	Azul	P2	Micelial
		Sangue	03/12/2014	HU CTI	51 CT	H3	4	Azul	P1	Micelial
2	Alta	Urina	22/01/2014	HU CTI	33 CT	H1	1	Azul	P10	Rugosa
		Urina	27/11/2014	HU CTI	47 CT	H9	2	Azul	P1	Micelial
3	Óbito	Urina	23/02/2014	HU MH	36 CT	H1	2	Azul	P18	Lisa
		Urina	27/02/2014	HU CTI	37 CT	H3	2	Azul	P1	Rugosa
4	Óbito	Urina	29/04/2015	HU CTI	80 CT	H1	1	Azul	P1	Rugosa
		Urina	14/05/2015	HU CTI	83 CT	H1	1	Azul	P1	Micelial
5	Óbito	Sangue	12/11/2013	HU CTI	27 CT	H3	2	Azul	P1	Cotonosa
		Urina	14/11/2013	HU CTI	28 CT	H3	2	Azul	P1	Cotonosa
6	Óbito	Sangue	21/02/2015	HU TMO	58 CT	H11	2	Azul	P13	Micelial
		Sangue	21/02/2015	HU TMO	59 CT	H11	4	Azul	P2	Cotonosa
		Sangue	23/02/2015	HU TMO	60 CT	H11	2	Azul	P1	Micelial
		Sangue	23/02/2015	HU TMO	61 CT	H11	2	Azul	P1	Micelial
		Sangue	25/02/2015	HU CTI	63 CT	H9	2	Azul	P1	Micelial
		Sangue	25/02/2015	HU CTI	64 CT	H12	1	Azul	P1	Micelial
		Sangue	26/02/2015	HU CTI	65 CT	H11	2	Azul	P1	Micelial
		Sangue	26/02/2015	HU CTI	65 I CT	H9	2	Azul	P1	Micelial
		Sangue VB	26/02/2015	HU CTI	67 CT	H11	2	Azul	P1	Micelial
		Sangue VM	26/02/2015	HU CTI	68 CT	H11	2	Azul	P11	Micelial
7	Óbito	Sangue	26/12/2015	HU MH	97 CT	H3	2	Azul	P13	Lisa
		Sangue	31/12/2015	HU MH	100 CT	H3	2	Azul	P1	Lisa
8	Óbito	Urina	07/03/2016	HU CTI	109 CT	H1	1	Azul	P1	Micelial
		Urina	21/03/2016	HU CTI	111 CT	H6	2	Azul	P1	Cotonosa
9	Óbito	Urina	01/01/2015	HU CTI	54 CT	H1	7	Azul	P6	Rugosa
		Urina	27/02/2015	HU CTI	71 CT	H1	7	Azul	P2	Rugosa
10	Óbito	TRI	03/12/2016	HU CTI	138 CT	H3	4	Azul	P1	Cotonosa
		Ascite	09/12/2016	HU CTI	143 CT	H3	4	Azul	P1	Micelial
		Urina	06/01/2017	HU CH	148CT	H1	1	Azul	P1	Cotonosa
		Urina	19/01/2017	HU CH	149CT	H1	4	Azul	P2	Lisa
11	Óbito	Urina	02/08/2013	HU MH	14 CT	H8	5	Azul	P1	Cotonosa
		Urina	01/11/2013	HU CTI	26 CT	H5	5	Azul	P1	Lisa
		Cateter	20/11/2013	HU CTI	29 CT	H10	5	Azul	P12	Micelial
		Sangue	20/11/2013	HU CTI	30 CT	H10	5	Azul	P2	Cotonosa
12	Óbito	Sangue	26/08/2016	HU MM	132 CT	H3	2	Azul	P1	Lisa
		Cateter	28/08/2016	HU CTI	134 CT	H3	2	Azul	P1	Cotonosa
		Cateter	28/08/2016	HU CTI	135 CT	H3	2	Azul	P1	Cotonosa
13	Alta	Urina	26/03/2015	HU MH	73 CT	H1	5	Azul	P2	Cotonosa
		Urina	13/04/2015	HU MH	78 CT	H1	1	Azul	P1	Micelial
14	Óbito	Sangue	12/08/2013	HU CTI	15 CT	H3	2	Azul	P8	Micelial

		TRI	24/08/2013	HU CTI	19 CT	H3	2	Azul	P1	Cotonosa
15	Alta	Urina	21/03/2016	HU MM	110 CT	H3	2	Azul	P18	Lisa
		Urina	23/03/2016	HU CH	112 CT	H3	2	Azul	P1	Lisa
16	Óbito	Sangue	28/10/2013	HU CTI	24 CT	H1	1	Azul	P1	Rugosa
		Sangue	28/10/2013	HU CTI	25 CT	H10	5	Azul	P1	Micelial
17	Óbito	TRI	29/12/2015	HU CTI	99 CT	H3	2	Azul	P1	Cotonosa
		Urina	11/01/2016	HU CTI	101 CT	H3	2	Azul	P1	Cotonosa
		Urina	11/01/2016	HU CTI	102 CT	H3	2	Azul	P1	Cotonosa
18	Óbito	Cateter	04/10/2016	HU CTI	139 CT	H3	1	Azul	P1	Rugosa
		TRI	05/12/2016	HU CTI	140 CT	H3	2	Azul	P1	Cotonosa
19	Óbito	Urina	20/05/2016	HU MM	116 CT	H1	1	Verde	P6	Cotonosa
		Urina	07/06/2016	HU CTI	120 CT	H1	1	Verde	P1	Cotonosa
		Urina	13/06/2016	HU CTI	121 CT	H1	1	Verde	P1	Cotonosa
		Urina	27/06/2016	HU CTI	122 CT	H1	1	Verde	P1	Cotonosa
20	Óbito	TRI	30/09/2015	HU CTI	86 CT	H3	1	Azul	P2	Lisa
		Urina	18/10/2015	HU CTI	89 CT	H3	2	Verde	P1	Cotonosa
21	Óbito	Urina	01/07/2016	HU CTI	124 CT	H1	2	Azul	P18	Cotonosa
		Urina	08/08/2016	HU CTI	129 CT	H1	2	Azul	P18	Cotonosa
22	Óbito	TRI	18/10/2016	HU CTI	136 CT	H3	4	Azul	P2	Cotonosa
		Urina	06/12/2016	HU MH	141 CT	H3	2	Azul	P1	Lisa
		Urina	06/12/2016	HU MH	142 CT	H3	2	Azul	P1	Cotonosa
23	Óbito	Sangue	17/01/2016	HU CTI	103 CT	H4	1	Azul	P1	Lisa
		Sangue	17/01/2016	HU CTI	104 CT	H4	1	Azul	P1	Lisa
24	Alta	Urina	13/08/2014	HU CTI	40 CT	H3	2	Azul	P1	Micelial
		Urina	03/09/2014	HU CTI	43 CT	H3	2	Azul	P1	Lisa
25	Alta	TRI	20/07/2016	HU CTI	126 CT	H3	4	Azul	P13	Cotonosa
		Cateter	26/07/2016	HU CTI	127 CT	H3	2	Azul	P13	Cotonosa
		Cateter	26/07/2016	HU CTI	128 CT	H3	2	Verde	P2	Micelial

Haplótipos definidos com base na avaliação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal de 110 sequências de DNA analisadas pelo método de *Median-Joining*. M13: perfil molecular dos 110 isolados com base na DNA *õfingerprintingõ* - primer M13; Chromagar: Variantes de pigmentação das colônias em Chromagar® *Candida*; Morfologia: Variantes morfológicas das colônias de *Candida tropicalis* em Sabouraud dextrose ágar. Perfil Bioquímico: definido a partir dos resultados do sistema Vitek® 2 YST *Card*; Origem: unidade hospitalar de internação; CTI: Centro de Terapia Intensiva; TMO: Unidade de transplante de medula óssea; MH: Enfermaria da medicina dos homens; MM: Enfermaria da medicina das mulheres; CH; Enfermaria cirúrgica dos homens; CM: Enfermaria cirúrgica das mulheres;