Φ

MARCIA DE SOUZA CARVALHO MELHEM

Biótipos, cariótipos e perfis de suscetibilidade a antifúngicos de amostras seriadas de *Candida albicans* de pacientes com candidíase bucal associada à síndrome de imunodeficiência adquirida

Tese apresentada ao Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Saúde Pública

ORIENTADORA: Prof^a Associada Sandra Maria Ottati de Oliveira Nittrini

São Paulo

1997

MARCIA DE SOUZA CARVALHO MELHEM

Biótipos, cariótipos e perfis de suscetibilidade a antifúngicos de amostras seriadas de *Candida albicans* de pacientes com candidíase bucal associada à síndrome de imunodeficiência adquirida

Tese apresentada ao Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Saúde Pública.

ORIENTADORA: Profª.Associada Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitrini

São Paulo

1997

**“A expressão do que existe é uma tarefa infinita”
Merleau-Ponty**

Aos meus três amores: Tom, Renata e Rafael.

AGRADECIMENTOS

Ao lembrar dos amigos que me ajudaram a desenvolver este trabalho, recordo com muita alegria, de quase todos com quem convivi profissionalmente. Muito do conhecimento e desempenho, necessários à conclusão desta tese, foram adquiridos com esses e outros companheiros.

Gostaria de expressar minha enorme gratidão e admiração a todos.

O grande exemplo do maior mestre de todos os micologistas do país, Prof. Dr. Carlos da Silva Lacaz, foi fundamental para minha formação.

A atenção, compreensão e orientação da Profª Dra. Sandra M.O.O. Nitrini deu-me coragem para terminar este projeto.

Com Sandra Regina Brasil Stolf Pukinskas revivi a grandeza da palavra amizade e quanto ela viabilizou este e tantos outros projetos.

A influência da Profª Dra. Maria José. S.M. Giannini, sempre extremamente positiva, foi e continua, sendo muito importante na minha formação.

A força, dedicação e otimismo de Dulcilena de Matos, me amparou e impulsionou nos momentos mais difíceis.

A perseverança e dedicação da Patrícia Elena Gaspar Gradin me ajudaram muito a conseguir este feito.

Dra. Mara Cristina de Souza Pappalardo, foi a amiga que mais me ensinou sobre respeito aos pacientes e compromisso ético na pesquisa.

A garra, impressionante, da Dra. Kátia de Souza Alves, determinou o ritmo de grande parte deste trabalho.

O otimismo, a alegria e a competência do Dr. Sérgio Luiz Funari serão sempre, bons exemplos para mim.

O convívio, estimulante e intenso, com Maria Walderez Szeszs me energiza e facilita muitas das minhas decisões.

A inteligência, competência e a busca incansável do conhecimento, inerentes ao Mauro Cintra. Giudice sempre me ajudaram em meus trabalhos.

A organização e dedicação de Daisy Cristina. Borges da Hora fizeram o alicerce deste trabalho.

A dedicação e responsabilidade de Rosana Cantini me ajudaram e justificam boa parte do meu desempenho.

A extrema gentileza, responsabilidade e capacidade da Prof. Dra. Regina Célio Candido, foram decisivas para consecução deste trabalho.

O desafio de ampliar o escopo deste trabalho, para além da micologia tradicional, foi vencido graças ao empenho e paciência de Ana Mariza Fusco Almeida.

A eficiência e extrema dedicação de Andrés Avelino Baez me trouxeram tranquilidade e mais segurança no trabalho.

A força espiritual, delicadeza e disponibilidade da Sra. Francisca Maria Bustamante sempre será um exemplo para mim.

O profissionalismo e a dedicação de Áquila Maria Lourenço Gomes me ajudaram muito neste e em todos os outros trabalhos.

A presteza e capacitação de Antonio Roberto de Souza Ferreira viabilizaram a divulgação e preparação de muitos de meus trabalhos.

O amor à profissão e a capacitação de Sara Tetner Bustein sempre impressionou a mim e a todos que com ela convivem.

A solicitude e eficiência de Cristina Mayume Mine me facilitaram a execução de muitas tarefas.

A amável, competente e decisiva ajuda de Cristina Higashi me colocaram, com segurança, na saída do túnel.

Sempre foi muito agradável e importante para meu desenvolvimento, ter em volta mentes jovens e desafiadoras como as dos aprimorandos: Adriana Zanella, Ana Maria Gonçalves da Silva, Claudio Talarico, Juliana Sant'Anna Vilela, Lia Flávia Araujo Santos, Miriam Lopes da Silva, Rosimar Santos Castro, Solange Antunes Nery, Tânia Sueli de Andrade e Valdecir Joel Bueno.

Todos os outros tantos amigos, da vida profissional e pessoal, tiveram e têm muita influência em minha vida, acreditando e valorizando meu trabalho e gostaria de agradecer esse apoio a todos eles. Mas, pela ajuda extra, nesta pesquisa, deixo agradecimento especial, aos amigos Dr. Carmo Elias Andrade Melles, D. Georgina Stolf, Inalda Marraccine Gonçalves e Hilda Maria da Rocha Rinaldi.

Minhas queridas irmãs, Maria Amélia e Marilda, me apoiaram o tempo todo na lida com a ciência e com isso me sinto forte e profundamente grata.

E, com o maior carinho, agradeço aos meus grandes pais, Marize e Mário, que me deram a melhor herança: seu exemplo.

Este trabalho foi realizado nos

Laboratórios da Seção de Micologia do Serviço de Parasitologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL-SP), Laboratórios da Disciplina de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Araraquara, SP e Laboratórios da Disciplina de Micologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FCFRP-USP)

e recebeu apoio financeiro

da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal Especializado e Superior (CAPES) para sua execução e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Programa Estadual DST/AIDS, através do convênio Secretaria da Saúde, Ministério da Saúde e Banco Mundial, para sua divulgação.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi estudar a variação de subtipos e suscetibilidade a fármacos antifúngicos de amostras de *Candida albicans* isoladas de 25 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS. Foram coletadas três amostras seriadas de cada paciente, sendo a primeira antes do tratamento, a segunda após o início da terapia com fármaco antifúngico e a terceira durante esta e após remissão clínica da lesão bucal. As 75 amostras, assim obtidas, foram submetidas à prova fenotípica de biotipagem de ODDS & ABBOTT (1980), morfotipagem e cariotipagem por eletroforese em campo pulsátil (CHEF-DR II, Bio-Rad, USA). O padrão de peso molecular de *Saccharomyces cerevisiae* foi usado como controle de qualidade da corrida eletroforética e para cálculo do peso molecular. O DNA das cepas foi contido em blocos de agarose para a eletroforese em gel. A corrida eletroforética ocorreu a 150 V e 13°C com intervalos de pulso de 120 s durante 24 h e a 240 s por 36 h. Após a corrida, as bandas de DNA contidos no gel foram coradas com brometo de etídio, fotografadas sob luz ultra-violeta e analisadas a "olho nú". Provas de suscetibilidade a fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B foram realizadas por técnica de microdiluição em caldo com todas as amostras. Para a prova foi utilizado meio RPMI com L-glutamina e inóculo final de $0,9-4,5 \times 10^4$ cel. ml⁻¹ padronizado em espectrofotômetro a 530 nm. *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) foi incluída como controle de qualidade dos testes. Estes foram realizados em placas de microtitulação e incubadas à 30°C por 24 horas. A leitura de IC₅₀ para os fármacos azólicos e IC₁₀₀ para anfotericina B foi feita em espectrofotômetro a 460 nm.

A tipagem das amostras revelou 14 morfotipos, 13 biótipos de ODDS & ABBOTT e 11 cariótipos. A maioria dos pacientes apresentavam um só biótipo (68,0%) ou um só cariótipo (72,0%) nas três amostras analisadas. Todos os cariótipos apresentaram bandas de DNA entre 850 kb e 2200 kb e um deles, agrupando 8 (10,7 %) cepas, também mostrou bandas em 680 kb.

Os fármacos apresentaram boa atividade antifúngica *in vitro* contra as amostras estudadas, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) para anfotericina B situados entre 0,31 µg ml⁻¹ a 2,50 µg ml⁻¹. De 1 (4,0%) paciente foram isoladas cepas de mesmo cariótipo, consideradas resistentes *in vitro* para anfotericina B, desde que o CIM para o fármaco foi 2,5 µg ml⁻¹ nas três amostras analisadas. Para as 75 amostras o CIM de fluconazol situou-se entre $\leq 0,09$ µg ml⁻¹ e 12,5 µg ml⁻¹, para cetoconazol entre $\leq 0,02$ µg ml⁻¹ e

0,62 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e para itraconazol entre $\leq 0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $1,25 \mu\text{g ml}^{-1}$. Três (12,0 %) pacientes apresentavam cepas resistentes *in vitro* ao fluconazol, sendo 2 (8,0 %) casos após terapia com fármacos azólicos (resistência adquirida) e 1 (4,0 %) com provável resistência natural ao medicamento. Para 2 (8,0 %) pacientes houve falta de correlação de resistência *in vivo* e *in vitro* ao fluconazol. Em 1 (4 %) paciente foi verificada também resistência *in vitro* para cetoconazol e itraconazol.

ABSTRACT

The objective of this longitudinal study was to confirm strain biotyping, karyotyping and variation besides antifungal susceptibility patterns in 75 *C.albicans* isolates from 25 AIDS patients with oropharyngeal candidiasis. Three isolates were obtained from each patient. The first sample was taken before treatment, the second one was obtained during therapy course and the last one was taken after resolution of the lesion but undergoing therapy. All isolates were characterized by morphotyping and biotyping method (ODDS & ABBOTT, 1980) before the molecular karyotype analysis using PFGE. *S.cerevisiae* chromosome size markers were included in the gels as standards. Each gel was electrophoresed in a CHEF-DR II system with pulse intervals of 120 s for 24 h and 240 s for 36 h at 13°C 150 volts. Photographs of ethidium bromide-stained gels were examined visually and the electrophoretic karyotype (Ek) patterns were compared by examining each DNA band present. The susceptibilities of isolates to amphotericin B, itraconazole, ketoconazole, and fluconazole were performed by using broth microdilution method with RPMI 1640 medium with l-glutamina, and final inoculum of $0.9-4.5 \times 10^4$ cel./ml (spectrophotometric method). *C.parapsilosis* (ATCC 22019) was included as quality control of drug activity. In 96-flat bottom well culture plates 10 antifungal concentrations were mixed with yeast suspension, and incubated at 30°C for 24 h. The turbidity in each well was measured at 460 nm with a microdilution plate reader. The MIC end points were defined for the azoles as reduction of 50% of the drug-free control value [IC₅₀]. For amphotericin B the MIC end points were determined by IC₁₀₀.

Biotyping showed 13 subtypes and DNA subtyping of the isolates revealed 11 different Eks. Eighteen (72.0 %) patients were infected with a single DNA subtype throughout the course of infection and 17 (68.0 %) patients harbored the same biotype. All Eks showed bands of 850 kb to 2200kb and only one subtype (8 strains) had an additional 680 kb-band.

All the drugs showed good *in vitro* antifungal activity for the 75 isolates. The amphotericin B MICs ranged from 0.3 to 2.5 µg/ml. In 1 (4.0%) patient the 3 isolates had the same DNA pattern and showed relatively high amphotericin B MICs (2.5 µg/m) suggesting a

natural resistance to this drug. The fluconazole MICs for the 75 strains ranged from ≤ 0.09 to 12.5 $\mu\text{g/ml}$. For itraconazole and ketoconazole the MICs ranged from <0.02 to 1.25 $\mu\text{g/ml}$ and from <0.02 to 0.62 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Three (12.0%) patients harbored fluconazole resistant-strains including 2 (8.0%) patients undergoing azole therapy (acquired resistance) and 1 (4.0%) patient with a probable intrinsic fluconazole-resistant strain. One fluconazole-resistant strain showed resistance to the other two azoles tested (ketoconazole and itraconazole). Of particular interest were 2 (8.0%) patients with clinical but not *in vitro* resistance to itraconazole and ketoconazole.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Candidíase bucal	2
1.2. Aspectos epidemiológicos relacionados ao agente etiológico	3
1.3. Tipagem de <i>Candida albicans</i>	4
1.4. Provas de suscetibilidade a fármacos com ação antifúngica	11
2.OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Local	17
3.2. Amostras	17
3.3. Isolamento e identificação de gênero e espécie	18
3.4. Provas fenotípicas	18
3.5. Cariotipagem	23
3.6. Prova de suscetibilidade a fármacos com atividade antifúngica	25
3.7. Análise estatística	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Prova fenotípica	28
4.2. Cariotipagem	29
4.3.Prova de suscetibilidade a antifúngicos	29
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	66
7. ANEXOS	68
7.1.Anexo 1.Ficha clínico-epidemiológico-laboratorial dos pacientes	68
7.2.Anexo 2.Protocolo de identificação de leveduras	69
7.3.Anexo 3.Esquema de concentrações de fármacos	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

A pandemia da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) desencadeou inquietantes questões sobre o controle de infecções associadas, quer seja por microrganismos tradicionalmente patogênicos ou, principalmente, por agentes etiológicos emergentes, com perfil francamente de oportunistas. Os novos patógenos encontraram na população infectada com HIV ("*human immunodeficiency virus*") condições propícias ao seu desenvolvimento, causando quadros mórbidos diversos e alterando, significativamente, a qualidade de vida destes pacientes. Tais infecções, ditas oportunistas, têm sido as grandes responsáveis pelas altas taxas de mortalidade encontradas em AIDS (DUPONT *et alii*, 1994 ; HOLMBERG, 1989) .

Desde o início da epidemia de AIDS, quando o primeiro caso foi documentado com quadro de candidíase bucal, constatou-se a alta prevalência desta micose. KLEIN *et alii*, em 1984, indicaram a candidíase bucal como um dos sinais premonitórios para AIDS. Esta infecção oportunista é a de maior incidência entre os pacientes com infecção pelo HIV, abrindo o quadro de AIDS em cerca de 50% de quase 95.000 casos notificados no Brasil até final de 1996 (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 1996). Os extensos dados epidemiológicos acumulados sobre a AIDS, após quase duas décadas de epidemia, permitem afirmar que a frequência de isolamento de *Candida* e a instalação de quadros clínicos de candidíase bucal aumentam muito com o avanço da infecção pelo HIV (DUPONT *et alii*, 1994 ; MOCROFT *et alii*, 1995). A preocupação com a candidíase oral vai além do quadro clínico propriamente dito, pois o foco de candidíase bucal pode representar, em pacientes com sorologia positiva para HIV, potencial reservatório de leveduras para invasão de outros locais (YEE & WALL, 1994; WILCOX & KAROWE, 1994; RABENECK & LAINE, 1994). A disseminação para tecidos adjacentes pode dificultar a cura da infecção. A candidíase de esôfago, por exemplo, é um dos critérios para prognóstico de sobrevida em pacientes com AIDS, sendo que o risco de óbito aumenta em 15% com o aparecimento desta infecção (MOCROFT *et alii*, 1995).

A frequência de candidíase varia substancialmente, quando citada nos diversos trabalhos encontrados na literatura. A análise desses relatos, abrangendo pacientes adultos com AIDS, oriundos de países da Europa, África, Estados Unidos e Argentina, mostra

frequências entre 11% e 96%, sendo a maioria com valores acima de 50 % (GLATT *et alii*, 1988; MELNICK *et alii*, 1988; ODDS, 1988; SAMARANAYAKE & SCULLTY, 1989). A variação da frequência pode sofrer influência de diversos fatores tais como critério de inclusão de pacientes, estágio da infecção pelo HIV e metodologia para diagnóstico da candidíase bucal. Apesar disso, é inegável a grande associação entre infecção pelo HIV e candidíase bucal, tanto que a micose é indicada como um importante marcador para diagnóstico de infecção pelo HIV (PINDBORG, 1989; PORTILLA *et alii*, 1994). No Brasil, dados de incidência de candidíase bucal associada à infecção pelo HIV podem ser encontrados nos trabalhos de CARVALHO *et alii* (1994) e SANTOS *et alii* (1994).

1.1. Candidíase bucal

O termo candidíase compreende um grupo de alterações causadas por leveduras do gênero *Candida*. A forma clínica denominada pseudomembranosa, comumente referida na língua inglesa como *thrush*, é talvez uma das mais antigas doenças da cavidade bucal citadas na literatura médica. HIPPOCRATES (600 a.c. e mais tarde, GALENO (130 d.C.) *apud* SAMARANAYAKE & MACFARLANE (1990) associaram a ocorrência de certo tipo de afta bucal ("*afthas albus*"), posteriormente reconhecida como *thrush*, às doenças debilitantes. Em fins do século XVII, LEEUWENHOEK observou leveduras ao microscópio e LANGENBECK em 1839 *apud* SAMARANAYAKE & MACFARLANE (1990), confirmou a presença destes fungos em lesões bucais. Somente em 1842, GRUBY definiu, clinicamente, a natureza e o agente etiológico da *thrush*, reclassificado como *Monilia albicans* por ZOPF, em 1890 *apud* SAMARANAYAKE & MACFARLANE (1990). Esta denominação teve ampla aceitação, conferindo o nome de monilíase à infecção bucal causada por leveduras. Estudos de CASTELLANI, em 1927, demonstraram que outras espécies eram também agentes etiológicos da micose. Mais tarde, em 1923, BERKHOUT sugeriu um novo gênero - *Candida* -, para incluir os agentes etiológicos dessa doença, resultando, assim, na criação do nome *Candida albicans* para seu principal agente, que passou então a ser referida como candidíase (SAMARANAYAKE & MACFARLANE, 1990). A maioria das micoses contém o sufixo -ose em sua denominação, daí muitos autores preferirem utilizar o termo candidose, em lugar de

candidíase, pois esta forma contém o sufixo mais empregado em doenças parasitárias (ODDS, 1988).

A candidíase bucal somente adquiriu maior importância na clínica médica após o emprego de antibióticos de largo espectro, fármacos imunodepressores e, mais recentemente, com o advento da AIDS. Esta micose pode se apresentar sob formas clínicas variadas (PINDBORG, 1989). Em 1828, BILLARD já descrevia 3 tipos de candidíase da cavidade oral, de acordo com o aspecto morfológico das lesões e seqüelas. Muitas classificações foram propostas desde então, incluindo quadros agudos e crônicos. Candidíase bucal pode, hoje, basicamente, ser classificada em infecção confinada a tecidos da cavidade bucal ou perioral (candidíase primária) e em infecção bucal resultante de doença mucocutânea crônica (candidíase bucal secundária). A candidíase primária pode ser subdividida em: pseudomembranosa aguda (denominada em inglês *thrush*); aguda atrófica (eritematosa); crônica hiperplásica; queilite angular associada à *Candida* e crônica atrófica (estomatite por dentadura). As 4 primeiras variantes clínicas estão, geralmente, presentes em pacientes com AIDS, sendo a forma crônica hiperplásica a mais rara. A forma aguda pseudomembranosa ("*thrush*") pode assumir, nesses casos, caráter crônico (SAMARANAYAKE & MACFARLANE, 1990).

1.2. Aspectos epidemiológicos relacionados ao agente etiológico

Atributos de virulência, somados a fatores predisponentes intrínsecos ao hospedeiro, podem facilitar a transição da levedura comensal e inócua, para patógena (LACAZ *et alii*, 1991). O elenco de condições do hospedeiro que predispõe às infecções oportunistas, tem sido objeto de diversas publicações científicas (TAVITIAN *et alii*, 1986a). A infecção pelo HIV figura entre elas. Muitos autores sugeriram que, conforme aumenta a deficiência imunológica do hospedeiro, as mesmas amostras saprófitas de *Candida albicans* tornam-se patógenas em potencial em pacientes com AIDS (WHELAN *et alii*, 1990; POWDERLY *et alii*, 1992; SANGEORZAN *et alii*, 1994). Estes achados se contrapõem a outros, os quais mostram que cepas oriundas de pacientes infectados pelo HIV diferem das amostras comensais, quer seja na frequência do fenótipo de sorotipo B de *Candida albicans* ou de outro marcador sorológico, reconhecido pelo anticorpo monoclonal H9, descrito por BRAWNER & CUTLER (1989). SCHMID *et alii* (1992)

afirmaram que a cepa comensal pode ser substituída no início e de modo definitivo nas primeiras manifestações de AIDS. O tema é complexo e apaixonante abrangendo, ainda, outros aspectos relacionados não só a características da cavidade oral, como também a fatores sistêmicos e iatrogênicos.

Fármacos com ação antifúngica há tempos são utilizados para tratar candidíase bucal, sendo que alguns especialistas indicam seu uso profilático em pacientes de alto risco para a micose. Nos tratamentos de doença sistêmica, o objetivo é a eliminação total da levedura dos tecidos do hospedeiro, porém, é improvável que isto venha a ocorrer nos casos de candidíase cutâneo-mucosa. Após o uso de medicação com antifúngicos, pode-se até reduzir o grau de colonização mas, raramente, logra-se a eliminação total das leveduras da cavidade bucal ou mesmo de tecidos adjacentes nestes casos (TAVITIAN *et alii*, 1986b). Em pacientes HIV positivos, foi demonstrado que no período que sucede à suspensão da terapia, leveduras do gênero *Candida* podem ainda estar presentes na cavidade bucal e altas taxas de antigenemia indicam que a levedura pode ainda estar invadindo tecidos (AGRESTI *et alii*, 1994). Tais fatos sugerem que muitos indivíduos tornam-se portadores assintomáticos da levedura, sendo difícil, se não impossível, a eliminação total do fungo sem a remoção das condições predisponentes da infecção. Desse modo, em paciente severamente imunodeprimido, prevêem-se longos períodos de colonização. Frente a esses dados, é muito importante o conhecimento mais profundo sobre o agente etiológico da candidíase, o que pode ser obtido a partir de estudos longitudinais que incluam metodologia analítica para determinar espécies e subtipos.

1.3. Tipagem de *Candida albicans*

Apesar da existência de diversos sistemas de tipagem de leveduras, não há consenso entre os especialistas sobre o método ideal para estudo dos subtipos (ODDS *et alii*, 1992). Assim, progressivamente, novas técnicas têm sido descritas, no intuito de padronizar métodos adequados e confiáveis. A maioria dos métodos propostos para subdividir um grupo de leveduras da mesma espécie foi desenvolvida a partir de estudos com *Candida albicans*, sendo os mais tradicionais aqueles baseados nas características fenotípicas.

Os métodos fenotípicos, em que são estudadas as características estruturais (BEZJAK *et alii*, 1990), morfológicas (BROWN-THOMSEM, 1968), antigênicas (HASENCLEVER & MITCHELL, 1961; BRAWNER, 1991) e bioquímicas (BERNARDIS *et alii*, 1989; LEHMANN *et alii*, 1989; MARUMO & AOKI, 1990; MANAFI *et alii*, 1991) têm ainda grande importância para separar grupos ou espécies (SULLIVAN *et alii*, 1995; TSANG *et alii*, 1985). Para esta análise, os dados devem ser suficientes e adequados, abrangendo um elenco representativo de testes para credibilidade de seus resultados (HUNTER & FRASER, 1989; HUNTER, 1989). Em micologia, o número de características consideradas, segundo os métodos descritos na literatura especializada, parece ser ainda muito pequeno, quando comparado, por exemplo, ao número recomendado para testes fenotípicos em sistemática bacteriana. Conseqüentemente, o poder de discriminação destes métodos, quando aplicados à micologia, é, comparativamente baixo. A reprodutibilidade de muitos deles ainda é questionada (HUNTER, 1991a; HUNTER, 1991b). Mesmo com limitações, os métodos fenotípicos têm sua indicação para agrupamentos iniciais e são adequados e suficientes para certos estudos epidemiológicos, apresentando a vantagem de, em regra, serem mais acessíveis que os métodos moleculares (ARBEIT, 1996).

Desde o trabalho pioneiro de BLASCHKE-HELLMESSEN (1968), vários métodos têm sido aplicados para diferenciar leveduras pertencentes à uma mesma espécie. Contribuições importantes foram feitas ao conhecimento do agente etiológico da candidíase, através de estudos com métodos fenotípicos, tendo, como princípio, diferenças morfológicas da cultura (PHONGPAICHIT *et alii*, 1987), padrões de assimilação de carboidratos, propriedades enzimáticas (REMOLOD *et alii*, 1968; ROMÁN & SICILIA, 1983; WILLIAMSON *et alii*, 1986a e 1986b; WILLIAMSON *et alii*, 1987), resistência a substâncias químicas ou fármacos antifúngicos (WARNOCK *et alii*, 1979; MACCREIGHT & WARNOCK, 1983), sorotipagem (HASENCLEVER & MITCHELL, 1960) e sensibilidade a toxinas produzidas por determinadas leveduras (MORACE *et alii*, 1984; POLONELLI *et alii*, 1991). Alguns métodos combinam a análise de características fisiológicas e resistência a substâncias químicas e antifúngicos. Em nosso meio, diversas investigações importantes sobre candidíase foram realizadas com métodos fenotípicos (SHIMIZU, 1988; MAFFEI, *et alii*, 1990; SHIMIZU, 1990; PAULA *et alii*, 1990;

QUIRINO, 1990; SOUZA *et alii*, 1990; RICCI *et alii*, 1991; CANDIDO, 1991; BARRETO de OLIVEIRA, 1993; SILVEIRA *et alii*, 1993; CANDIDO *et alii*, 1996; CARAMALAC, 1995; MAFFEI, 1996).

O método clássico de ODDS & ABBOTT, desenvolvido em 1980, foi posteriormente modificado e pode ser utilizado em conjunto com métodos de biologia molecular, para definir biótipos de *Candida albicans* em estudos epidemiológicos (MARHOUS *et alii*, 1990; HUNTER, 1991a). O método classificado na categoria de biotipagem, por utilizar assimilação de fontes de carbono, é uma conjunção de resistotipagem e assimilação.

A possibilidade de determinar subtipos de *Candida albicans* por meio das diferenças morfológicas das culturas foi comprovada por PHONGPAICHIT *et alii* em 1987 que, semeando amostras em ágar malte e descrevendo suas características de borda, superfície e outras, propuseram método de tipificação denominado morfotipagem. Os resultados desses testes, inicialmente traduzidos por números compostos por 7 dígitos, foram, posteriormente, expressos por 4 dígitos (HUNTER *et alii*, 1989). A variação macromorfológica das culturas de *Candida albicans* havia sido descrita desde 1946 por MACKINNON *apud* CANDIDO (1991). A influência das condições de crescimento das culturas, tais como pH, composição do meio e tensão de O₂, sobre a morfologia das culturas, foi determinada por BROWN-THOMSEM (1968).

Apesar de antiga, a classificação de amostras conforme diferenças fenotípicas ainda é muito utilizada em investigações epidemiológicas. Os diferentes fenótipos servem para identificar fontes de contaminação em surtos de infecções hospitalares (PHELPS *et alii*, 1986), existência de vários biótipos em uma mesma lesão (MACCREIGHT *et alii*, 1984; HELLYAR, 1986), predominância de certos biótipos em determinadas partes do mundo e adaptação de biótipos a regiões topográficas do corpo humano (ODDS *et alii*, 1983; KROGH, 1987). Podem ainda ser relacionados com diferentes graus de virulência ou perfis de suscetibilidade a fármacos com ação antifúngica (KORTING & DORSH, 1987; GALLAGHER *et alii*, 1992.; OLIVER & READE, 1993). BRUATTO *et alii* (1991) verificaram alternância de biótipos de *Candida albicans* em lesões de candidíase bucal de pacientes HIV positivos, após instituição de terapia antifúngica. De outro modo a persistência de um mesmo biótipo nas recidivas de lesões de um paciente foi verificada por

KORTING *et alii* (1988) empregando testes de tipagem fenotípica em amostras biológicas seriadas. O estudo dos efeitos *in vitro* de fármacos de ação antifúngica sobre amostras de *Candida albicans* permitiu a identificação de biótipos diversos quanto aos aspectos morfológicos, a descrição de novas espécies ou indicar fenótipos atípicos (KOBAYASHI *et alii*, 1991; GIL *et alii*, 1994; MORAN *et alii*, 1997).

A exemplo do que ocorre em outras ciências, métodos de biologia molecular têm sido cada vez mais aplicados em micologia para estudos de populações de fungos (EGGER, 1992). Em micologia médica, a análise genética é muito usada para tipagem de leveduras, seja em conjunção ou em substituição à análise fenotípica. As técnicas de tipagem molecular são baseadas em caracterização física de moléculas quanto à presença de ácidos graxos, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e outras substâncias químicas.

Dois critérios são importantes para a escolha do método de subtipagem molecular: reprodutibilidade e poder discriminatório. A reprodutibilidade interlaboratorial refere-se à percentagem de resultados iguais obtidos em diferentes locais, frente às mesmas amostras analisadas segundo o mesmo método. A reprodutibilidade intralaboratorial é expressa em percentagem de resultados iguais obtidos em testes realizados com as mesmas amostras, mas, em momentos diversos. Ou seja, as cepas classificadas dentro de um mesmo subtipo deverão ser sempre classificadas desse modo, em testes repetidos em sequência. O poder discriminatório de um método pode ser avaliado segundo índice de diversidade de SIMPSON, recomendado por HUNTER & GASTON, 1988, dado pela seguinte equação:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

onde D é o índice numérico de discriminação, N é o número de cepas da população estudada, S é o número de subtipos descritos e n_j é o número de cepas pertencentes ao subtipo j .

Dentre os métodos de subtipagem molecular, aqueles baseados em ácidos nucleicos têm se mostrado extremamente úteis para investigações epidemiológicas, especialmente devido a seu alto poder discriminatório e grande reprodutibilidade. Além disso, não necessitam de reagentes específicos para diferentes agentes etiológicos. São aplicáveis na tipagem de todas as cepas, permitem avaliação objetiva dos resultados, são passíveis de automação e permitem análise estatística dos dados (SCHMIDT *et alii*, 1990; PERSING

et alii, 1993). Diversas técnicas têm sido aplicadas, entre elas: análise de DNA genômico ou plasmidial com enzimas de restrição tipo endonucleases, “*fingerprinting*” baseado em “*probes*” ou reação em cadeia por polimerases (PCR) e eletroforese de campo pulsátil (PFGE = “*pulsed field gel electrophoresis*”). A decisão de escolha para aplicação da técnica mais adequada depende de muitos fatores, inclusive do agente etiológico (SCHERER & STEVENS, 1987).

Em estudos com *Candida albicans*, as técnicas de RFLP (“*restriction fragment length polymorphism*”) e PFGE têm sido as mais utilizadas. A extensa aplicação da técnica de PFGE em laboratórios de microbiologia pode ser apreciada na revisão recentemente, publicada por LAHTI (1996). A técnica de PFGE revela os cariótipos eletroforéticos e tem sido apontada como mais reprodutível, mais sensível e mais simples de ser interpretada, do que a de RFLP (LAHTI, 1996). Esta afirmação é baseada no número menor de bandas de DNA mostradas nos cariótipos (STEVENS *et alii*, 1990; VAZQUEZ *et alii*, 1991). Por outro lado, os padrões diversificados, obtidos por hibridização *Southern blot* com sondas Ca3 e 27^A, sugerem que o poder discriminatório da técnica de RFLP é maior que o de PFGE (SCHMID *et alii*, 1990; SOLL *et alii*, 1992). MAGEE *et alii* (1992), no entanto, identificaram diferentes cepas através de PFGE de genoma digerido com enzima *EcoRI* e hibridizado com sonda 27A, não separadas pela técnica de *Southern blot*.

Na década de 80, começaram a ser publicados trabalhos dedicados à tipagem de leveduras de interesse médico através de estudos de DNA. Hoje existe considerável literatura sobre o assunto (LEE *et alii*, 1986; LOTT *et alii*, 1987; SCHERER & STEVENS, 1987; MERZ *et alii*, 1988; MAGEE *et alii*, 1988; KWON-CHUNG *et alii*, 1989; LASKER *et alii*, 1989; MERZ 1990; MONOD *et alii*, 1990; MAHROUS *et alii*, 1990; VASQUEZ *et alii*, 1991; WICKES *et alii*, 1991; MAGEE *et alii*, 1992; BRANCHINI *et alii*, 1994; DOI *et alii*, 1994; BILLE, 1995; BART-DELABESSE *et alii*, 1995; MATHABA *et alii*, 1995; McCULLOUGH *et alii*, 1995; COLOMBO *et alii*, 1996). Estes autores demonstraram que os métodos de tipagem genotípica têm aplicação importante no campo da taxonomia e da epidemiologia das infecções por leveduras.

KWON-CHUNG *et alii* (1988) e MAHROUS *et alii*. (1990) em investigações distintas, demonstraram associação entre determinados subtipos de DNA e características

de virulência em leveduras. STEVENS *et alii* em 1990, encontraram associação entre certos subtipos de *Candida albicans* e trato genito-urinário em 71 % dos pacientes estudados. Segundo esses autores, variadas localizações topográficas de um mesmo paciente tendem a ser colonizadas ou infectadas por cepas com um único padrão de DNA, fato que pode representar oportunismo transitório da cepa que passou a infectar o indivíduo, em um certo tempo e, posteriormente, disseminou-se para outras regiões do corpo.

MERZ (1990) analisou e comparou quatro métodos principais de biologia molecular no estudo de leveduras causadoras de candidíase bucal, em relação as suas vantagens e desvantagens. Sugeriu que a tipagem de DNA, por técnica eletroforética, é o método com maior potencial de discriminação. Outros autores também observaram o alto poder de resolução destas técnicas (EGGER, 1992; DOI *et alii*, 1993; DOI *et alii*, 1994; BART-DELABESSE *et alii*, 1995; BARCHIESI *et alii*, 1995b; LUPETTI *et alii*, 1995). A tipagem por PFGE foi indicada como sendo o método mais sensível por STEVENS *et alii* (1990) e com maior poder de resolução por MAGEE *et alii* (1992). A vantagem da metodologia de RFLP deve-se à rapidez e facilidade da técnica. O estudo de VASQUEZ *et alii* (1991) no entanto, demonstrou que a técnica de PFGE é melhor do que a de RFLP em relação aos aspectos: sensibilidade, reprodutibilidade, praticidade de execução e facilidade de interpretação de resultados. A excelente reprodutibilidade do método ficou provada nos trabalhos em candidíase bucal de DOEBBELING *et alii* (1993) e de REDDING *et alii* (1994).

A análise de subtipos moleculares, através de eletroforese em gel, iniciou-se em 1987 com LOTT *et alii*, em estudo com *Candida albicans*. Os autores encontraram em cada subtipo, 4 agrupamentos (“clusters”) de bandas, atribuídas a cromossomos, com mobilidade eletroforética distintas no gel. SNELL *et alii*, no mesmo ano, verificaram perfis eletroforéticos distintos em amostras de *Candida albicans*. Um ano depois, MERZ *et alii* analisando outras amostras de *Candida albicans*, por PFGE em campo ortogonal (OFAGE), observaram que cada agrupamento de faixas poderia conter mais de um cromossomo, fato comprovado após variação das condições do experimento. Conseguiram demonstrar 7 a 9 bandas em cada subtipo e puderam observar 14 subtipos diferentes, denominados de padrões eletroforéticos. Cada perfil eletroforético foi definido como um

cariótipo. No mesmo ano, MAGEE *et alii* introduziram a técnica de PFGE por campo homogêneo alternado no estudo de leveduras, técnica até hoje muito recomendada em micologia, para investigação da diversidade de subtipos, baseada em perfis de mobilidade eletroforética. Foram desenvolvidos estudos utilizando essa técnica, às vezes com adição de sondas moleculares, concluindo-se que esta espécie tem de 7 a 9 cromossomos com mobilidades distintas, resultando em subtipos distintos. Este polimorfismo, apresentado em amostras de *Candida albicans*, é expresso sob forma de diferentes subtipos.

Desse modo, a tipagem tem se revelado útil não somente no campo da sistemática mas também em epidemiologia, na elucidação da distribuição espacial e temporal de subtipos de *Candida albicans* em infecções humanas. Mesmo assim, a epidemiologia da candidíase recorrente permanece ainda pouco conhecida. Apesar da maioria dos episódios de recidiva da doença ser creditada à persistência da cepa infectante original, não se sabe ainda, quantos desses episódios são causados por reinfecção com novas e diferentes cepas (PFALLER, 1992). A subtipagem de leveduras isoladas durante os episódios de recidiva da infecção permite análise de similaridade entre as cepas e dá suporte ao estudo da suscetibilidade aos fármacos antifúngicos de amostras sequenciais. A variação na suscetibilidade aos fármacos por uma mesma cepa, ao longo do curso de infecção, pode ser avaliada conjugando-se métodos de subtipagem (PFALLER, 1995). Desse modo, a tipagem genética também pode servir de marcador epidemiológico para estudos de resistência a fármacos antifúngicos. A tipagem por métodos fenotípicos é menos usada para esta finalidade (RUHNKE *et alii*, 1994b). Usando técnicas para subtipagem de DNA de amostras de *Candida albicans* de pacientes com quadros recorrentes de infecção e sob terapia prolongada ou intermitente com fármacos antifúngicos, autores puderam comprovar aumento gradual de resistência a antifúngicos nessas amostras (MCCULLOUGH & HUME, 1995). Puderam também provar a introdução ou seleção de cepas diferentes da original, com menor sensibilidade a antifúngicos. Em 1995, GOFF *et alii*, estudando pacientes com sorologia negativa para HIV, descreveram a existência de amostras de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol que nunca haviam sido expostas aos fármacos azólicos.

1.4. Provas de suscetibilidade a fármacos

Para controle de infecções por *Candida albicans*, dispôs-se, durante muitos anos, apenas de fármacos poliênicos: anfotericina B, de ação sistêmica para casos de infecção grave ou recidivante e nistatina para uso tópico, muito empregada em casos de candidíase bucal. Porém, a dificuldade de administração da anfotericina B e os problemas com falta de disciplina ou intolerância do paciente na aplicação tópica da nistatina, levaram à busca de novos fármacos. A indústria farmacêutica respondeu à esta demanda com a produção de fármacos azólicos e mais recentemente, com triazólicos: cetoconazol, fluconazol e itraconazol (RABENECK & LAINE, 1994). Em 1983 surgiu a questão da resistência aos triazóis, a partir do trabalho de HORSBURGH *et alii* que verificaram o fenômeno em pacientes com candidíase mucocutânea crônica tratada com cetoconazol. O aparecimento de resistência, em pacientes com terapia oral com azóis, já havia sido notificado por HOLT & AZMI desde 1978. Avaliações clínicas da eficácia desses antifúngicos têm sido alvo de inúmeras publicações, com resultados diversos (WARNØCK *et alii*, 1983; HUGHES *et alii*, 1988; CHAVE *et alii*, 1990; LOREN *et alii*, 1992; LAINE *et alii*, 1992; DENNING, 1995b; DE WIT *et alii*, 1993). Muitos são os relatos de “resistência clínica” resultante de fracassos terapêuticos que envolvem fatores do hospedeiro e do agente etiológico (FONG *et alii*, 1993; IMBERT *et alii*, 1994; CHRYSSANTHOU *et alii*, 1995; DENNING, 1995a; CHÉRON *et alii*, 1997).

As investigações acerca da suscetibilidade do agente aos antifúngicos empregados na clínica médica tentam desvendar alguns mistérios que envolvem as constantes recidivas dos quadros de candidíase bucal e a aparente resistência clínica (DE WIT *et alii*, 1989). Os estudos de suscetibilidade a fármacos têm se revestido de maior importância à medida que são registrados casos de falência terapêutica, seja com antigos ou novos fármacos, ou quando são relatadas altas taxas de infecções recorrentes, especialmente em candidíase bucal associada à AIDS (BRUATO *et alii*, 1991; ASAKURA *et alii*, 1991; BART-DELABESSE *et alii*, 1993; BOKEN *et alii*, 1993; DEWSNUP & STEVENS, 1994; REDDING *et alii*, 1994; WHITE & GOETZ, 1994; DENNING, 1995a; LICHEWSKI *et alii*, 1995; OLDFIELD, 1995; REX *et alii*, 1995; ST-GERMAIN *et alii*, 1995). Os testes de suscetibilidade também têm grande valor na avaliação de novos fármacos (BARCHIESI, COLOMBO *et alii*, 1994; RUHNKE *et alii*, 1997).

Os testes de suscetibilidade a fármacos com atividade antifúngica não eram relevantes até a introdução de anfotericina B nos anos 50 e subsequente ocorrência de casos de resistência clínica ao medicamento, especialmente por *Candida não-albicans* (DICK *et alii*, 1985; LOMBARDI *et alii*, 1989; JAKAB *et alii*, 1990; HOPFER 1992; WINGARD, 1994). A justificativa do desenvolvimento de testes de suscetibilidade *in vitro* aumentou com a introdução de 5-fluorocitosina (CALHOUM *et alii*, 1986). Testes de diluição dos fármacos em ágar e caldo de cultura, foram realizados em nosso meio, para estudar o perfil de suscetibilidade de agentes etiológicos de candidíase associada a diversas patologias (ALVES & CURY, 1992a; ALVES & CURY, 1992b; SOARES & CURY, 1995; CURY & MICHE, 1989; CURY *et alii*, 1989). Esses testes foram, também, utilizados para tentar correlacionar subtipos moleculares e resistência aos fármacos (SOUZA *et alii*, 1992).

A determinação *in vitro* da suscetibilidade dos fungos a antifúngicos tem como objetivo principal a orientação, em futuro próximo, da terapêutica mais adequada (REX *et alii*, 1993). Porém, a aplicação dos resultados de testes de suscetibilidade *in vitro* ainda é limitada (POWDERLY, 1994). Há carência de estudos clínico-laboratoriais para validação desses resultados e existem muitos problemas com testes de suscetibilidade, resultantes de variações nas condições do experimento (CALHOUNM *et alii*, 1986; RINALDI, 1992; WANGER *et alii*, 1995).

O desenvolvimento de métodos *in vitro* para análises de suscetibilidade foi intenso, principalmente, com o advento de fármacos azólicos e permitiu diversos experimentos (ODDS, 1993; CUTSEM *et alii*, 1994; METZER *et alii*, 1994). Métodos colorimétricos (PFALLER & BARRY, 1994; TIBALLI *et alii*, 1995) e novas técnicas baseadas em ágar foram propostas e avaliadas (DROUHET *et alii*, 1986; SEWELL *et alii*, 1994; COLOMBO, 1994; COLOMBO *et alii*, 1995; WANGER *et alii*, 1995; ESPINEL-INGROFF *et alii*, 1996a; PATTERSON *et alii*, 1996). Os autores enfatizam a importância da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos fármacos, necessária para inibir o crescimento dos fungos. Poucos pesquisadores indicam métodos alternativos para medir atividade antifúngica (ODDS *et alii*, 1986; ODDS, 1991; GREEN *et alii*, 1994; HAZEN *et alii*, 1994).

Estudos intensos têm sido dedicados à avaliação dos fatores que influem na determinação da CIM, tais como, critérios de leitura dos resultados, ponto limite de leitura, ação de suplementos (detergentes, antibióticos e estimulantes de crescimento), concentração do inoculo, tempo e temperatura de incubação. A determinação do ponto de leitura é um dos mais críticos, visto que influencia sobremaneira os resultados dos testes. O efeito de “arraste” ou *trailing*, observado nos fármacos azólicos, bem estudado por SAAG & DISMUKES em 1988, não está, ainda hoje, totalmente solucionado. Este efeito se caracteriza por falta de proporção entre o aumento da concentração de antifúngicos azólicos e a inibição do fungo. Desse modo, a visualização da inibição do crescimento da levedura não é clara e objetiva. A inibição ocorre de maneira gradual, em gradiente de concentrações do fármaco, de modo que é muito difícil, se não impossível, a determinação da CIM, dentro dos conceitos tradicionais, ou seja, do ponto de inibição completa (100%) do crescimento. Desde 1992, quando ESPINEL-INGROFF *et alii*, sugeriram a leitura do “*end-point*” ou seja, da CIM, em 80% do crescimento para minimizar o problema do *trailing*, muitos estudos foram desenvolvidos. Indica-se atualmente, a leitura de 50% do crescimento - ou 50% de inibição (IC₅₀) - como o ponto de leitura da CIM para os azóis (ANAISSE *et alii*, 1996). A leitura de IC₅₀ tornou-se mais objetiva com o uso de aparelhos espectrofotométricos, utilizados desde 1978 por GALGIANI & STEVENS e recomendados por RODRIGUES-TUDELA *et alii*, 1995).

O fenômeno de antagonismo de substâncias químicas aos antifúngicos foi bem estudado por ODDS *et alii* (1986) e, posteriormente, por DROUHET *et alii* (1988). A influência do tempo de incubação para realização dos testes, menor para anfotericina B do que para cetoconazol e fluconazol, foi estudada em 1990 por PFALLER *et alii*. A influência da temperatura de incubação foi investigada nesse mesmo trabalho. A avaliação de meios de cultura apropriados para os testes, foi objeto de estudo de RADETSKY *et alii* (1986) e PFALLER *et alii* (1990), resultando na indicação do meio RPMI com l-glutamina para as provas de suscetibilidade. A adição de 2 % de glicose ao RPMI ou a sua substituição pelo meio “*Antibiotic Medium 3*” ou casitone para provas com anfotericina B, foi indicada por REX *et alii* (1995) e WANGER *et alii* (1995). A importância de solução tampão preparada com MOPS (ácido morfolinopropilenosulfônico) como diluente do meio RPMI foi demonstrada por MARRIOT & RICHARDSON (1987) e comprovada

por PFALLER *et alii* (1990). A concentração ideal do inóculo foi indicada por PFALLER *et alii* (1988) e ESPINEL-INGROFF *et alii* (1992). A importância da padronização do inóculo por método espectrofotométrico foi ressaltada por PFALLER *et alii* (1988).

O significativo progresso obtido nos testes para determinação da suscetibilidade aos fármacos antifúngicos, foi conseguido graças ao esforço desses diversos grupos de pesquisadores, que trabalharam de modo independente ou em colaboração com um subcomite do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) de Villanova, Pensilvania, USA. Esse subcomite do NCCLS vem, desde 1982, analisando diversos parâmetros críticos na execução dos testes, bem como orientando sobre os métodos a serem utilizados para testes de suscetibilidade a fármacos antifúngicos, de modo a se obter uma prova com reprodutibilidade máxima (NCCLS, 1985).

O trabalho do grupo resultou nos documentos intitulados M27, publicados em duas versões: M27-P (1992) e M27-T(1995). Enquanto a primeira publicação (NCCLS, 1992) propunha técnica de macrodiluição em caldo, relativamente dispendiosa e trabalhosa, a segunda recomendava técnica de microdiluição, mais econômica e prática (ESPINEL-INGROFF *et alii*, 1991; NCCLS, 1995). Os primeiros estudos com este formato mais prático, tiveram início em 1988, quando DROUHET *et alii*, utilizou micrométodo para testes de suscetibilidade à fármacos antifúngicos, empregando diluição em placas de microtitulação contendo 96 orifícios. A leitura automatizada, introduzida mais tarde, permitiu registro da densidade ótica obtida em cada orifício, através de espectrofotometria. Além disso, essa técnica mostrou-se vantajosa permitindo processamento simultâneo de muitas amostras.

A validação do micrométodo veio em 1992, quando ESPINEL-INGROFF *et alii* publicaram os resultados de um estudo multicêntrico, realizado em cinco laboratórios, comparando o micrométodo com o macrométodo de diluição em caldo. Após esta publicação, algumas investigações mostraram a equivalência entre os dois métodos (SHEEHAN *et alii*, 1993; COLOMBO, 1994; ESPINEL-INGROFF *et alii*, 1995; ELDERE *et alii*, 1996).

Todos esses estudos demonstraram pouca variabilidade de resultados para fármacos azólicos em estudos multicêntricos com o micrométodo. Por isso, atualmente, ele

é indicado como padrão para estudos em larga escala com estes medicamentos (PFALLER & BARRY, 1995; RUHNKE *et alii*, 1996).

De acordo com a revisão da literatura, o estudo do perfil de suscetibilidade de *Candida albicans* como agente etiológico da candidíase bucal em pacientes com AIDS pode ser realizado com a técnica de microdiluição em caldo, associada à leitura objetiva por espectrofotometria. Para caracterização do agente, a técnica de biotipagem proposta por ODDS & ABBOTT (1980) permite diferenciação de fenótipos dentro da mesma espécie, e o estudo molecular pode ser realizado com a técnica de eletroforese em campo pulsátil (PFGE) para definir os subtipos de DNA presentes durante o curso da infecção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Contribuir para o conhecimento da epidemiologia de candidíase bucal por *Candida albicans* em pacientes com AIDS, por meio do estudo de subtipos e suscetibilidade a antifúngicos do agente etiológico.

2.2. Objetivos específicos:

1. Avaliar a distribuição de biótipos de *Candida albicans* pela metodologia de ODDS & ABBOTT (1980), de morfotipos (PHONGPAICHIT *et alii*, 1987) e de cariótipos pela técnica de eletroforese em campo pulsátil (PFGE), a partir de amostras biológicas de pacientes com candidíase bucal associada à AIDS.
2. Determinar e comparar os biótipos, morfotipos e cariótipos encontrados em amostras seriadas de pacientes com candidíase bucal e após a remissão clínica da lesão, obtidas antes e durante a terapia com fármacos de ação antifúngica.
3. Traçar o perfil de suscetibilidade das 3 amostras seriadas a quatro fármacos: fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B, durante o curso clínico da infecção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

O grupo estudado constituiu-se de pacientes com AIDS, atendidos em 3 unidades de 2 hospitais especializados da cidade de São Paulo: Ambulatório e Serviço de Odontologia do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) e Ambulatório do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (CRT DST/AIDS) da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

A identificação de gênero e espécie, a prova fenotípica de ODDS & ABBOTT (1980), a extração do DNA para prova genotípica e a prova de suscetibilidade aos fármacos com ação antifúngica, foram realizadas na Seção de Micologia do Serviço de Parasitologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz. A leitura da prova fenotípica de morfotipagem foi realizada no Laboratório da Disciplina de Micologia do Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto.

A prova genotípica foi realizada no Laboratório da Disciplina de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Araraquara.

3.2. Amostras

Durante o período de setembro de 1992 e agosto de 1996 foram coletadas 402 amostras de raspado de lesão de mucosa bucal de pacientes com AIDS (CDC, 1993) e com candidíase bucal virgem de tratamento. Os pacientes que apresentaram *Candida albicans* foram submetidos a mais duas coletas de material biológico, segundo o seguinte critério: coleta da superfície da mesma lesão inicial durante terapia com medicação antifúngica e uma 3ª coleta, desse mesmo local após cura clínica (ausência de lesão bucal ao exame visual), mas ainda sob terapia. O intervalo entre as três coletas variou de 14 a 139 dias. A cada coleta era preenchida uma ficha (Anexo 1) para identificação e dados clínico-epidemiológico-laboratoriais.

Muitas amostras foram excluídas do presente estudo por transferência, óbito ou abandono de tratamento pelo paciente. Outras amostras não puderam ser aproveitadas por carência de dados clínicos e outras mais foram desprezadas devido a resultados negativos para leveduras ou positivos para outras espécies, o que não era objeto deste estudo.

Para compor esta pesquisa, foram selecionadas 75 amostras de *Candida albicans* de 25 pacientes com candidíase associada à AIDS, obtidas antes e durante terapia com antifúngicos, com e sem lesão clínica.

No grupo, 23 (92,0%) pacientes eram do sexo masculino e 2 (8,0%) eram do sexo feminino, com idade entre 18 e 35 anos. Os grupos de risco identificados foram: sexual em 11 (44,0 %) dos pacientes, uso de drogas endovenosas por 8 (32,0%) pacientes, contato sexual em 2 (8,0%) pacientes e desconhecido em outros 4 (16,0%). O tempo de doença (AIDS), no grupo estudado, variava de 1 mês a 60 meses, quando da coleta da primeira amostra biológica.

3.3. Isolamento das leveduras e identificação de gênero e espécie

O material da superfície da lesão (1ª e 2ª amostras) ou da mucosa bucal (3ª amostra) foi coletado com auxílio de zaragatoa esterilizada e imediatamente semeado por espalhamento na superfície de ágar Sabouraud com cloranfenicol (ASC), contido em tubos de ensaio. Os tubos foram incubados à 30°C por período máximo de 7 dias. Das culturas leveduriformes de cada tubo, foram selecionadas 3 colônias morfológicamente idênticas e todas as que apresentaram diferenças macromorfológicas.

As culturas foram identificadas como *Candida albicans*, de acordo com protocolo de identificação da Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz (Anexo 2), com base em atributos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, segundo metodologia descrita em MEYER *et alii*, 1984.

3.4. Provas fenotípicas

3.4.1. Biotipagem segundo ODDS & ABBOTT, 1980

A prova fenotípica, baseada na biotipagem de ODDS & ABBOTT, 1980 foi realizada em duplicata para todas as amostras. A análise ocorreu em um só período, decorridos 1 a 12 meses após o isolamento das amostras. A biotipagem consta de 5 fases:

Fase 1. Manutenção das leveduras:

Repique semanal das leveduras em tubos contendo ASC e manutenção à temperatura ambiente.

Fase 2. Preparo de inóculo:

A partir das culturas de leveduras, com 48 h de crescimento à 25°C, foram preparadas suspensões em 100 µl de água destilada esterilizada, distribuídas em placas de microtitulação de fundo chato, contendo 96 orifícios. A seguir, cada suspensão foi semeada, com auxílio de inoculador “*replica plater*” (Sigma Chemical, St. Louis, USA), em placas de Petri contendo ágar “*Yeast Nitrogen Base*” (Difco Laboratories, USA) adicionado de glicose. Estas placas, denominadas placas-mãe, foram incubadas à 37°C por 24 h ou 30 h. Destas placas, foram retiradas as suspensões de leveduras, com meio do mesmo inoculador, transferidas para novas placas contendo 100 µl de água destilada esterilizada em cada orifício e emulsionadas por agitação orbital. Essas suspensões, foram transferidas em alíquotas de 20 µl para novas placas contendo 100 µl de água destilada. Esse procedimento resulta na obtenção de suspensões com concentrações aproximadas de 5×10^5 a 5×10^6 células ml^{-1} . Essas suspensões foram, então, semeadas, por meio do inoculador “*replica plater*” na superfície dos diferentes meios para biotipagem.

Fase 3. Meios de cultura utilizados para biotipagem:

- a) pH 1,4
- b) proteinase
- c) 5-fluorocitosina
- d) uréia
- e) sorbose
- f) cloreto de sódio
- g) citrato
- h) glicina
- i) safranina
- j) pH 1,55 (meio utilizado para confirmação de *Candida albicans*)

Fase 4. Condições de reação e leitura das placas**a) Condições de incubação:**

Meio de safranina: incubação à 37° C durante 2 ou 3 dias.

Meios de pH 1,55, uréia, citrato, glicina, cloreto de sódio: incubação à 37°C por 3 ou 4 dias.

Meios de 5-fluorocitosina, pH 1,4 , sorbose: incubação à 37°C por 6 ou 7 dias.

Meio para proteinase: incubação à 37°C por 6 ou 8 dias.

b) Resultados positivos:

Meios de uréia, sorbose, citrato, pH 1,5, pH 1,4 , 5-fluorocitosina, cloreto de sódio e glicina: crescimento da levedura.

Meio de safranina: crescimento de colônias iguais ou maiores do que 2 mm de diâmetro.

Meio de proteinase: halo claro ao redor da levedura.

c) Resultados negativos:

Resultados contrários aos citados no item b desta fase.

Fase 5. Determinação dos biótipos:

Os resultados de biotipagem são registrados como um número composto de 3 dígitos. São atribuídos os valores 1, 2 e 4 aos resultados positivos e aos resultados negativos são dados valores nulos, conforme o esquema mostrado a seguir.

ESQUEMA PARA INTERPRETAÇÃO DAS PROVAS DE BIOTIPAGEM		
Dígitos	Prova	Valor atribuído
1º	crescimento em pH 1,4	1
	produção de proteinase	2
	crescimento frente a 5-fluorocitosina	4
2º	assimilação de uréia	1
	assimilação de sorbose	2
	crescimento frente ao cloreto	4
3º	assimilação de citrato	1
	assimilação de glicina	2
	crescimento em safranina	4
Resultados: Os 3 dígitos que compõem o número que representa o biótipo são os produtos de somatórias de cada um dos 3 valores de cada grupo, separadamente, mantida sempre a mesma ordem.		

3.4.2. Morfotipagem

Todas as amostras de *Candida albicans* foram analisadas, segundo método de PHONGPAICHIT *et alii* (1987). A prova de morfotipagem foi realizada em um só período, após todas as outras análises terem sido concluídas. Durante esse espaço de tempo (12 a 60 meses) as amostras foram mantidas em ágar Sabouraud com cloranfenicol e conservadas à temperatura ambiente.

Das culturas, foram realizadas suspensões em água destilada esterilizada, com turvação semelhante à do tubo 3 da escala de MAC FARLAND. As suspensões foram semeadas, com auxílio de zaragatoa esterilizada, em placas contendo ágar malte. Cada inóculo, realizado em duplicata, tinha cerca de 5 mm de largura por 25 mm de comprimento. As placas foram, então, incubadas à 25°C por 10 dias. Os aspectos morfológicos de franja e superfície da colônia foram analisados e expressos em número composto por 4 dígitos, segundo esquema proposto por HUNTER *et alii* (1989), descrito seguir:

ESQUEMA PARA TIPIFICAÇÃO DE MORFOTIPOS SEGUNDO HUNTER <i>et alii</i> (1989)			
Digito	Objeto da observação (aspecto)	Característica	Valor atribuído
1°	Franja (distribuição)	Ausente	0
		Descontínua ($\leq 20\%$ da margem)	1
		Descontínua (20 a 50% da margem)	2
		Descontínua (60 a 90% da margem)	3
		Contínua somente na periferia ou fios conspícuos em forma de leque	5
		Contínua, com filamentos paralelos	7
2°	Franja (comprimento)	Ausente	0
		$\leq 2\text{ mm}$	2
		Entre 3 a 5 mm	3
		$\geq 6\text{ mm}$	5
3°	Franja (textura)	Ausente	0
		Muito grosseira	1
		Grosseira	2
		Intermediária	3
		Fina	4
4°	Superfície (topografia)	Lisa	0
		Nodular	1
		Escavada	2
		Crateriforme	4
		Crateriforme, com dobras e pregas	5
		Dobras ou pregas	6
		Pelos	8

3.5. Cariotipagem

A cariotipagem das amostras de leveduras foi realizada a um só tempo, após isolamento, identificação biotipagem de todas as culturas. No período entre o isolamento e a prova de cariotipagem (de 3 a 51 meses) as culturas foram mantidas à temperatura ambiente, em tubos contendo ASC, sob repiques bimensais.

3.5.1. Extração do DNA cromossômico

Foram retiradas de 10 a 20 colônias de cada cultura em ágar Sabouraud (AS) após 24 h de incubação à 30°C e semeadas em 50 ml de caldo contendo 1% extrato de levedura, 2% de peptona e 1% de dextrose (YPD *Yeast Peptone Dextrose*), distribuídos em Erlenmeyers de 500 ml. As culturas foram mantidas à 35°C por 24 h, em estufa sob agitação constante (Etika, Brasil). As culturas foram, então, centrifugadas em frascos de 50 ml com tampas rosqueadas (Nalgene Company, USA) por 15 minutos à 3000 rpm, em estufa refrigerada à -4°C (Sorvall Instruments, Dupont, USA). Foram retirados 150 µl do sedimento e as células foram lavadas com 200 µl de EDTA 0,05 M, pH 8,0. A lavagem, executada duas vezes, foi realizada em tubos tipo Eppendorff, em centrífuga refrigerada (Jouan, França) à 4°C, durante 15 minutos.

A um volume de 150 µl de células lavadas foi adicionada enzima lítica (*Lyticase*, Sigma Chemical, USA) para obtenção de protoplastos. A enzima, em solução de fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,5, contendo 50 % de glicerol p.a., foi adicionada na proporção de 1250 U ml⁻¹. A reação de lise ocorreu à 37 °C, por 60 minutos.

Às células foram agregados 560 µl de agarose ("*Low melt preparative grade agarose*", Bio-Rad, USA) à 1%, dissolvida em EDTA 50 mM, pH 8,0, previamente fundida e resfriada à 50°C. O colóide obtido, foi introduzido em moldes (Bio-Rad, USA) e colocados à 4° C por 30 minutos, para solidificação. Após este período, os blocos de agarose foram retirados dos moldes, colocados em tubos tipo Eppendorff e incubados à 50°C por 20 h com 1,5 ml de solução tampão contendo 1 mg ml⁻¹ de proteinase K (Gibco BRL, USA). A solução tampão foi preparada com tampão TRIS 0,01 M, pH 7,5, EDTA 0,45 M, pH 8,0 e 1% de laurilsarcosina (Sigma Chemical, St. Louis, USA). Os blocos foram lavados 3 vezes, por 15 minutos à temperatura ambiente, por três vezes, com solução de EDTA 0,05 M, pH 8,0 e os blocos foram deixados em 3 ml da mesma solução,

à temperatura ambiente, durante 20 h. A lavagem com EDTA foi, então, realizada três vezes no dia seguinte e os blocos foram mantidos à 4°C na solução de EDTA, até o momento da corrida eletroforética.

3.5.2. Eletroforese do DNA

A eletroforese de campo pulsátil foi realizada com auxílio de equipamento CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories). Os blocos contendo DNA foram colocados em orifícios de 10 mm, contidos em placa de gel de agarose a 0,8% ("*Chromosomal grade agarose gel*", Sigma Chemical, St.Louis, USA), preparada segundo orientação do fabricante. A corrida eletroforética ocorreu à 13° C, sob 150 volts, em dois turnos, sendo o primeiro com intervalos de pulsos de 120 segundos por 24 h e o segundo com intervalos de 240 segundos, durante 36 h. O tampão utilizado foi preparado com Tris-Base 90 mM, ácido bórico 50 mM e EDTA 2,5 mM, e o pH final foi corrigido para 8,2. O padrão de peso molecular de DNA cromossômico de leveduras extraído de *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad, USA) foi usado não somente para avaliação do peso molecular das bandas, como também para validar o gel e as condições de eletroforese. Com o equipamento utilizado, foi possível separar, em cada corrida eletroforética, o DNA de 9 amostras de *Candida albicans* e da amostra padrão de *S.cerevisiae*.

Após a eletroforese, o gel foi corado com solução aquosa de brometo de etídio a 0,2 % (Sigma Chemical, USA). A visualização das bandas de DNA cromossomal, foi possível com o auxílio de trans-iluminador de luz ultravioleta. O gel foi fotografado (Polaroid 667, Kodak) sob luz ultravioleta.

A análise dos perfis eletroforéticos de DNA foi realizada a "olho nu", a partir das bandas registradas nas fotografias. Para designar os diferentes perfis eletroforéticos, comumente denominados na literatura como cariótipos (E_k = "*electrophoretic cariotype*"), foram atribuídas, aleatoriamente, uma letra a cada um dos E_k s. O perfil de uma amostra foi considerado diferente de outro, sempre que uma ou mais bandas apresentavam diferenças no peso molecular ou que havia diferenças no número de bandas.

Os E_k s foram classificados também segundo os critérios propostos por MONOD *et alii*, 1990. De acordo com este sistema de cariotipagem, cada E_k é designado com um código de 4 dígitos. O primeiro dígito refere-se ao número de bandas de cromossomos

com peso molecular abaixo de 850 kb, o 2º dígito expressa o número de bandas de 850 kb a 1125 kb, o 3º dígito é o número entre 1125 kb e 1600 kb e o 4º dígito são as bandas com peso de 1600 kb a 2200 kb. Não são levadas em consideração bandas acima de 2000 kb.

3.6. Provas de suscetibilidade a fármacos com atividade antifúngica

Todos os testes de suscetibilidade aos fármacos antifúngicos foram realizados em conjunto, reunindo-se todas as amostras, após um período que variou de 1 a 60 meses após seu isolamento. As culturas foram mantidas em tubos contendo ASC, sob repiques bimensais, à temperatura ambiente.

As provas foram realizadas em caldo, utilizando-se placas de microtitulação (micrométodo) incubadas à 30°C por 24 h (INSTITUTO PASTEUR, 1993). Os resultados foram obtidos por leitura automatizada em espectrofotômetro (BART DELABESSE *et alii*, 1993).

3.6.1. Fármacos e diluentes

Fluconazol (FLUCO) e itraconazol (ITRA), sob a forma de pó, foram cedidos pelos laboratórios fabricantes. Anfotericina B (ANFO) e cetoconazol (CZ) (Sigma Chemical, St. Louis, USA) foram obtidos comercialmente.

A solução-estoque de fluconazol (Pfizer Laboratories Inc., N.Y., USA), contendo 1.000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, foi preparada em água destilada, sob aquecimento. Os fármacos: ITRA (Janssen Pharmaceutica, USA). ANFO e CZ foram diluídos sob aquecimento e ao abrigo da luz, em dimetilsulfóxido (Sigma Chemical, St. Louis, USA) para preparação de soluções-estoque à concentração de 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (INSTITUTO PASTEUR, 1993). Aliquotas de 1 ml das soluções-estoque foram mantidas à -20° C por período não superior a três meses.

A solução de fluconazol foi diluída v/v e as soluções-mãe de ITRA, ANFO e CZ na proporção de 1:10 em água destilada esterilizada (BART-DELABESSE *et alii*, 1993). A partir destas diluições, foram realizadas 10 diluições em série em razão 2, em água destilada esterilizada (Anexo 3). Para ANFO, CZ e ITRA foram preparadas soluções com concentrações variando de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a 0,19 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Para FLUCO as diluições resultaram em concentrações de 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a 0,98 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Em cada um dos 96 orifícios das placas

de microtitulação de fundo chato (Falcon 3072, Becton Dickinsonm, USA), foram colocados 20 µl de cada concentração. As placas foram embaladas em papel plástico aderente (“*Parafilm*”, American Paper Inc., USA), tampadas e congeladas à -20°C até o momento do uso. A preparação e o armazenamento das placas de microtitulação foram realizadas conforme recomendação do INSTITUTO PASTEUR, 1993.

3.6.2. Inóculo

Para preparação do inóculo, 3-5 colônias de *Candida albicans* cultivadas em AS por 24 h a 30° C, com diâmetro maior ou igual a 5 mm, foram suspensas em solução fisiológica (0,85%) esterilizada (ODDS *et alii*, 1995). Após homogeneização em agitador rotativo, a turbidez da suspensão foi acertada na equivalência do tubo 0,5 da escala de MAC FARLAND, utilizando-se espectrofotômetro em comprimento de onda 530 nm, correspondendo à aproximadamente $1 \text{ a } 5 \times 10^6$ células ml^{-1} . Esta suspensão foi diluída a 1:100 em RPMI com l-glutamina (Sigma Chemical, USA). Com estes procedimentos foi obtida suspensão de levedura em concentração final de $1 \text{ a } 5 \cdot 10^4$ células ml^{-1} (PFALLER *et alii*, 1988; ODDS *et alii*, 1995; ANAISSIE *et alii*, 1996).

3.6.3. Execução do teste

O inóculo foi, dentro do prazo de 15 minutos após a preparação, adicionado em volumes de 180 µl a cada orifício das placas de microtitulação (previamente descongeladas) contendo as concentrações variadas dos fármacos. Isto resultou, em diluição a 1:10 da concentração de cada antifúngico e diluição a 11 % do inóculo. As placas, portanto, ficaram com concentrações finais de ANFO, CZ e ITRA variando, respectivamente, entre $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ e as placas de FLUCO com concentrações entre $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $0,09 \mu\text{g ml}^{-1}$. A suspensão de levedura para inóculo nas placas de microtitulação resultou em concentração final de $0,9 \text{ a } 4,5 \cdot 10^4$ colônias ml^{-1} .

Para cada levedura foi incluído controle de crescimento, representado pelo inóculo correspondente, colocado em orifício sem adição de fármaco, situado na última coluna de cada placa. Nos orifícios da primeira coluna de cada placa foram adicionados 180 µl de meio RPMI com l-glutamina, como controle de esterilidade e branco do aparelho de leitura de densidade ótica.

Testes com a cepa-padrão *Candida parapsilosis* ATCC 22019, foram realizados em todas as placas, com vistas a controle interno de qualidade dos procedimentos (REX *et alii*, 1996; PFALLER *et alii*, 1995).

As placas foram, então, tampadas, agitadas por 5 minutos em agitador orbital e incubadas em estufa à 30°C por 24 h (INSTITUTO PASTEUR, 1993). Após este período, foram agitadas por 5 segundos, conforme recomendação de ANAÏSSIE *et alii* 1996, para diminuição de efeito *trailing*, especialmente para fluconazol. O crescimento das leveduras, em cada orifício, foi então determinado por correlação aos valores de absorbância emitidos através de leitor automatizado de placas de microtitulação (Multiskan Titertek Microplate Reader, Flow Laboratories, USA) ajustado a 460 nm.

A concentração inibitória mínima (CIM) de anfotericina B foi definida como menor concentração do fármaco que inibiu totalmente (IC₁₀₀) o crescimento da levedura. Para os antifúngicos azólicos, a CIM referiu-se à menor concentração do fármaco que reduziu 50% (IC₅₀) ou mais do crescimento obtido no orifício controle positivo, ou seja, 50% ou menos do valor da absorbância obtida neste orifício. Foram considerados os resultados de leitura ótica que obedeceram à equação proposta por GALGIANI & STEVENS (1976), conforme segue:

$$\% T \geq \% T_K + 0,5 (100 - \% T_K)$$

onde: *T* é a transmitância e *K* é o orifício do controle positivo de crescimento (sem o antifúngico).

Os valores de CIM das amostras de um mesmo paciente foram comparados entre si. Foram considerados equivalentes quando apresentaram o mesmo valor ou valores de diluições subsequentes.

3.7. Análise estatística

Os resultados foram analisados com testes não paramétricos, através do programa Epi Info versão 6, produzido em 1994 pela Divisão de Vigilância e Epidemiologia do Centers of Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, USA.

4-RESULTADOS

As amostras dos 25 pacientes, estratificadas por coleta, biótipo e cariótipo de *Candida albicans* e padrão de suscetibilidade aos quatro fármacos avaliados, estão descritas na Tabela 1.

4.1. Provas fenotípicas

4.1.1. Morfotipagem

Foram identificados 14 morfotipos distintos entre as 75 amostras de *Candida albicans*. O tipo denominado 0000 foi o mais comum, abrangendo 45 (60,0 %) das amostras. Outros morfotipos tiveram frequência menor, a saber: 5310 e 5340 (6,6 % cada um), 5540 e 7240 (4,1% cada grupo), 3330, 3340, 5330 e 7340 (2,6 % cada). Os morfotipos 1310, 2240, 3240 e 5531 foram encontrados apenas em uma (1,4 %) amostra (Tabela 2).

4.1.2. Biotipagem de ODDS & ABBOTT (1980)

Os resultados dos 9 testes aplicados na biotipagem das 75 amostras de *Candida albicans* estão apresentados na Tabela 3. Estes testes permitiram a identificação de 13 biótipos diferentes: 157, 173, 177, 343, 353, 357, 371, 373, 377, 577, 723, 737 e 777 nos 25 pacientes. A sua distribuição pode ser verificada nas Tabelas 1 e 4 e Figura 1. De 17 (68,0%) pacientes foi isolado, a partir de 3 amostras seriadas, sempre o mesmo biótipo ou subtipo e de 8 (32,0 %) foi encontrado mais de um subtipo. Dois (25,0%) desses casos (p10, p19) apresentaram biótipo diferente após terapia e em outros 2 (25,0%) pacientes, após cura clínica (p9, p12). Três (37,5%) dos 8 casos apresentaram diferentes subtipos nas 3 amostras (p1, p5, p7,) e 1 (12,5%) apresentou o mesmo subtipo na 1ª e 3ª amostra, alternando com subtipo diferente na 2ª amostra (p13).

O poder discriminatório da prova fenotípica neste trabalho, segundo índice de Simpson (HUNTER & GASTON, 1988), foi de 0,879.

4.2. Cariotipagem

A análise dos perfis eletroforéticos (Ek, de *electrophoretic kariotype*) obtidos por PFGE das 75 amostras de *Candida albicans*, revelou 11 subtipos moleculares, separados segundo número de bandas e peso molecular. Cada Ek recebeu, aleatoriamente, uma letra de A a L. A distribuição dos cariótipos, segundo amostra e paciente, encontra-se na Tabela 1. A Figura 2 ilustra os 11 padrões eletroforéticos dos subtipos de DNA identificados neste trabalho. O poder discriminatório para a prova genotípica foi 0,874 (HUNTER & GASTON, 1988; HUNTER & FRASER 1989).

A frequência relativa dos cariótipos A a L pode ser observada na Tabela 5 e Figura 3. Os cariótipos G e L foram os mais frequentes, agrupando, respectivamente 24,0 % e 16,0 % das 75 cepas. Os cariótipos B e I foram identificados apenas em uma amostra cada um.

Dezenove (76,0 %) dos 25 pacientes apresentaram cepas com um único Ek durante todo o curso da infecção, i.e., antes, após terapia e após remissão clínica da lesão. A partir de seis (24,0 %) pacientes foi isolado mais de um subtipo de DNA; de 1 (4,0%) o subtipo mudou após terapia (p11); em 4 (16,0 %) o subtipo original mudou após cura clínica (p6, p12, p14, p25) e 1 (4,0 %) paciente (p2) apresentou o mesmo subtipo na 1ª e 3ª amostras e um subtipo diferente na 2ª amostra. Os resultados do teste exato de Fisher demonstraram não haver associação ($p < 0,05$) entre manutenção, em um mesmo paciente, de cariótipos e biótipos. Do mesmo modo, não houve associação entre tempo de doença e manutenção de subtipos.

Os 11 tipos de Eks, quando classificados segundo esquema de MONOD *et alii* 1990, foram agrupados em 6 cariótipos diferentes (Tabela 6). Os códigos, resultantes do número de bandas em cada faixa do gel foram: 0114, 0124, 0214, 0224, 314 e 1214. Todos os cariótipos apresentaram bandas nas faixas de gel compreendida entre 825 kb e 2200 kb. Oito amostras apresentaram também uma banda com peso molecular de 680 kb, compreendendo 10,7% do total (classificadas dentro do código 1214).

4.3. Provas de suscetibilidade a fármacos com ação antifúngica

Os resultados de CIM das 75 amostras (Tabela 1) foram validados pela leitura dos controles positivo e negativo de crescimento em cada placa e também com base na leitura

dos valores de CIM para a amostra-padrão *Candida parapsilosis* ATCC 20019 que se situaram de modo reprodutível, neste trabalho, em: 0,31 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para anfotericina B, 0,78 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para fluconazol, 0,04 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para cetoconazol e 0,04 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para itraconazol.

Os valores de CIM para anfotericina B nas 75 amostras analisadas variou de 0,31 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Para fluconazol os valores oscilaram entre $\leq 0,09 \mu\text{g ml}^{-1}$ e 12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Os valores de CIM para cetoconazol variaram de $\leq 0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ a 0,62 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e para itraconazol as amostras apresentaram CIM entre $\leq 0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ e 1,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Tabela 1 e Figura 4).

Entre as 3 amostras seriadas de 23 (92,0 %) pacientes não foi verificada variação significativa (mais de duas diluições) nos valores de CIM em relação aos 4 fármacos analisados (Tabela 1).

Para as cepas oriundas de 2 pacientes (8,0 %) observou-se alteração significativa nos valores de CIM. E nas amostras do paciente p10, a mudança foi em relação ao fluconazol variando de 0,39 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a 3,12 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Tabela 7 e Figura 5). Entre as do paciente p20, verificou-se alteração de CIM para os 3 fármacos azólicos, especialmente após cura clínica, sendo de 0,39 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a 12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para fluconazol, de $\leq 0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ a 0,62 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para cetoconazol e de 0,08 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a 1,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para itraconazol (Tabela 7 e Figura 7).

As cepas com os valores máximos de CIM para anfotericina B (2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) foram isoladas do paciente p16 (Tabela 7 e Figura 6) e para fluconazol (12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) do paciente p22 (Tabela 7 e Figura 8).

A distribuição das 75 amostras, quanto ao seu perfil de suscetibilidade ao fluconazol, foi analisada frente aos outros três antifúngicos estudados (Figura 9).

Mediante as fichas clínico-epidemiológico-laboratoriais dos 25 pacientes (Anexo 1) foi verificado que em 16 (64%) casos a terapia antifúngica foi realizada com cetoconazol. Dois (12,5%) desses pacientes apresentaram aparente resistência clínica (persistência das lesões) e para seu tratamento foi introduzido fluconazol em substituição ao cetoconazol. Seis (24,0%) pacientes receberam nistatina como único fármaco (p13, p14, p15, p17, p18, p24). Três (12%) casos (p10, p11, p16) foram submetidos a terapia com itraconazol, sendo que 1 (33,4%) não respondeu ao tratamento e, por isso, recebeu fluconazol após a 2ª coleta de material (p10) (Tabela 1).

Os resultados da análise estatística, através do teste exato de Fisher, rejeitaram a hipótese de associação de cariótipos à resistência aos fármacos ($p < 0,05$), com exceção dos cariótipos A e J, respectivamente $p = 0,0353$ e $p = 0,0233$, em relação ao fluconazol.

O cálculo do coeficiente Kappa não revelou ($p > 0,05$) concordância entre a suscetibilidade das 75 amostras aos fármacos empregados.

TABELA 1- Biótipos, cariótipos e padrões de suscetibilidade a antifúngicos de 75 amostras de *Candida albicans* de 25 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS

Nº	Nº paciente	Nº coleta	Intervalo entre as coletas (dias)	Biótipo		Ek	Terapia vigente	CIM ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			
				ODDS& ABBOTT	Morfotipo			ANFO	FLUCO	CZ	ITRA
1	p1	1ª		173	0000	G		0,62	0,39	$\leq 0,02$	0,08
2		2ª	6	371	0000	G	CZ	0,62	0,78	$\leq 0,02$	0,08
3		3ª	76	377	0000	G	CZ	0,62	0,78	$\leq 0,02$	0,08
4	p2	1ª		157	0000	F		0,62	0,39	0,04	0,04
5		2ª	21	157	0000	B	CZ	0,62	0,39	0,04	0,04
6		3ª	39	157	0000	F	CZ	0,62	0,78	0,04	0,04
7	p3	1ª		577	0000	F		0,62	3,12	0,04	0,08
8		2ª	43	577	0000	F	CZ	0,62	1,56	0,04	0,04
9		3ª	91	577	0000	F	CZ	0,62	1,56	0,04	0,04
10	p4	1ª		377	0000	F		0,62	0,39	$\leq 0,02$	0,08
11		2ª	25	377	0000	F	CZ	0,62	0,39	$\leq 0,02$	0,08
12		3ª	24	377	0000	F	CZ	0,62	0,78	$\leq 0,02$	0,04
13	p5	1ª		357	7240	E		1,25	0,39	0,04	0,04
14		2ª	11	377	0000	E	CZ	0,62	0,78	0,04	0,04
15		3ª	43	343	0000	E	FLUCO	1,25	0,39	$\leq 0,02$	0,08
16	p6	1ª		377	0000	A		1,25	0,39	$\leq 0,02$	$\leq 0,02$
17		2ª	40	377	0000	A	CZ	1,25	0,39	$\leq 0,02$	0,04
18		3ª	65	377	0000	I	CZ	0,62	0,78	$\leq 0,02$	0,04
19	p7	1ª		377	0000	A		0,62	1,56	$\leq 0,02$	0,08
20		2ª	48	177	0000	A	CZ	0,31	1,56	$\leq 0,02$	0,08
21		3ª	91	357	0000	A	CZ	0,62	0,78	$\leq 0,02$	0,08
22	p8	1ª		577	0000	G		1,25	0,78	$\leq 0,02$	0,16
23		2ª	7	577	0000	G	CZ	1,25	0,78	$\leq 0,02$	0,16
24		3ª	7	577	0000	G	CZ	0,62	0,78	$\leq 0,02$	0,31

(continuação da Tabela 1)

25	p9	1 ^a		377	0000	H		0,62	0,39	≤0,02	0,04
26		2 ^a	14	377	0000	H	CZ	0,62	0,39	≤0,02	0,08
27		3 ^a	14	357	0000	H	CZ	0,62	0,78	≤0,02	0,08
28	p10	1 ^a		343	0000	E		0,31	0,39	≤0,02	0,04
29		2 ^a	21	357	0000	E	ITRA	0,62	1,56	≤0,02	≤0,02
30		3 ^a	14	357	0000	E	FLUCO	0,62	3,12	≤0,02	≤0,02
31	p11	1 ^a		577	0000	G		0,62	0,19	≤0,02	≤0,02
32		2 ^a	14	577	0000	D	ITRA	0,62	0,19	≤0,02	0,04
33		3 ^a	10	577	0000	D	ITRA	0,62	≤0,09	≤0,02	≤0,02
34	p12	1 ^a		177	0000	C		0,31	0,39	≤0,02	0,16
35		2 ^a	8	177	0000	C	CZ	0,31	0,39	≤0,02	0,08
36		3 ^a	10	377	0000	E	CZ	0,31	0,78	≤0,02	0,16
37	p13	1 ^a		377	0000	L		0,31	0,39	≤0,02	0,08
38		2 ^a	28	373	0000	L	NIST	0,31	0,39	≤0,02	0,08
39		3 ^a	25	377	0000	L	NIST	0,62	0,19	≤0,02	0,04
40	p14	1 ^a		357	0000	J		0,31	3,12	≤0,02	0,16
41		2 ^a	8	357	0000	J	NIST	0,31	3,12	≤0,02	0,16
42		3 ^a	18	357	7340	E	NIST	0,31	1,56	≤0,02	0,16
43	p15	1 ^a		777	5310	G		0,16	≤0,09	≤0,02	0,04
44		2 ^a	9	777	5310	G	NIST	0,31	≤0,09	≤0,02	0,04
45		3 ^a	69	777	5310	G	NIST	0,31	≤0,09	≤0,02	0,04
46	p16	1 ^a		357	3340	J		2,5	0,39	0,04	0,04
47		2 ^a	40	357	0000	J	ITRA	2,5	0,19	0,04	0,08
48		3 ^a	7	357	5531	J	ITRA	2,5	0,19	0,04	0,08
49	p17	1 ^a		353	2240	L		0,31	0,19	≤0,02	0,16
50		2 ^a	12	353	3330	L	NIST	0,31	≤0,09	≤0,02	0,16
51		3 ^a	14	353	5340	L	NIST	0,31	0,19	≤0,02	0,16

(continuação da Tabela 1)

52	p18	1 ^a		353	5540	D		0,62	≤0,09	0,04	0,08
53		2 ^a	29	353	3240	D	NIST	0,31	≤0,09	0,04	0,04
54		3 ^a	31	353	7240	D	NIST	0,62	0,39	0,04	0,04
55	p19	1 ^a		373	5240	J		0,31	1,56	≤0,02	0,04
56		2 ^a	14	723	5240	J	CZ	0,31	0,78	≤0,02	0,04
57		3 ^a	17	723	3330	J	CZ	0,31	0,78	≤0,02	0,08
58	p20	1 ^a		777	1310	L		0,31	0,39	≤0,02	0,08
59		2 ^a	14	777	5310	L	CZ	0,31	0,78	≤0,02	0,08
60		3 ^a	13	777	5310	L	CZ	0,31	12,5	0,62	1,25
61	p21	1 ^a		353	7340	L		0,08	≤0,09	≤0,02	≤0,02
62		2 ^a	21	353	7340	L	CZ	0,08	≤0,09	≤0,02	≤0,02
63		3 ^a	14	353	5340	L	CZ	0,08	0,19	≤0,02	0,04
64	p22	1 ^a		737	5340	A		0,62	12,5	0,04	0,08
65		2 ^a	21	737	0000	A	CZ	0,62	6,25	0,04	0,08
66		3 ^a	7	737	5330	A	FLUCO	0,62	6,25	0,04	0,08
67	p23	1 ^a		777	0000	D		0,16	1,56	≤0,02	0,16
68		2 ^a	13	777	0000	D	CZ	0,31	0,78	≤0,02	0,16
69		3 ^a	14	777	3340	D	CZ	0,16	0,78	≤0,02	0,08
70	p24	1 ^a		577	0000	G		0,31	0,78	0,04	0,16
71		2 ^a	15	577	5240	G	NIST	0,31	0,39	0,04	0,08
72		3 ^a	14	577	5240	G	NIST	0,31	0,39	0,04	0,16
73	p25	1 ^a		577	5340	F		0,62	1,56	0,04	0,08
74		2 ^a	9	577	5340	E	CZ	0,62	1,56	0,04	0,04
75		3 ^a	5	577	5330	E	CZ	0,62	0,78	0,04	0,04

Ek=cariótipo eletroforético obtido por PFGE; CIM=concentração inibitória mínima;
 ANFO=anfotericina B; CZ=cetoconazol; FLUCO=fluconazol; ITRA=itraconazol;
 NIST=nistatina

TABELA 2. Distribuição de 14 morfotipos de 75 amostras de *Candida albicans* isoladas de 25 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS

Morfotipo	Nº	%
0000	45	60,0
1310	1	1,4
2240	1	1,4
3240	1	1,4
3330	2	2,6
3340	2	2,6
5310	5	6,6
5240	2	2,6
5340	5	6,6
5330	2	2,6
5531	1	1,4
5540	3	4,1
7240	3	4,1
7340	2	2,6
Total	75	100,0

TABELA 3. Resultados dos 9 testes de biotipagem segundo ODDS & ABBOTT (1980) de 75 amostras de *Candida albicans* de 25 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS

TESTE	Nº	%
crescimento em pH 1,4	75	100,0
produção de proteinase	53	70,7
crescimento frente a 5-fluorocitosina	29	38,7
assimilação de uréia	39	40,0
assimilação de sorbose	50	66,7
crescimento frente a cloreto	70	93,3
assimilação de citrato	75	100,0
assimilação de glicina	74	98,7
crescimento em safranina	58	77,3

TABELA 4. Distribuição de 13 biótipos (ODDS & ABBOTT, 1980) de *Candida albicans* de 75 amostras de 25 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS

BIÓTIPO	Nº	%
157	3	4,0
173	1	1,3
177	3	4,0
343	2	2,7
353	9	12,0
357	11	14,7
371	1	1,3
373	2	2,7
377	14	18,7
577	15	20,0
723	2	2,7
737	3	4,0
777	9	12,0
TOTAL	75	100,0

FIGURA 1. Distribuição de 13 biótipos (ODDS & ABBOTT, 1980) de *Candida albicans* identificados entre 75 amostras de 25 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS

FIGURA 2 - Ilustração dos 11 cariótipos eletroforéticos (letras A a L) encontrados em 75 amostras de *Candida albicans* de 25 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS. Sc: marcador de peso molecular em kilobases (kb)

TABELA 5. Distribuição de 11 cariótipos eletroforéticos (Ek) identificados entre 75 amostras de *Candida albicans* de 25 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS

Ek	Nº	%
A	8	10,7
B	1	1,3
C	2	2,7
D	8	10,7
E	7	9,3
F	8	10,7
G	18	24,0
H	3	4,0
I	1	1,33
J	7	9,33
L	12	16,0
TOTAL	75	100,0

FIGURA 3. Distribuição de 11 cariótipos eletroforéticos (Ek) de *Candida albicans* de 75 amostras de 25 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS

TABELA 6. Distribuição de cariótipos eletroforéticos (Ek) de 75 amostras de *Candida albicans* de 25 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS, segundo esquema proposto por MONOD *et alii*, 1990

Código do Ek	Amostras	Total	
		Nº	%
0114	16,17,19,20,21,64,65,66	8	10,7
0124	25,26,27	3	4,0
0214	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,22, 23,24,28,29,30,31,34,35,36,42,43,44,45, 48,70,71,72,73,74,75,70,71,72,73	36	47,9
0224	18,40,41,46,47,55,56,57,	8	10,7
0314	37,38,39,49,50,51,58,59,60,61,62,63	12	16,0
1214	32,33,52,53,54,67,68,69	8	10,7
TOTAL		75	100,0

número de amostras

número de amostras

FIGURA 4. Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos em estudo para 75 amostras de *Candida albicans* isoladas de 25 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS

TABELA 7. Concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos estudados para 12 amostras de *Candida albicans* isoladas de 4 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS

PACIENTE	AMOSTRA	INTERVALO (em dias)	TERAPIA (dose diária)	CIM ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			
				ANFO	FLUCO	CZ	ITRA
<u>p10</u>	1 ^a			0,39	0,39	$\leq 0,02$	0,04
	2 ^a	21	ITRA (100 mg)	0,62	1,56	$\leq 0,02$	$\leq 0,02$
	3 ^a	14	FLUCO (400 mg)	0,62	3,12	$\leq 0,02$	$\leq 0,02$
<u>p16</u>	1 ^a			2,5	0,39	0,04	0,04
	2 ^a	40	ITRA (200 mg)	2,5	0,19	0,04	0,08
	3 ^a	7	ITRA (200 mg)	2,5	0,19	0,04	0,08
<u>p20</u>	1 ^a			0,31	0,39	$\leq 0,02$	0,08
	2 ^a	14	CZ (200 mg)	0,31	0,78	$\leq 0,02$	0,08
	3 ^a	13	CZ (200 mg)	0,31	12,5	0,62	1,25
<u>p22</u>	1 ^a			0,62	12,5	0,04	0,08
	2 ^a	21	CZ (200 mg)	0,62	6,25	0,04	0,08
	3 ^a	7	FLUCO (100 mg)	0,62	6,25	0,04	0,08

FIGURA 5. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos estudados para *Candida albicans* isoladas de 3 amostras do paciente p10

FIGURA 6. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos estudados para *Candida albicans* isoladas em 3 amostras do paciente p16

FIGURA 7. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos estudados para *Candida albicans* isoladas de 3 amostras do paciente p20

FIGURA 8. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos estudados para *Candida albicans* isoladas de 3 amostras do paciente p22

FIGURA 9 - Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos estudados para 75 amostras de *Candida albicans* isoladas de 25 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS

5. DISCUSSÃO

Os pesquisadores em micologia médica, assim como os microbiologistas em geral, têm sido frequentemente, questionados acerca da similaridade entre amostras de leveduras isoladas, supostamente de uma mesma fonte de infecção, seja em surtos de infecções hospitalares, seja em episódios recorrentes de micoses. As técnicas de tipagem estão, a cada dia, mais precisas e sensíveis, representando, hoje, ferramentas importantes no esclarecimento desta questão. Isto se justifica pelo alto poder discriminatório dessas técnicas que leva em conta o número e frequência relativa dos subtipos encontrados. As técnicas tradicionais de tipagem, especificamente as fenotípicas, foram sendo complementadas ou substituídas nas últimas décadas, por novos métodos moleculares para análise do padrão de DNA de leveduras.

Neste trabalho, as provas fenotípica de ODDS & ABOTT e genotípica apresentaram poder discriminatório semelhante, segundo índice de SIMPSON (HUNTER & GASTON, 1988). O valor encontrado na prova de biotipagem ($D=0,879$) é superior ao encontrado pelos autores do método, em seu trabalho original ($D=0,657$). Apesar de ambos os valores encontrarem-se abaixo do índice de 0,9, que é preconizado como o mínimo desejável de poder discriminatório para um teste, o método tem sido amplamente utilizado em pesquisas e tem trazido muitas contribuições à epidemiologia das infecções por *Candida albicans* (HUNTER, 1991a). KORTING *et alii* (1988) recomendaram o método de ODDS & ABBOTT para fenotipagem de amostras seriadas de pacientes com candidíase bucal associada à AIDS, atribuindo a ele bom poder discriminatório.

Em relação ao poder discriminatório da cariotipagem, não existem dados, na literatura consultada, para uma avaliação comparativa do valor encontrado.

A prova de morfotipagem permitiu a separação das amostras em 14 subtipos diversos. Houve predomínio (60,0 %) de colônias com superfície lisa e contorno bem delimitado, sem franjas, características que representam o morfotipo 0000. Este morfotipo também foi o mais frequente (26,0%) nas 146 amostras de *Candida albicans*, isoladas de diferentes materiais biológicos, no estudo de CANDIDO (1991). Por outro lado, OLIVER & READE (1993), estudando candidíase bucal de 80 pacientes portadores do HIV,

associaram culturas de *Candida albicans*, com superfície pregueada e franjas contínuas, à ocorrência de AIDS nesse grupo. Como este subtipo apresentou frequência, significativamente, maior, entre pacientes com AIDS e ARC, os autores especularam que alterações na morfotipagem das amostras poderiam prever progressão da doença, desde que, certos morfotipos apresentariam maior virulência do que outros. O fenômeno ocorreria em decorrência de células, presentes na superfície das colônias, responsáveis por adesão de *Candida albicans* à células epiteliais do hospedeiro que também teriam poder de afetar as características morfotípicas da cultura (OLIVER & READE, 1993).

A morfotipagem apresenta a grande vantagem do baixo custo e simplicidade de execução. Apresentou na presente pesquisa, um poder discriminatório de 0,632, valor menor que os das provas de biotipagem de ODDS & ABBOTT e cariotipagem. O valor encontrado na morfotipagem foi menor que 0,917 observado por CANDIDO (1991) e similar à 0,615 encontrado por HUNTER & FRASER (1989). Apesar da possibilidade de separar as 75 amostras em 14 subgrupo, a maioria delas (60,0%) foi classificada dentro do mesmo subgrupo (morfotipo 0000) resultando, assim, na diminuição do poder discriminatório do teste. Além dessa desvantagem, observou-se que a análise morfológica tende a ser subjetiva, necessitando de um profissional bem treinado para sua interpretação. A dificuldade, causada pela ausência de amostras-padrão, foi minimizada, neste estudo, pela análise simultânea do grande número de amostras (75 em duplicata, somando 150 no total) e observação de fotos do trabalho de PHONGPAICHIT *et alii* (1987). Esse volume de amostras permitiu o encontro de 14 morfotipos diversos, facilitando a determinação das variações culturais previstas no método.

Na prova fenotípica, as 75 amostras de *Candida albicans* mostraram comportamento homogêneo frente a quase todos os testes de assimilação e resistência (Tabela 3). A assimilação de uréia e crescimento frente à 5-fluorocitosina foram os testes com menor percentagem de positividade para as amostras e, portanto, os que permitiram maior diferenciação de biótipos (Tabela 3). Este dado concorda com os de MAFFEI, 1996, que enfatizou a validade do teste de 5-fluorocitosina na separação de biótipos de *Candida albicans* isoladas de diversos materiais biológicos. A percentagem de amostras resistentes à 5-fluorocitosina (38,7 %) encontrada no presente trabalho foi similar às verificadas por ODDS *et alii*, 1983 (40,0 %) e STEVENS *et alii*, 1990 (33,0). A

capacidade de produção de proteinase por 70,7% das 75 amostras analisadas podem indicar que esse grupo de leveduras, têm potencial de virulência maior, visto que essa enzima, está relacionada à invasão de tecidos (REMOLD *et alii*, 1968) e letalidade em animais de experimentação (MACDONALD & ODDS, 1983), embora possa depender de outros fatores (SHIMIZU, 1989).

Entre os 13 biótipos identificados no presente trabalho, houve predominância dos tipos 577 (20,0 %) e 377 (18,7 %). Para 17 (68,0%) dos 25 pacientes, o mesmo biótipo permaneceu nas 3 amostras analisadas, demonstrando que na maior parte dos casos o agente etiológico não foi eliminado do local, mesmo após terapia com antifúngicos e a despeito da remissão da lesão. Para apenas 8 (32,0 %) dos 25 pacientes houve introdução de biótipo diferente do original, sendo que em 3 (12,0 %) os biótipos foram diferentes em cada uma das amostras (Tabela 1). KORTING *et alii* (1988) analisando amostras seriadas de 22 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS verificou maior variação fenotípica (27,3 %) ao longo do curso da infecção. Os autores fazem porém a ressalva que o método por eles utilizado (assimilação por “kit” API 20 C) não apresentou bom poder discriminatório.

Candida albicans pode mostrar variação fenotípica conforme progride a infecção no paciente HIV positivo (McCULLOUGH & HUME, 1995). É controverso em que medida estas diferentes expressões fenotípicas são explicadas por aspectos genéticos distintos (ANDERSON *et alii*, 1992). Conforme as características analisadas pode haver (BOERLIN *et alii*, 1995) ou não associação entre fenóticos e genótipos (STEVENS *et alii*, 1990; DOI *et alii*, 1994). Segundo STEVENS *et alii* (1990) resultados incorretos de correlação entre provas fenotípica e genotípica podem ser devidos ao número insuficiente de amostras analisadas.

Para a análise genotípica, realizada neste trabalho, foi utilizada a técnica de PFGE que permite a separação de fragmentos de DNA cromossômico com mais de 40 kb, o que não é conseguido de modo eficiente por eletroforese convencional. Estes fragmentos de DNA são muitos grandes para serem conduzidos através dos poros existentes na matriz do gel, mesmo os maiores; desse modo, apresentam a mesma taxa de migração sob a força de um campo elétrico. Entretanto, estes fragmentos podem ser separados quando se altera, de

modo cíclico (pulso), a orientação do campo elétrico, durante a eletroforese (SCHWARTS & CANTOR, 1984).

Várias técnicas de PFGE são usadas em microbiologia, incluindo campo invertido, campo ortogonal, campo transversal alternado e campo homogêneo conectado (*clamped*). Esta última modalidade, utilizada na presente pesquisa, baseia-se em arranjo hexagonal de eletrodos de modo a gerar campos elétricos uniformes a 120° em relação uns aos outros, induzindo os fragmentos de DNA a se moverem sem distorção, em linha reta. Esta técnica permite a separação de fragmentos com 200 Mpb a 12 Mpb, resultando em bandas bem definidas e linhas retas (SMITH *et alii*, 1987).

Muitas condições podem alterar os resultados de quaisquer destas modalidades de PFGE, incluindo concentração da agarose utilizada no gel, concentração da solução tampão da corrida, temperatura, tempo de pulso, voltagem e tempo total de corrida. A primeira geração de equipamentos para PFGE requeria experimentação extensa para determinação das condições ideais de modo a permitir bons resultados. Os equipamentos de segunda geração, como o utilizado no presente trabalho (CHEF DR-II, Bio-Rad Laboratories, USA) oferecem melhores condições de trabalho e são auto-programáveis para corridas longas. A leitura das bandas, realizada a “olho nu”, conforme executada no presente trabalho, é adequada; entretanto, a digitalização de bandas, seguida de análise estatística computadorizada não é recomendada para o número de cepas utilizado neste trabalho, sendo, porém, indicada para grandes coleções de cepas estudadas em centros de referências (ARBEIT, 1996).

A técnica de PFGE, ofereceu boa separação das bandas de DNA com peso molecular abaixo de 2200 kb. O problema encontrado foi em relação ao período da corrida eletroforética, demasiadamente longo, mas necessário para a separação adequada das bandas. O número de amostras (n=75) englobadas neste estudo, requereu muitos meses para a resolução de todas as corridas. Para cada corrida, onde foram processadas 9 amostras e a cepa-padrão de *S.cerevisiae*, foram necessários 3 dias seguidos. A cada interrupção de energia, o aparelho desligava-se automaticamente e, como não se dispunha de sistema de religação imediata (*non-brake*), a corrida era, em regra, inutilizada. Para a repetição, era utilizado novo material de consumo e novos blocos contendo os DNAs das cepas. Prevendo esta necessidade, a cada extração de DNA foram preparados de 2 a 5

moldes com DNA de cada cepa. A estabilidade do DNA, permitiu resultados de cariotipagem idênticos, após corridas com intervalo de 1 mês, com blocos extraídos na mesma data.

A relação entre subtipos moleculares de amostras de *Candida albicans* e suas propriedades, seja de virulência ou outras, ainda não está firmemente definida, mesmo com a utilização de métodos com alta precisão para análise molecular. Isto ocorre, em parte, devido à falta de consenso entre os pesquisadores quanto à conceituação de diferentes subtipos e a baixa reprodutibilidade encontrada ainda em alguns métodos. No caso de PFGE, não existe ainda a padronização para caracterização dos subtipos moleculares, de modo que, o seu estudo baseia-se no número de bandas de DNA, cujos pesos moleculares são calculados frente a padrões. Desse modo, ocorre uma certa dificuldade na comparação de resultados obtidos em diferentes investigações.

Entre as 75 amostras de *Candida albicans* estudadas, foram descritos 11 subtipos moleculares diferentes (EK A a Ek L), conforme disposto na Tabela 5 e Figura 3. Foram identificadas cepas sem relação epidemiológica (pacientes diferentes) mas relacionadas geneticamente, isto é, com mesmo Ek, demonstradas na Tabela 1.

ESPINEL-INGROFF *et alii* (1996b) descreveram 8 subtipos em 127 amostras isoladas. MILLON *et alii* (1994) identificaram 7 subtipos em mais de 120 amostras e PFALLER *et alii* (1994), encontraram maior diversidade, chegando a 61 subtipos em 121 amostras, através da técnica de PFGE. Os achados do grupo de PFALLER foram surpreendentes, quanto às variedades de Eks encontrados entre as 121 cepas agentes de candidíase associada à AIDS. LUPETTI *et alii* (1995) encontraram 7 classes distintas de cariótipos em 66 amostras de *Candida albicans* associadas (n=40) ou não (n=26) à infecção pelo HIV. Os cariótipos foram separados, tanto pelo número quanto pela distribuição das bandas de DNA no gel.

No presente trabalho, os resultados dos estudos de tipagem genética, demonstraram que a maioria das cepas relacionadas epidemiologicamente, i.e., isoladas do mesmo paciente, eram também relacionadas geneticamente, e portanto, representavam a mesma cepa (Tabela 1).

Quando foram comparadas as 3 amostras seriadas por paciente, encontrou-se 57 cepas de 19 pacientes com cariótipos idênticos em todas as coletas. Oito (42,1 %) destes

pacientes portavam cepas com cariótipo Ek *G* ou Ek *L*, os mais frequentes neste trabalho. Os pacientes com candidíase bucal associada à AIDS ou outras imunodeficiências, tendem a albergar um único subtipo de *Candida albicans* por longos períodos. Em estudo de PITTET *et alii* (1991), com 29 pacientes imunodeficientes, houve a persistência de cepas de *Candida albicans* com mesmo Ek por mais de 6 meses. MILLON *et alii* em 1994 verificaram o mesmo fato em 30 pacientes com AIDS, durante um longo período, que ultrapassou 360 dias. BARCHIESI *et alii* (1995a) encontraram 54,5% de 22 pacientes com candidíase bucal associada à AIDS, infectados sempre com a mesma cepa de *Candida albicans*, mapeada pelo mesmo subtipo de DNA.

Através de hibridização *Southern* com sonda específica para *Candida albicans* e técnica de RFLP, SCHMID *et alii* (1992), concluíram que os pacientes com AIDS tendem a albergar menor diversidade de cepas que pacientes sem a síndrome. Além disso, os autores afirmam que os diversos episódios de candidíase bucal em um mesmo indivíduo são causados por cepas com subtipos de DNA idênticos.

Neste trabalho a manutenção de cepa com mesmo Ek em um paciente, também ocorreu no maior intervalo de isolamento das amostras, igual a 134 dias. De acordo com PUJOL *et alii*, 1993 as cepas de subtipos idênticos e isoladas de um mesmo paciente, são, presumivelmente, geneticamente relacionadas e possuem origem clonal. Esta consideração é apenas relativa, pois a técnica de PFGE não consegue detectar todas as diferenças genéticas. A evidência de clonalidade só pode ser dada pelo seqüenciamento do DNA, fora dos objetivos deste trabalho. Portanto, para os 19 pacientes desta pesquisa a cepa de *Candida albicans* que causou a infecção primária não foi erradicada ou os mesmos se contaminaram, sucessivamente, com a mesma cepa, durante o período compreendido neste estudo.

Contudo, foi também observado que 3 pacientes, apesar de apresentarem amostras com o mesmo subtipo de DNA na 1ª e 2ª amostras, portaram um cariótipo diferente na 3ª amostra (p6, p12 e p14); outros 2 casos portaram amostras com cariótipos idênticos apenas na 2ª e 3ª amostras (p11 e p25). Verificou-se, ainda, a alternância de 2 cariótipos nas três amostras de 1 paciente (p2). Nenhum paciente portou três cariótipos diferentes, havendo reincidência de subtipos de DNA, em no máximo 2 amostras. O trabalho de PFALLER *et alii* (1994), se contrapõe a estes achados, visto que esses autores observaram

a alternância de subtipos de DNA, em episódios de candidíase bucal, ocorrida na maioria (62%) dos pacientes com AIDS. Além disso, encontraram um paciente infectado com cepa com 6 Eks diferentes em 6 episódios seguidos de candidíase bucal. ESPINEL-INGROFF *et alii* (1996b) identificaram 2 (2,22 %) pacientes que albergaram até 3 subtipos moleculares diferentes em intervalo de 48 dias, dentre os 9 pacientes estudados.

Considerando-se os relatos dos diversos autores, a diferença entre as percentagens de pacientes que mantêm ou não a mesma cepa, durante os episódios de infecção, é agravada por diversos fatores relacionados à natureza dos trabalhos, como: diferenças entre as populações de pacientes estudados, frequência da coleta de amostras biológicas, duração do seguimento clínico-laboratorial do grupo, intensidade de exposição do grupo aos agentes antifúngicos e tipo de técnica aplicada para subtipagem do DNA.

A alternância no subtipo de DNA, ocorre muito provavelmente, devido a alternância da cepa infectante. Acredita-se na alta estabilidade do DNA de *Candida albicans*, de acordo com a literatura revisada. SCHERER & STEVENS (1987) verificaram que esta estabilidade ocorre, sob diversas condições de manutenção em laboratório, mesmo após múltiplas gerações (mais de 400 gerações). Em 1990, STEVENS *et alii*, demonstraram a manutenção do DNA durante a multiplicação de *Candida albicans* “*in vivo*”. Esta estabilidade permite a validação da aplicação de tipagem de DNA a questões epidemiológicas, em que a multiplicação de uma cepa em um hospedeiro e depois em outro, não deve induzir, a curto prazo, variação no padrão cromossômico. Não existem, porém, indicadores suficientes, na literatura consultada, para sugerir que elas coexistam no momento da coleta e cada uma delas é isolada em época diferente, ou que as cepas tendam a se suceder dentro do curso infeccioso, por aquisição, a partir de fonte exógena. Talvez, futuros estudos incluindo análise de múltiplas colônias de amostras obtidas antes e após terapia, possam elucidar esta questão, de grande significado clínico.

A transposição da interpretação de bandas de DNA cromossômico, geradas em técnica de PFGE, como ferramenta epidemiológica, deve levar em conta o critério de interpretação dos Eks e até que ponto as mutações genéticas, ao acaso, podem alterar os resultados em PFGE. A leitura dos perfis ainda é um processo subjetivo e não pode ser reduzido a rígidos algoritmos. Por outro lado, as alterações genéticas comuns, incluem inserção e deleção de fragmentos de DNA. Na teoria, estas transformações teriam maior

influência nos resultados de PFGE, se utilizada(s) enzima(s) de restrição. Desse modo, supondo que os fragmentos, insertados ou deletados, contenham o(s) ponto(s) de atuação da(s) enzima(s), os pontos de clivagens no DNA seriam, conseqüentemente, alterados. Na técnica de PFGE empregada no presente trabalho, não se utilizou enzimas de restrição, portanto, mutações dessa natureza não influenciaram, provavelmente, os resultados. Segundo a literatura consultada, o efeito dos eventos de mutação genética nos resultados de PFGE, ainda são pouco estudados. A deleção de um fragmento de DNA, provavelmente resulta em perda de um fragmento grande, ocasionando o aparecimento de um novo fragmento de baixo peso molecular. Isto mostraria, portanto, um perfil de DNA diferente da cepa original, com duas bandas adicionais. Contudo, não há trabalhos suficientes, na literatura consultada, para explicar as origens genéticas das alterações em perfis eletroforéticos.

Com base no exposto, pode-se considerar que as cepas em estudo, classificadas como pertencentes a subtipos de DNA distintos, provavelmente não tenham relação genética. O número de cepas sem identidade genética, determinado nesta investigação, é resultante do critério de leitura adotado (uma ou mais bandas com pesos moleculares diferentes, calculados frente a padrão).

TENOVER *et alii* (1995), do laboratório de Patógenos Hospitalares do *Center of Control Diseases and Prevention* (CDC), Atlanta, USA, relatam que não existem critérios padronizados para análise dos perfis de DNA e, conseqüentemente, diferentes pesquisadores, frente a mesma técnica, podem chegar a diferentes conclusões sobre a identidade entre cepas analisadas, devido aos diferentes critérios de leitura. No entanto, os subtipos de DNA, traduzidos pelos 11 Eks, verificados nas 75 amostras analisadas neste trabalho, podem ser comparados aos Eks encontrados por outros pesquisadores, devido aos critérios adotados. Alguns fatores limitantes para esta comparação estão relacionados às condições de realização da técnica de PFGE. Conforme se observa em alguns estudos com *Candida albicans*, diferença no número e resolução de bandas de DNA, podem ocorrer segundo alteração do tempo de corrida eletroforética, voltagem empregada e tempo de pulso aplicado no teste de PFGE (MAHROUS *et alii*, 1990). Além disso, diferentes modalidades de PFGE têm sido utilizadas, dificultando ainda mais a correlação entre os Eks verificados em diversas investigações. Neste sentido, o sistema de

cariotipagem proposto por MONOD *et alii* (1989) torna-se útil, pois classifica as bandas de DNA dentro de uma faixa de peso molecular e não pelo valor absoluto. Os Eks de cepas agrupadas sob o mesmo código não são idênticos, ocorrendo variações na posição das bandas no gel. Desse modo, pequenos erros de interpretação quanto à mobilidade eletroforética podem ser minimizados. Porém, como seria esperado, o agrupamento de vários pesos moleculares em um só grupo ou faixa, resulta em menor poder discriminatório das amostras e portanto, a variabilidade de Eks dentro de um determinado grupo de leveduras, é menor que na análise tradicional de PFGE, onde se leva em conta todas as bandas.

No presente trabalho, foram encontrados 6 tipos diferentes de Eks nas 75 amostras de *Candida albicans*, pelo sistema de MONOD *et alii* (Tabela 6). Estes autores descreveram 10 subtipos para 100 amostras de *Candida albicans*, sendo os maiores agrupamentos compostos de Eks com código 0212 (5 bandas) e 0222 (6 bandas) para, respectivamente, 43% e 26% das amostras. A variação entre as cepas ocorreu principalmente entre os cromossomos de menor peso molecular. No presente trabalho, o Ek 0214, com 7 bandas, foi o mais frequente (47,9%) e não foram observados os agrupamentos 0212, 0222 e 0312, com 5 e 6 bandas, os quais foram os mais frequentes no trabalho de MONOD *et alii*. Os agrupamentos tenderam para Eks com maior número de bandas, na faixa de maior peso molecular, resultando em Eks com códigos com final 4. Eks com 8 bandas (código 0224) foi verificado em 8 (10,7%) cepas, o qual não foi encontrado por MONOD *et alii*. Esta diferença pode ser explicada principalmente, pelas diferentes condições da eletroforese na segunda fase da corrida; os autores aplicaram pulsos de apenas 180 s por 16 h, tempo relativamente curto para separação de moléculas maiores. A análise de bandas por faixas de peso molecular, pode ser especialmente útil nos casos em que não foi usado densitômetro para leitura das bandas e sim leitura a “olho nu”, como no presente trabalho. A leitura visual, sob luz ultravioleta, das bandas coradas com brometo de etídio, seguida de análise, após documentação fotográfica, pode não detectar algumas bandas de baixa intensidade, que seriam facilmente identificadas quando submetidas à densitometria, que segundo MAHROUS *et alii* (1990), poderia melhorar muito a sensibilidade do método; porém na presente pesquisa, não foi possível a utilização do densitômetro, devido à indisponibilidade do equipamento.

Um dos principais objetivos dos trabalhos sobre testes de suscetibilidade e tipagem de *Candida albicans*, é o de comprovar a ocorrência de cepas resistentes *in vitro* aos fármacos empregados na prática médica. Um dos fármacos mais estudados é o fluconazol e, por isso, é maior a possibilidade de comparação dos resultados obtidos por diferentes autores em trabalhos com esse azol, pela proporção maior de publicações existentes na literatura. Para verificação de resistência adquirida por exposição a fármacos, tanto em relação ao fluconazol, como a outros derivados azólicos e a antifúngicos poliênicos, têm-se tornado imperioso o estudo concomitante dos subtipos de *Candida albicans*, de modo a demonstrar que a mesma cepa tornou-se resistente. Quando a tipagem não é realizada, permanece a dúvida do fenômeno de resistência.

Apesar do enorme esforço dos grandes grupos de especialistas para indicação definitiva de um método ideal, de consenso, para ser utilizado em todos os laboratórios que executam testes de suscetibilidade a antimicrobianos, vê-se, seguidamente, reformulações nas recomendações para execução dos testes. Muitos trabalhos têm sido dedicados ao estudo de efeitos sobre os valores de CIM, resultantes de alterações nas condições dos testes (GALGANI & STEVENS, 1976; SHEEHAN *et alii*, 1993; ANAÏSSIE *et alii*, 1996; PFALLER *et alii*, 1988; ODDS *et alii*, 1995). Algumas condições são críticas, ou seja, pequenas modificações causam grandes alterações nos resultados dos testes; outras, ao contrário, conforme são publicados estudos, mostram-se menos importantes e podem sofrer pequenas intervenções, para melhor adequação ao laboratório executor. Por exemplo, a padronização do inóculo por espectrofotometria (PFALLER *et alii*, 1988) e a agitação prévia das placas (ANAÏSSIE *et alii*, 1996), conforme executado neste trabalho, são pontos críticos, para aumentar a reprodutibilidade de resultados e diminuir o efeito *trailing* inerente aos fármacos azólicos.

Para a verificação dos valores das CIMs, utilizou-se a metodologia do INSTITUTO PASTEUR (1993), com pequenas modificações introduzidas em relação ao inóculo e meio de cultura. Com a finalidade de aumentar a objetividade e reprodutibilidade dos resultados, utilizou-se espectrofotômetro para medir o crescimento relativo das amostras frente às concentrações de fármacos antifúngicos nos testes de suscetibilidade. A leitura automatizada do “*end-point*”, de 50% de crescimento (IC₅₀) para os azóis e de 100% para anfotericina B, realizada por espectrofotometria, permitiu leitura objetiva e

registro por tempo indefinido, dos resultados gravados em fita emitida pelo aparelho, confirmando as vantagens apontadas previamente, por outros trabalhos (PFALLER & BARRY, 1994).

Encontrou-se boa atividade antifúngica dos 4 fármacos frente à maioria das cepas estudadas. A concentração inibitória mínima necessária para inibir o crescimento de 50% das 75 amostras foi de: $0,62 \mu\text{g ml}^{-1}$ para anfotericina B, $0,39 \mu\text{g ml}^{-1}$ para fluconazol, $\leq 0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ para cetoconazol e $0,08 \mu\text{g ml}^{-1}$ para itraconazol. Do mesmo modo, a concentração capaz de inibir 90% das amostras foi de: $1,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ para anfotericina B, $1,56 \mu\text{g ml}^{-1}$ para fluconazol, $0,04 \mu\text{g ml}^{-1}$ para cetoconazol e $0,16 \mu\text{g ml}^{-1}$ para itraconazol. As duas séries de valores são semelhantes às encontradas por MILAN (1997) em 85 amostras de *Candida albicans* isoladas de cavidade bucal de 109 pacientes com AIDS. A concentração de fluconazol que inibiu 50 % das 75 amostras, neste trabalho, também foi similar à relatada por BARCHIESI *et alii* (1994), em estudo com 100 pacientes com candidíase bucal e AIDS.

Os testes de suscetibilidade com anfotericina B revelaram 4,0% das 75 cepas com valor de $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ e 96,0% delas com CIM entre $0,08 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $1,25 \mu\text{g ml}^{-1}$. Verificou-se que os valores de CIM para fluconazol nas 75 amostras variaram de $\leq 0,09 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$, situando-se 93,3 % de amostras no valor $\leq 1,56 \mu\text{g ml}^{-1}$, 4,0 % entre $3,12 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $6,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ e apenas 2,7 % com valor $\geq 12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Tabela 1 e Figura 4). Estes dados revelam que a maioria (93,3 %) das cepas era sensível ao fluconazol, segundo critério de diversos autores (BART-DELABESSE *et alii*, 1993; GARCIA-HERMOSO *et alii*, 1995; PFALLER *et alii*, 1994; MORAN *et alii*, 1997).

Nesta pesquisa os valores de CIM de cetoconazol tiveram menor variação do que os de fluconazol. Para a maior parte (98,7%) das 75 amostras essa concentração foi de $\leq 0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $0,04 \mu\text{g ml}^{-1}$. Apenas uma (1,3%) amostra apresentou CIM de $0,62 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 4) considerada resistente, segundo critério ($\geq 0,06 \mu\text{g ml}^{-1}$) de RODRIGUEZ-TUDELA *et alii* (1995), resultando em 74 (98,7%) cepas sensíveis. Neste grupo, encontram-se 28 amostras de pacientes submetidos à terapia com cetoconazol por até 139 dias (Tabela 1) e que não demonstraram pressão seletiva de cepas a este fármaco.

Para o itraconazol, os valores de CIM mais frequentes situaram-se entre $\leq 0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $0,08 \mu\text{g ml}^{-1}$ para 75,9 % das amostras. O valor de CIM igual a $0,16 \mu\text{g ml}^{-1}$ foi

observado para 22,7 % e de 1,25 µg ml⁻¹ para 1,4 % das amostras. Analisando-se esses valores de CIM, verificou-se que a maior parte das cepas estudadas foi sensível ao itraconazol, considerando-se os valores de “*breakpoint*” indicados por REX *et alii* (1996). Estes autores, sugeriram CIM ≤ 0,125 µg ml⁻¹ para cepas sensíveis e CIM ≥ 1,25 µg ml⁻¹ para cepas resistentes. As cepas com CIMs intermediárias a estes valores teriam sensibilidade dependente da dose terapêutica a que o paciente estaria sendo submetido.

A medida das CIMs da anfotericina B, do cetoconazol e do itraconazol frente às 75 cepas dos 25 pacientes, revelou que, em 23 (92,0 %) casos não houve alteração ao longo da pesquisa (Tabela 1). Para 2 destes pacientes (8,67%), os valores das CIMs da anfotericina B (p16) e do fluconazol (p22) apresentaram-se altos em relação aos do restante do grupo, tanto na 1ª, quanto na 2ª e 3ª amostra (Tabelas 1 e 6). Para o paciente p10 foi verificado aumento da CIM do fluconazol e para o paciente p20 aumento nos valores correspondentes aos três fármacos azólicos. Estes 2 pacientes apresentaram somente um subtipo molecular nas três amostras analisadas, podendo ser comprovada a diminuição gradual da sensibilidade aos fármacos pela mesma cepa. Este dado vem ressaltar a importância deste estudo, baseado no monitoramento de amostras seriadas de um mesmo paciente, conforme indicado por ODDS (1992) e LACASSIN *et alii* (1996).

A variação dos valores de CIM do fluconazol para as cepas do paciente p10 (0,39 µg ml⁻¹, 1,56 µg ml⁻¹ e 3,12 µg ml⁻¹), indica tendência à resistência, pois o aumento foi significativo, segundo critério recomendado por PFALLER *et alii* (1994). Estes consideram significativa a alteração de 4 ou mais vezes na concentração mínima de fluconazol. Com critério menos rígido, MILLON *et alii* 1994, aceitam aumento de apenas 2 vezes do valor da CIM como significativo. O aumento verificado entre as duas primeiras amostras do paciente p10 foi de 4 vezes. O paciente foi submetido, neste intervalo de tempo, à terapia com itraconazol e, no período subsequente (14 dias antes da 3ª coleta), foi tratado com fluconazol, quando então apresentou cura clínica. Porém, o teste de suscetibilidade *in vitro* da 3ª amostra confirmou a tendência de aumento de CIM, revelando valor de 3,12 µg ml⁻¹. A análise dos cariótipos demonstrou se tratar do mesmo subtipo molecular (Ek F) nas 3 amostras, indicando a presença de uma única cepa em todo o curso clínico da infecção. Apesar do valor da CIM (3,12 µg ml⁻¹) se situar abaixo do(s) *breakpoint*(s) que indica(m) resistência ao fluconazol, ocorreu, no paciente, o

aparecimento de cepa com menor sensibilidade a este fármaco. Este fato foi também descrito por PFALLER *et alii* (1994), que verificaram, após de terapia com fluconazol, a ocorrência de seleção de cepa menos sensível ao fluconazol, comprovada pelas análises dos Eks das amostras sequenciais. REDDING *et alii*, 1994, demonstraram também o mesmo fenômeno em amostras sequenciais de um paciente com cepas de mesmo cariótipo eletroforético, envolvidas em 12 episódios sucessivos de candidíase bucal associada à AIDS; as cepas que apresentavam inicialmente, i.e., antes da terapia com fluconazol, valores de CIM entre $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $8 \mu\text{g ml}^{-1}$, após dois anos de exposição a este fármaco mostraram valores acima de $64 \mu\text{g ml}^{-1}$.

É interessante notar que a cepa do paciente p10, ainda que exposta ao itraconazol, não apresentou *in vitro* alteração de CIM para este fármaco e nem tampouco para cetoconazol (Tabela 6 e figura 5). Apesar de não ter sido demonstrada resistência *in vitro* ao itraconazol, verificou-se resistência clínica. Isto justificou a mudança na medicação do paciente, que passou a ser tratado com fluconazol, resultando em cura clínica. A cepa, contudo permaneceu na cavidade bucal com menor sensibilidade *in vitro* ao fluconazol e, portanto, com grande potencial para causar, futuramente, recidiva de lesão.

A ocorrência de cepa com valor de CIM alto para fluconazol ($3,12 \mu\text{g ml}^{-1}$) e baixo para itraconazol ($\leq 0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$), conforme verificada na 3ª amostra desse paciente pode ser considerada rara. Cepas com CIMs bem diferentes para fluconazol e itraconazol foram também encontradas nos estudos de SWINDELLS & RINALDI (1995) e ODDS *et alii* (1996). Estes achados não devem ser comuns, pois, sendo o mecanismo de ação antifúngica o mesmo para todos os azóis, é de se esperar, em teoria, um padrão de sensibilidade semelhante da cepa (*in vitro*) a esses fármacos.

O outro caso de variação significativa nos valores de CIM para fluconazol foi o do paciente p20 (Tabela 6 e Figura 7). Os valores da 1ª e 2ª amostra, respectivamente, $0,39 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $0,78 \mu\text{g ml}^{-1}$, se alteraram para $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ na 3ª amostra. O CIM verificado na última amostra enquadra a cepa como resistente, tanto segundo conceito de BART-DELABESSE *et alii* (1993), quanto HERMOSO *et alii* (1995). Estes autores, que empregaram nos testes de suscetibilidade o mesmo esquema de diluição dos fármacos utilizado no presente trabalho, consideram valores de CIM para fluconazol $\geq 12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ característicos de cepas resistentes, valores entre $6,25$ e $3,12 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cepas de

sensibilidade intermediária e $CIM \leq 3,12$ de cepas sensíveis ao fármaco. MORAN *et alii* (1997) e PFALLER *et alii* (1994) aceitam valores menores ($\geq 8 \mu\text{g ml}^{-1}$) para classificar cepas como resistentes. Portanto, a cepa isolada na 3ª coleta do paciente p20 é confirmadamente resistente *in vitro* ao fluconazol.

Os pesquisadores são cautelosos em avaliar o fenômeno de resistência quando são realizadas tipagens de DNA de cepas com altos valores de CIM e são encontradas variações de subtipos dentro do mesmo processo infeccioso. PFALLER *et alii* (1994), por exemplo, citam que “frequentemente, as cepas mais resistentes ao fluconazol tinham subtipos de DNA diferentes da cepa original” e que talvez tenha havido seleção de amostras resistentes encontradas em pacientes infectados originalmente, com maior diversidade de cepas. Porém, o significado clínico deste processo, segundo os próprios autores, não é claro, pois a maioria dos valores de CIM, estavam na faixa de $\leq 8 \mu\text{g ml}^{-1}$. Além disso, os pacientes apresentaram boa resposta clínica, no caso, ao fluconazol.

As interpretações ficam bem mais fáceis quando são encontrados Eks idênticos entre cepas com diminuição de sensibilidade aos fármacos. Em estudo abrangendo 21 pacientes com candidíase de orofaringe associada à AIDS e 9 pacientes sem sintomatologia para a micose, MILLON *et alii* em 1994, administraram fluconazol por vários meses e examinaram o comportamento dos agentes etiológicos ao longo do tempo. Verificaram que cepas de 7 (33,4%) de 21 pacientes, primariamente sensíveis, tornaram-se resistentes ao fluconazol. Constataram, ainda, que, para outros 9 pacientes, o valor de CIM aumentou de modo significativo, sem, no entanto, atingir o valor mínimo para ser considerada resistência. Os autores que empregaram 2 técnicas moleculares independentes (PFGE e RFLP), comprovaram que as cepas com valores crescentes de CIM possuíam o mesmo tipo de DNA. BLUMBERG *et alii* em 1992, concluíram que o valor da CIM do fluconazol frente à cepa de *Candida albicans* de um paciente, aumentou após curso terapêutico de 12 dias com o fármaco e que os Eks das amostras coletadas antes e após tratamento eram idênticos, confirmando a persistência da mesma cepa. BARCHIESI *et alii* (1995a) descreveram aumento significativo (4 vezes) no valor da CIM para fluconazol das cepas responsáveis por candidíase bucal associada à AIDS em 67 % de 12 pacientes infectados por um único subtipo e em 50% de 10 pacientes com amostras com múltiplos subtipos de DNA. Estes achados são corroborados pelos resultados obtidos no presente trabalho, que

demonstram a manutenção do subtipo molecular nos pacientes p10 e p20, submetidos à terapia com fármacos azólicos, mas com diminuição *in vitro* da sensibilidade a um ou mais desses antifúngicos.

Para as amostras do paciente p20, observou-se variação significativa de CIM, não apenas, do fluconazol, mas também do cetoconazol e itraconazol. O paciente estava há 27 dias sob terapia com cetoconazol (Tabela 6) quando foram demonstrados os altos valores de CIM dos 3 fármacos azólicos. Somente um subtipo molecular e, portanto, somente uma cepa foi isolada do paciente, durante o curso da infecção.

Neste paciente, houve remissão do quadro clínico, apesar do aumento significativo do valor da CIM, tanto do cetoconazol, quanto do fluconazol e itraconazol. Neste caso, não houve correspondência da suscetibilidade *in vitro* com a resposta clínica. A mesma dissociação entre resistência *in vitro* e clínica foi verificada para o paciente p22 (Tabela 6 e Figura 8). Estes achados concordam com as observações de SHEEHAN *et alii* (1993), FIELD *et alii* (1996) e se contrapõe aos resultados obtidos por CAMERON *et alii* (1993), RUHNKE *et alii* (1994a), RODRIGUEZ-TUDELA *et alii* (1995) e GUENNEC *et alii* (1995) os quais encontraram boa correlação entre resistência *in vivo* e *in vitro*.

Assim como para o paciente p20, verificou-se para o paciente p5 desenvolvimento de resistência clínica ao cetoconazol, resultando na mudança da terapia para fluconazol (Tabela 1). Entretanto, frente às cepas deste paciente não ocorreu alteração nos valores de CIM dos fármacos estudados. Neste caso, os dados obtidos *in vitro* também não correspondem à ocorrência clínica. A possível explicação para esta dissociação entre clínica e característica do agente etiológico, encontra-se no relato de WHELAN *et alii* (1990), que aventaram a hipótese de pacientes com AIDS desenvolverem candidíase bucal recorrente, mais provavelmente por disfunção local ou sistêmica do que pela presença de uma determinada cepa com alto valor de CIM.

No entanto, a descrição de cepas emergentes e resistentes *in vitro* aos fármacos antifúngicos, desempenham papel importante no curso natural da candidíase, seja qual for sua localização topográfica (LYNCH *et alii*, 1996). Segundo REX *et alii* (1995), até 5% dos pacientes com AIDS podem apresentar candidíase com resistência clínica ao fluconazol, no período avançado da imunodeficiência, agravando o prognóstico da infecção.

A interpretação dos resultados de testes de suscetibilidade deve ser realizada com cautela, levando-se em conta que: a) a CIM não é uma medida química ou física, b) fatores do hospedeiro podem ser decisivos no curso da infecção e, c) é mais seguro um prognóstico, de falha terapêutica, frente à cepas resistentes, do que um prognóstico de cura feito a partir do isolamento de cepas sensíveis (REX *et alii*, 1997).

Em micologia médica, o termo “resistência” deve ser empregado sob certa limitação. Para REX *et alii* (1995) deve-se ter cuidado ao interpretar os relatos de resistência clínica de *Candida* sp aos fármacos azólicos. Por outro lado, a determinação de resistência *in vitro* depende do valor limite (“breakpoint”) considerado pelo autor. Valores de CIM $\geq 16 \mu\text{g ml}^{-1}$ para fluconazol, obtidos pelo micrométodo, são atribuídos à cepas resistentes a este fármaco, segundo RODRIGUEZ-TUDELA *et alii* (1995). Aceitando valor inferior, BARCHIESI *et alii* (1995) sugerem que amostras de *Candida albicans* com CIMs para fluconazol $\geq 8 \mu\text{g ml}^{-1}$, tendem a ser menos sensíveis *in vivo* a doses de 100 a 200 mg por dia deste fármaco.

A tendência atual é vincular o conceito de resistência de *Candida albicans* aos azóis à dose terapêutica (REX *et alii*, 1996). Utilizando o macrométodo para testes com fluconazol, cepas causadoras de candidíase bucal sensíveis à concentrações $\leq 8 \mu\text{g ml}^{-1}$, são consideradas sensíveis; cepas que determinam CIM de $16 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $32 \mu\text{g ml}^{-1}$ têm sensibilidade dependente da dose terapêutica (*S-DD*) e cepas para as quais as CIM são $\geq 64 \mu\text{g ml}^{-1}$ são classificadas como resistentes. Do mesmo modo, os conceitos para itraconazol são: CIM de $\leq 0,125 \mu\text{g ml}^{-1}$ para cepas sensíveis, valores de $0,25-0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ para cepas *S-DD* e valores $\geq 1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ para cepas de candidíase oral resistentes ao itraconazol. A classificação *S-DD* se baseia no nível sanguíneo do fármaco, que varia conforme a dose terapêutica. A dose de 100 mg por dia de fluconazol resulta em nível sérico de 6 a $7 \mu\text{g ml}^{-1}$ enquanto as doses de 400 mg e 800 mg por dia, conferem, respectivamente, níveis séricos de $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $50 \mu\text{g ml}^{-1}$. Assim, a falha terapêutica (resistência clínica) deve ocorrer quando a cepa infectante tiver CIM com valor aproximado ao do nível sanguíneo. Para itraconazol, a idéia é a mesma, apenas, com a ressalva de que o nível sanguíneo varia muito, conforme condições de biotransformação do fármaco, pelo paciente, sabendo-se que doses de 200 mg por dia podem resultar em níveis séricos de $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ou maiores. Deve-se ressaltar que estes conceitos se aplicam apenas

a cepas de *Candida albicans* causadoras de candidíase bucal e faringea e não se existem dados para cepas de infecção invasiva por *Candida* sp.

Analisando-se os valores de CIM dos outros fármacos estudados, para as cepas do paciente p20, verificou-se que, para as duas primeiras amostras, o valor de $<0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ do cetozonazol, passou para $0,62 \mu\text{g ml}^{-1}$ frente à 3ª amostra (Tabela 6 e Figura 7). Esse significativo aumento de 5 vezes, ocorreu após 14 dias de exposição ao cetozonazol permitindo concluir que ocorreu resistência da cepa a este fármaco. O valor de $0,62 \mu\text{g ml}^{-1}$, confere à cepa a característica de resistente, segundo limite (*breakpoint*) de $\geq 0,06 \mu\text{g ml}^{-1}$, proposto por RODRIGUEZ-TUDELA *et alii*, 1995.

Frente ao itraconazol, a cepa do paciente p20, isolada na 3ª coleta, apresentou valor de $1,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Tabela 6) também pode ser considerada resistente. O valor inicial da CIM para esta cepa foi de $0,08 \mu\text{g ml}^{-1}$, mantendo-se inalterado na 2ª coleta, mesmo após 14 dias de exposição ao cetozonazol. De acordo com REX *et alii* (1996), cepas com valores de CIM acima de $0,125 \mu\text{g ml}^{-1}$, podem ser consideradas resistentes. A análise dos valores sequenciais de CIM, permite afirmar que houve variação significativa (maior que 4 vezes), em consequência do aparecimento de resistência ao itraconazol.

O aparecimento de cepa resistente ao fluconazol e ao itraconazol, neste caso, após terapia com cetozonazol, indica a ocorrência do fenômeno de resistência cruzada entre azóis, descrito previamente na literatura, considerado fato relativamente comum (HITCHCOCK *et alii*, 1993; McCULLOUGH & HUME, 1995; NOLTE *et alii*, 1997). BARCHIESI *et alii* (1994) encontraram amostra de *Candida albicans* altamente resistente ao itraconazol (CIM $\geq 16 \mu\text{g ml}^{-1}$), cetozonazol (CIM = $4 \mu\text{g ml}^{-1}$) e fluconazol, proveniente de paciente com candidíase bucal e AIDS. À medida em que são descritas cepas com resistência cruzada aos azóis, aumenta a importância dos testes *in vitro* de avaliação de suscetibilidade a estes fármacos. Desse modo, em pacientes sob terapia com determinada medicação azólica e com resistência clínica à terapia, a verificação *in vitro* dos valores de CIM pode validar ou não a substituição da medicação por outro fármaco azólico.

De modo controverso, alguns pesquisadores não confirmaram a ocorrência de resistência cruzada em seus estudos. CHAVANET *et alii*, 1995, identificou 12 (13,6%) entre 88 amostras de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol que se mostraram

sensíveis ou “moderadamente sensíveis” (sic) ao cetoconazol, miconazol e econazol. BARCHIESI *et alii*, 1994 encontraram resistência ao fluconazol em metade das 100 amostras isoladas de pacientes com AIDS mas, a grande maioria delas não era resistente ao itraconazol. MILLON *et alii*, 1994, verificaram que a terapia com fluconazol selecionou cepas resistentes ($\text{CIM} \geq 32 \mu\text{g ml}^{-1}$) a este antifúngico em 7 de 21 pacientes com candidíase de orofaringe associada à AIDS. Entretanto, as cepas que apresentaram resistência ao fluconazol permaneceram sensíveis a outros derivados azólicos, em testes realizados com *Mycototal Test* (Hoechst-Behring). Os autores não consideram que a resistência ao fluconazol esteja relacionada à alteração na 14α -dimetilase, a enzima citocromo P-450, que é alvo de todos os compostos azólicos. Acreditam, outrossim, na hipótese de que o fenômeno da resistência esteja ligado às alterações, possivelmente simultâneas, na produção de C5 desidrogenase envolvida na biossíntese do ergosterol ou à superprodução de citocromo P-450 (conforme verificado em *Candida glabrata*), ou ainda, redução seletiva na permeabilidade celular, relatada por RYLEY *et alii* em 1984.

Na literatura consultada, encontram-se proposições para mecanismos de resistência ao fluconazol: redução da permeabilidade celular, sistema múltiplo de efluxo de drogas (ALBERTSON *et alii*, 1996), modificação da enzima onde o fluconazol atua (HUNDT & HOFMANN, 1994) ou ainda, superprodução desta enzima (REX *et alii*, 1995). Seja qual for a causa, foi comprovado por estudos bioquímicos, realizados por VENKATESWARLU *et alii* (1995), que a quantidade de fluconazol intracelular das amostras de *Candida albicans* resistentes é 6 a 10 vezes menor que a observada em amostras sensíveis a este fármaco, demonstrando *in vitro* o comportamento dos fenótipos resistentes.

São diversas as hipóteses sobre os possíveis mecanismos de resistência. No entanto, praticamente todas tiveram origem no fato frequentemente descrito na literatura: a administração a longo prazo de fármacos antifúngicos em casos de candidíase bucal em pacientes com AIDS (METZGER *et alii*, 1994; PFALLER *et alii*, 1994; NEWMAN *et alii*, 1994; JOHNSON *et alii*, 1995; MAENZA *et alii*, 1996; MAENZA *et alii*, 1997).

MILLON *et alii* (1994) sugeriram que doses totais de fluconazol acima de 5 gramas, poderiam favorecer o aparecimento de resistência, principalmente em outras

espécies de *Candida* (*C.krusei* e *C.glabrata*), reconhecidamente menos sensíveis ao fluconazol.

Entretanto, ainda não se sabe qual o período crítico de exposição aos fármacos e nem tampouco a probabilidade de ocorrência deste fenômeno. A avaliação do comportamento da mesma cepa (identificada pelo mesmo Ek) responsável por diversos episódios de candidíase bucal em paciente com AIDS tratado com fluconazol, permitiu a PFALLER *et alii* (1994) concluir que apesar do fármaco ser ineficaz na erradicação do agente, na maioria dos 22 pacientes (75%) não houve aparecimento de resistência *in vitro*. MILLON *et alii* (1994) também notaram que 33% de 30 pacientes tratados com fluconazol portavam cepas que se mantiveram sensíveis ao fluconazol e 13% mostraram apenas leve aumento nos valores de CIM, considerado insignificante pelos próprios autores. ESPINEL-INGROFF *et alii* (1996b), verificaram que, entre 9 pacientes tratados com fluconazol, 56 % mantiveram cepas sensíveis ao fármaco.

Contrapondo-se aos achados que mostram resistência adquirida de cepas em pacientes tratados, existem relatos que indicam a possibilidade de resistência natural ao fluconazol, em cepas nunca expostas ao fármaco (GOFF, 1995). Reforçando esta hipótese, foram isoladas, no presente trabalho, cepas do paciente p22, que responderam a valores altos de CIM ($12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $6,25 \mu\text{g ml}^{-1}$) do fluconazol, mesmo antes da terapia com cetoconazol (Tabela 6 e Figura 8). Os valores de CIM para essas cepas foram elevados, somente para o fluconazol, situando-se em $0,04 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $0,08 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente, para cetoconazol e itraconazol. Estes dados revelam a ocorrência de uma cepa com resistência, provavelmente, natural ao fluconazol, o que enfatiza a necessidade, cada vez maior, de monitoração da suscetibilidade aos antifúngicos das cepas de *Candida albicans* associadas a pacientes com AIDS.

Em relação à anfotericina B, para as 75 amostras foram obtidos valores de CIM entre $0,08 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Tabela 1 e Figura 4). Em nenhum paciente foi verificada cepa com variação significativa no padrão de suscetibilidade à anfotericina B em análise seriada.

Para o paciente p16, as 3 cepas isoladas com mesmo subtipo molecular (Ek J) apresentaram CIM com valor idêntico ($2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$). Este valor, no entanto, é relativamente alto para o conjunto de cepas estudado. Se for considerado “breakpoint” de $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$

para definir resistência *in vitro* à anfotericina B, conforme recomendado por PFALLER *et alii* (1994) pode-se concluir que, no presente trabalho, um (4%) paciente apresentou característica de resistência. Apesar do alto valor de CIM encontrado nesta pesquisa, o meio utilizado tem limitações para verificação de amostras resistentes à anfotericina B (ODDS *et alii*, 1995, REX *et alii*, 1995; GHANNOUM *et alii*, 1996).

Em 1992, SHADOMY & PFALLER relataram que cepas com $\text{CIM} \geq 1,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ são, provavelmente, resistentes à anfotericina B, pois esta concentração mínima, necessária para inibi-las, é maior ou igual à concentração fungicida obtida no soro de pacientes tratados com o fármaco. Segundo este valor de CIM, a cepa do paciente p16, isolada nas 3 amostras, é resistente à anfotericina B. Dentro ainda do conceito desses autores, as 68 (98,7 %) cepas com CIM entre $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $0,78 \mu\text{g ml}^{-1}$ são consideradas sensíveis. Os dados extraídos da ficha clínico-epidemiológica-laboratorial do paciente, não revelou tratamento prévio com anfotericina B, ou outro fármaco poliênico, que explicasse seleção de cepas resistentes por exposição ao medicamento. POWDERLY *et alii* (1988), examinando amostras causadoras de fungemia em pacientes transplantados de medula óssea, encontraram diferença significativa nas CIMs para anfotericina B dessas amostras, em relação a um grupo controle de cepas de meio ambiente. Muitos pacientes, que nunca haviam sido tratados com anfotericina B, apresentaram cepas resistentes à $\text{CIM} \geq 0,8 \mu\text{g ml}^{-1}$, responsáveis por curso grave da infecção, sugerindo a existência de resistência natural ao fármaco. CONLY *et alii* (1992) descreveram CIM de $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ para anfotericina B de amostra causadora de infecção disseminada, nunca anteriormente exposta ao fármaco.

A falta de correlação de achados *in vitro* com os aspectos observados *in vivo* no curso da infecção tratada com anfotericina B é muito mais acentuada do que a verificada com azóis (HOPFER, 1992; LOMBARDI *et alii*, 1989. Muitas cepas com altos valores de CIMs são menos virulentas *in vivo* em animais de experimentação (GHANNOUM *et alii*, 1996). Este fato pode ser explicado pela falta de definição de “breakpoint” para os diversos métodos disponíveis ou por condições intrínsecas do hospedeiro. Ocorre ainda que, muitos estudos ainda falham na descrição do curso clínico da infecção quando avaliam os resultados de resistência *in vitro*. De modo geral, nota-se uma grande lacuna no conhecimento dos padrões de suscetibilidade de *Candida albicans* a este fármaco, na literatura especializada. A resistência *in vivo* à anfotericina B é mais frequentemente

relatada em espécies outras que não *albicans* ou em *Cryptococcus neoformans* e, em regra, levam a quadros graves e disseminados. Em casos de AIDS as cepas de *Candida albicans* resistentes à anfotericina B estão associadas aos pacientes em estágios avançados da síndrome de imunodeficiência.

Apesar da ênfase atual aos novos antifúngicos azólicos e a grande preocupação com a emergência de cepas resistentes a esse fármacos, o encontro de 1 (4%) paciente com candidíase bucal causada por cepa aparentemente resistente *in vitro* à anfotericina B, alerta para a importância da monitoração da suscetibilidade a fármacos antifúngicos tradicionais. O achado também evidencia a necessidade do desenvolvimento de método ideal para os testes com anfotericina B para padronização do valor limite (“*breakpoint*”) que caracterize resistência.

6. CONCLUSÕES

1. A tipagem fenotípica de 75 amostras de *Candida albicans* de 25 pacientes, segundo método de ODDS & ABOTT (1980) revelou 13 biótipos (157, 173, 177, 343, 353, 357, 371, 373, 377, 577, 723, 737 e 777), sendo os mais frequentes 577 (20,0 %) e 377 (18,7%). A morfotipagem permitiu a identificação de 14 subtipos, com predomínio (60,0%) do morfotipo 0000.
2. A variabilidade dos cariótipos eletroforéticos das amostras foi demonstrada através de 11 subtipos, designados com letras de *A* a *L*. Maior número de cepas foi classificada como *G* ou *L*, respectivamente, 24,0% e 16,0%.
3. Todos os cariótipos apresentaram bandas com peso molecular entre 850 e 2200 kb. O cariótipo denominado *L*, agrupando 8 (10,7 %) cepas, mostrou bandas com 680 kb.
4. A maioria dos 25 pacientes apresentou um único biótipo (68,0%) ou único cariótipo (76,0 %) nas três amostras analisadas. A proporção de pacientes que apresentaram apenas um morfotipo de *Candida albicans* (56,0%) foi semelhante à de pacientes com vários subtipos morfológicos (44,0%).
5. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) para fluconazol variaram de $\leq 0,09 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$, para anfotericina B de $0,31 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$, para cetonaconazol de $\leq 0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $0,62 \mu\text{g ml}^{-1}$ e itraconazol de $\leq 0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $1,25 \mu\text{g ml}^{-1}$.
6. Três (12,0 %) pacientes portaram cepas resistentes *in vitro* ao fluconazol, sendo que um deles apresentou também resistência ao cetonaconazol e ao itraconazol.
7. Verificou-se falta de correlação entre resistência *in vitro* ao fluconazol e clínica em 2 dos 3 pacientes.

8. Ocorreu resistência *in vitro* ao fluconazol, após exposição das cepas de 2 pacientes a este fármaco (resistência adquirida) e provável resistência natural em cepa de outro paciente.
9. Houve resistência cruzada entre os fármacos azólicos em cepa de 1 (4,0 %) paciente.
10. Verificou-se cepa resistente à anfotericina B com CIM de $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ nas 3 amostras de 1 (4,0 %) paciente.

7. ANEXOS

7.1. Anexo 1. Ficha clínico-epidemiológica-laboratorial dos pacientes

Protocolo de Pesquisa ☐ MIC ☐ Resistência Amostra n/ _____

1-NOME: _____

Data __/__/__ Prontuario: _____ Unidade: ☐ Ambulatório

Nasc. __/__/__ sexo ☐ feminino ☐ masculino ☐ Enfermaria

2-Classificação: ☐ assintomático ☐ ARC ☐ AIDS CDC _____

3-Comportamento de risco: ☐ homossexual ☐ bissexual ☐ uso de droga IV

☐ transfusão ☐ heterossexual com parceiro com AIDS ☐ desconhecido

4-Lesão oral: ☐ com lesão oral ☐ discreta ☐ moderada ☐ intensa

☐ sem lesão oral

5-Terapêutica: ☐ nistatina ☐ miconazol ☐ clorexidine ☐ cetoconazol

☐ itraconazol ☐ fluconazol ☐ anfotericina B ☐ sem terapia

dose: _____ mg/dia _____ mg/kg

terapia anterior para candidíase: ☐ não

☐ sim qual? _____

suspenso em __/__/__

6-Paciente apresenta outra Infecção fúngica? ☐ não

☐ sim ☐ SNC ☐ TGI ☐ TU ☐ VAS ☐ pulmão outro local _____

☐ *Cryptococcus* ☐ *Histoplasma* ☐ *Aspergillus* ☐ *Pb* ☐ micose cutânea

diagnóstico: ☐ cultura ☐ micológico direto ☐ histopatológico ☐ presuntivo

início do tratamento: __/__/__ droga: _____ dose: _____

7-Resumo/clínico: ☐ AZT ☐ DDI ☐ DDC ☐ d4T CD4 ___/mm3 CD8 ___/mm3

n/seção: _____ n/TL: _____ médico: _____

data: __/__/__

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Exame:

- ☐ normal
☐ candidíase pseudomembranosa
☐ candidíase hiperplásica
☐ candidíase atrofica
☐ queilite angular ☐ dir. ☐ esq.
☐ leucoplasia pilosa

Localização:

listar números do diagrama a

esquerda: ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

Tratamento:

- ☐ Sem terapia antifúngica.
☐ com terapia antifúngica há ____ dias ou ____ anos.
☐ 1-nistatina ☐ 2-miconazol ☐ 3-anfotericina B ☐ 4-clorexidine ☐ 5-cetoconazol
☐ 6-itraconazol ☐ 7-fluconazol ☐ 8-bicarbonato

CONDUTA:

Iniciar tratamento com ☐ na dose de ____ mg/dia por ____ dias

trocar ☐ por ☐

Resultado micológico:

- ☐ cultura não realizada ☐ cultura negativa ☐ cultura positiva

Antifungograma: _____ data: __/__/__ Resp.: _____

_____ data: __/__/__ Resp.: _____

_____ data: __/__/__ Resp.: _____

_____ data: __/__/__ Resp.: _____

Tipagem: _____ data: __/__/__ Resp.: _____

7.2. Anexo 2. Protocolo para identificação de leveduras da Seção de Micologia, Serviço de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Material biológico

Nº

Data de entrada:

1- MORFOLOGIA

Em meio sólido: (data:)	Em meio líquido: (data:)
Cor e aspecto da colônia:	Sedimento
Blastoconídios:	película
Pseudomicélio: :	anel e ilhotas
Micélio verdadeiro:	Artroconídios
Artroconídios:	Tipo de brotamento
Clamidósporos:	Tamanho
	Forma

2- PROVAS FISIOLÓGICAS

A- Auxanograma

1. G glicose () ()	12. Lar I- arabinose () ()	23. I inositol () ()
2. GA galactose () ()	13. Ri D ribose () ()	24. Mz melezitose () ()
3. SOR sorbose () ()	14. Gl glicerol () ()	25- X D. xilose () ()
4. SU sacarose () ()	15. Er eritritol () ()	26. Dar D- arabinose () ()
5. MA maltose () ()	16. Rib ribitol () ()	27. Rh ramnose () ()
6- CE celobiose () ()	17. Gal galactitol () ()	28. Sa salina () ()
7- Tr trealose () ()	18. Man manitol () ()	
8- La lactose () ()	19. Glu glucitol () ()	
9- Me melibiose () ()	20. Lac ácido láctico () ()	
10- Ra rafinose () ()	21. Cit ácido cítrico () ()	29. Pe peptona () ()
11- St amido solúvel () ()	22. Suc ác. succínico () ()	30. No3 nitrato () ()

B- Zimograma

glicose () ()	treiose () ()	sacarose () ()
galactose () ()	celobiose () ()	rafinose () ()
maltose () ()	lactose () ()	melibiose () ()

3 – Provas complementares

Presença de cápsula ()	Urease ()
Crescimento a 37° ()	Resistência a cicloeximida ()
Produção de ácidos ()	Ascósporos ()
Presença de pigmentos carotenóide ()	

Resultado:

7.3. Anexo 3. Esquema de concentrações de fármacos utilizado nos testes de suscetibilidade

ESQUEMA DE CONCENTRAÇÕES (em $\mu\text{g ml}^{-1}$)											
TUBOS DE ENSAIO											
F	S.E.	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª
FZ	1000	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,82	3,91	1,95	0,98
ANFO	1000	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
CZ	1000	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
ITRA	1000	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
ORIFÍCIOS DA PLACA DE MICROTITULAÇÃO											
		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º
FZ		50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09
ANFO		10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02
CZ		10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02
ITRA		10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02

F = FÁRMACO
S.E. = SOLUÇÃO ESTOQUE
FZ = FLUCONAZOL
ANFO = ANFOTERICINA B
CZ = CETOCONAZOL
ITRA = ITRACONAZOL

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRESTI, M.G.; de BERNADIS, F.; MONDELLO, F.; BELLOCCO, R.; CAROSI, G.P.; CAPUTO, R.M.; MILAZZO, F.; CHIODO, F.; GIANNINI, V. & MINOLI, L. Clinical and mycological evaluation of fluconazole in the secondary prophylaxis of esophageal candidiasis in AIDS patients. An open, multicenter study. Eur.J.Epidemiol., 10(1): 17-22, 1994.
- ALBERTSON, G.D.; NIIMI, M.; CANNON, R.D. & JENKINSON, H.F. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 40(12):2835-2841, 1996.
- ALVES, A.H. & CURY, A.E. Estudo comparativo entre as técnicas de diluição em caldo e diluição em ágar, nos antibiogramas para *Candida*. Rev.Inst.Med.trop.São Paulo, 34(3): 259-262, 1992a.
- ALVES, A.H. & CURY, A.E. Sensibilidade de leveduras do gênero *Candida*, isoladas de pacientes com câncer, a antifúngicos poliênicos. Rev.Inst.Med.trop.São Paulo, 34(3): 251-254, 1992b.
- ANAISSE, E. J.; PAETZNICK, V.L.; ENSIGN, L.G.; ESPINEL-INGROFF, A.; GALGANI, J.N.; HITCHCOCK, C.A.; LaROCCO, M.; PATTERSON, T.; PFALLER, M.A.; REX, J.H. & RINALDI, M.G. Microdilution antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with and without agitation: an eight-center collaborative study. Antimicrob.Agents Chemother., 40(10): 2387-2391, 1996.
- ANDERSON, B.; KOHN, L.M & LESLIE, J.F. Genetic mechanisms in fungal adaptation. In: George C., Cannoll & Donald T. Wicklow, coord., The fungal community: its organization and role in the ecosystem. 2nd ed. N.Y., Marcel Decker Inc., 1992. p.73-98.
- BARCHIESI, F.; COLOMBO, A.L.; McGOUGH, D.A.; FOTHERGILL, A.W. & RINALDI, M.G. *In vitro* activity of itraconazole against fluconazole-susceptible and-resistant *Candida albicans* isolates from oral patients infected with human immunodeficiency virus. Antimicrob.Agents Chemother., 38(7): 1530-1553, 1994.
- BARCHIESI, F.; HOLLIS, R.J.; DEL POETA, M.; McGOUGH, D.A.; SCALISE, G.; RINALDI, M.G. & PFALLER, M.A. Transmission of fluconazole-resistant *Candida albicans* between patients with AIDS and oropharyngeal candidiasis documented by pulsed-field gel eletrophoresis. Clin.Infect. Dis., 21: 561-4, 1995a.
- BARCHIESI, F.; HOLLIS, R.J.; McGOUGH, D.A.; SCALISE, G.; RINALDI, M.G.; PFALLER, M.A. DNA subtypes and fluconazole susceptibilities of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of patients with AIDS. Clin.Infect.Dis., 20(3): 634-40, 1995b.

- BARCHIESI, F.; NAJVAR, L.K.; LUTHER, M.F.; SCALISE, G.; RINALDI, M.G.; GRAYBILL, J.R. Variation in fluconazole efficacy for *Candida albicans* strains sequentially isolated from oral cavities of patients with AIDS in an experimental murine candidiasis model. Antimicrob. Agents Chemother., **40**(5): 1317-1320, 1996.
- BART-DELABESSE, E.; BOIRON, P.; CARLOTTI, A. & DUPONT, B. *Candida albicans* genotyping in studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. J.Clin.Microbiol., **31**(11): 2933-2937, 1993.
- BART-DELABESSE, E.; DEVENTER, H.V.; GOESSENS, W.; POIROT, J.L.; LIORET, N.; BELKUM, A.V. & DROMER, F. Contribution of molecular typing methods and antifungal susceptibility testing to the study of a candidemia cluster in a burn care unit. J.Clin.Microbiol., **33**(12): 3278-3283, 1995.
- BARRETO DE OLIVEIRA, M.T. Leveduras isoladas da mucosa bucal de portadores sadios, pacientes com SIDA e neoplasias. Produção de exoenzimas e tipagem de amostras de *Candida albicans*. São Paulo, 1993. [Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da USP].
- BERNARDIS, F.; LORENZINI, R.; VERTICCHIO, R.; AGATENSI, L. & CASSONE, A. Isolation, acid proteinase secretion, and experimental pathogenicity of *Candida parapsilosis* from outpatients with vaginitis. J.Clin.Microbiol., **27**(11): 2598-2603, 1989.
- BEZJAK, V.; AL-NAKIB, T.; CHANDY, R. & VERGHESE, R. Cell-constituent polyamines in *Candida* species and new biotyping of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* strains. J. Med.Vet.Mycol., **28**: 267-273, 1990.
- BLASCHKE-HELLMESSEN, R. Epidemiologische untersuchungen zum workommen von Hefepilzen bei kindem und derem muttem. Mykosen, **11**: 611-6, 1968.
- BILLE, J. Cluster of oral atypical *Candida albicans* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. J.Clin.Microbiol., **33**(5): 1129-35, 1995.
- BOKEN, D.; SWINDELLS, D. & RINALDI, M. Increasing resistance of *Candida albicans* to fluconazole. Clin.Infect.Dis., **17**:1018-21, 1993.
- BRANCHINI, M.L.; PFALLER, M.A.; RHINE-CHALBERG, J.; FREMPONG, T. & ISENBERG, H.D. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. J.Clin.Microbiol., **32**(2): 452-456, 1994.
- BRAWNER, D.L. Comparison between methods for serotyping of *Candida albicans* produces discrepancies in results. J.Clin.Microbiol., **29**(5): 1020-1025, 1991.
- BRAWNER, D.L. & CUTLER, J.E. Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised

- patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. J.Clin.Microbiol. 27: 1335-1341, 1989.
- BROWN-THOMSEN, J. Variability in *Candida albicans* (Robin) Berkhout. 1-Studies on morphology and biochemical activity. Hereditas, 60: 355-398, 1968
- BRUATTO, M.; VIDOTTO, V.; MARINUZZI, G.; RAITERI, R. & SINICCO, A. *Candida albicans* biotypes in human immunodeficiency virus type 1-infected patients with oral candidiasis before and after antifungal therapy. J.Clin.Microbiol., 29(4): 726-730, 1991.
- CALHOUN, D.L.; ROBERTS, G.D.; GALGIANI, J.N.; BENNETT, J.E.; FEINGOLD, D.S.; JORGENSEN, J.; KOBAYASHI, G.S. & SHADOMY, S. Results of a survey of antifungal susceptibility tests in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B. J.Clin.Microbiol., 23: 298-301, 1986.
- CAMERON, M.L.; SCHELL, W.A.; BRUCH, S.; BARTLETT, J.A.; WASKIN, H.A. & PERFECT, J.R. Correlation of in vitro fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1. Antimicrob.Agents Chemother., 37(11): 2449-2453, 1993.
- CANDIDO, R.C. *Candida albicans*: marcadores epidemiológicos em amostras isoladas de diferentes materiais biológicos. São Paulo, 1991. [Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina].
- CANDIDO, R.C.; FISCHMAN, O.; ITO, I.Y.; PAULA, C.R. *Candida albicans*: Biotyping by susceptibility to antimycotics. Rev. Microbiol., 27: 83-86, 1996.
- CARAMALAC, D.A. Ocorrência de leveduras em parturientes e recém-nascidos: tipagem de amostras de *Candida albicans*. São Paulo, 1995. [Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédica da USP].
- CARVALHO, M.G.; RODRIGUES, M.A.; MARQUES, M.E.; FRANCO, M. & MONTENEGRO, M.R. Lesions of the gastrointestinal tract in acquired immunodeficiency syndrome: study of 45 consecutive necropsies. Rev.Soc. Bras.Med.Trop., 27(3): 135-41, 1994.
- CDC-CENTER OF DISEASES CONTROL AND PREVENTION. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. MMWR, 41 (nº RR-17): 1-19, 1992.
- CHAVE, J.P.; VERNAZZA, P.; MARGALITH, D. & GLAUSER, N.P. Simple dose therapy for oesophageal candidiasis with fluconazol. *In*: Fifth International Conference on AIDS, Montreal, 1990. Abstract Book 2, Montreal, 1990. p-489.

- CHÉRON, M.; LE LOSTEE, Z.; FEGUEUX, S.; WELKER, V.; MORNET, P. & BOISIVON, A. Frequency of fluconazole (F) and itraconazole (I) resistance in HIV infected patients. Clin. Microbiol. Infect., 3 (suppl.2): 82, 1997
- CHRYSSANTHOU, E.; TORSSANDER, J. & PETRINI, B. Oral *Candida albicans* isolates with reduced susceptibility to fluconazole in swedish HIV-infected patients. Scand. J. Infect Dis., 27: 394-395, 1995.
- COLOMBO, A.L. Avaliação in vitro, por três diferentes métodos, da sensibilidade de leveduras a antifúngicos azólicos. São Paulo, 1994. [Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina].
- COLOMBO, A.L.; BARCHIESI, F.; McGOUGH, D.A. & RINALDI, M.G. Comparison of E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. J.Clin.Microbiol., 33(3): 535-540, 1995.
- COLOMBO, A.L.; BARCHIESI, F.; McGOUGH, D.A.; FOTHERGILL, A.W. & RINALDI, M.G. Evaluation of the E-test system versus a microtitre broth method for antifungal susceptibility testing of yeasts against fluconazole and itraconazole. J.Antimicrob.Chemother., 36: 93-100, 1995.
- COLOMBO, A.L.; BRANCHINI, M.L.; GEIGER, D.; SCHIMIDT, A.L.; PIGNATARI, A.C.C. & FISCHMAN, O. Gastrointestinal translocation as a possible source of candidemia in an AIDS patient. Rev.Inst.Med.trop.S.Paulo, 38(3): 197-200, 1996.
- CONLY, J.; RENNIE, R.; JONHSON, J.; FARAH, S. & HELLMAN, L. Disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida albicans*. J.Infect.Dis., 165: 761-4, 1992.
- CURY, A.E. & MICHE, M.P. Atividade de derivados imidazólicos contra espécies de *Candida* isoladas de pacientes com câncer. Rev. Microbiol., 20: 249-53, 1989.
- CURY, A.E.; MICHE, M.P. & MINAMI, P.S. Leveduras isoladas de pacientes com câncer: incidência e sensibilidade a antibióticos poliênicos. Rev. Microbiol., 20: 102-7, 1989.
- CUTSEM, J.V.; KURATA, H.; MATSUOKA, H.; MIKAMI, Y.; PFALLER, M.A.; SCALARONE, G.M. & RINALDI, M.G. Antifungal drug susceptibility testing. J.Med.Vet. Mycol., 32(Suppl.I): 267-276, 1994.
- DE WIT, S. GOOSSENS, H. & CLUMEK, N. Single-dose versus 7 days of fluconazole treatment for oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients: a prospective, randomized pilot-study. J.Infect.Dis., 168: 1332-3, 1993.
- DE WIT, S.; WEERTS, D.; GOOSSENS, H. & CLUMECK, N. Comparison fluconazol and ketoconazol for oropharyngeal candidiasis in AIDS. Lancet, i: 746-7, 1989.

- DENNING, D.W. Can we prevent azole resistance in fungi. Lancet, 346 (8973): 454-5, 1995a.
- DENNING, D.W. When to use fluconazole. Lancet, 345: 584, 1995b.
- DEWSNUP, D.H. & STEVENS, D.A. Efficacy of oral amphotericin B in AIDS patients with thrush clinically resistant to fluconazole. J.Med.Vet.Mycol., 32 (5): 389-393, 1994.
- DOI, M.; MIZUGUCHI, I.; HOMMA, M. & TANAKA, K. Electrophoretic karyotypes of isolates of *Candida albicans* from hospitalized patients. J.Med.Vet. Mycol., 32: 133-140, 1994.
- DROUHET, E.; DUPONT, B.; IMPROVISI, L.; VIVIANI, M.A. & TORTORANO, A.M. Disc agar diffusion and microplate automatized technics for in vitro evaluation of antifungal agents on yeasts and sporulated pathogenic fungi. *In*: Iwats,E & Vanden Bossche ed. In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents. N.Y., Elsevier Science Publishers B.V., 1986. p 31-49.
- DUPONT, B.; DENNING, D.W.; MARRIOTT, D.; SUGAR, A.; VIVIANI, M.A. & SIRISANTHANA, T. Mycoses in AIDS patients. J.Med.Vet.Mycol., 32 (Suppl 1): 65-77, 1994.
- EGGER, K.N. Analysis of fungal population structure using molecular techniques. *In*: George C, Cannoll & Donald T. Wicklow, coord. The fungal community: its organization and role in the ecosystem, N.Y., 2nd ed. Marcel Decker Inc. ed., 1992. p.193-208.
- ELDERE, J.V.; JOOSTEN, L.; VERHAEGHE, A. & SURMONT, I. Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method compared with E-test and semiautomated broth microdilution test. J.Clin.Microbiol., 34(4): 842-847, 1996.
- ESPINEL-INGROFF, A.; KERKERING, T.M.; GOLDSOHN, P.R. & SHADOMY, S. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. J.Clin.Microbiol., 29(6): 1089-1094, 1991.
- ESPINEL-INGROFF, A.; KISH Jr., C.W.; KERKERING, T.M.; FROMTLING, R.A.; BARTIZAL, K.; GALGANI, J.N.; VILLAREAL, K.; PFALLER, M.A.; GERARDEN, T.; RINALDI, M.G. & FOTHERGILL, A. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. J.Clin.Microbiol., 30(12): 3138-3145, 1992.
- ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M.; ERWIN, M.E. & JONES, R.N. Interlaboratory evaluation of E-test method for testing antifungal susceptibilities of pathogenic yeasts to five antifungal agents by using casitone agar and solidified RPMI 1640 medium with 2% glucose. J.Clin. Microbiol., 34(4): 848-852, 1996a.

- ESPINEL-INGROFF, A.; QUART, A.; STEELE-MOORE, L.; METCHEVA, I.; BUCK, G.A.; BRUZZESE, V.L. & REICH, D. Molecular karyotyping of multiple yeast species isolated from nine patients with AIDS during prolonged fluconazole therapy. J.Med.Vet.Mycol., 34: 111-116, 1996b.
- ESPINEL-INGROFF, A.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L. & MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V. Comparison of two alternative microdilution procedures with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro testing of fluconazole-resistant and-susceptible isolates of *Candida albicans*. J.Clin.Microbiol., 33 (12): 3154-3158, 1995.
- FIELD, E.A.; MILLNS, B.; PEARCE, P.K.; MARTIN, M.V.; PARKINSON, T. & HITCHCOCK, C.A. Fluconazole therapy of oropharyngeal candidiasis in a patient with multiple endocrine failure does not correlate with *Candida albicans* susceptibility to fluconazole in vitro. J. Med.Vet. Mycol., 34: 205-208, 1996.
- FONG, I.W.; BANNATYNE, R.M. & WONG, P. Lack in vitro resistance of *Candida albicans* to ketoconazole, itraconazole and clotrimazole in women treated for recurrent vaginal candidiasis. Genitourin. Med., 69: 44-46, 1993.
- GALLAGHER, P.J.; BENNETT, D.E.; HENMAN, M.C.; RUSSELL, R.J.; FLINT, S>R.; SHANLEY, D.B. & COLEMAN, D.C. Reduced azole susceptibility of oral isolates of *Candida albicans* from HIV-positive patients and a derivative exhibiting colony morphology variation. J. Gen. Microbiol., 138 (9): 1901-1911, 1992.
- GALGANI, J.N. & STEVENS, D.A. Antimicrobial susceptibility testing of yeasts: a turbidimetric technique independent of inoculum size. Antimicrobiol. Agents Chemother., 10: 721-726, 1976.
- GALGANI, J.N. & STEVENS, D.A. Turbidimetric studies of growth inhibition of yeasts with three drugs: inquiry into inoculum-dependent susceptibility testing, time of onset of drug effect, and implications for current and newer methods. Antimicrob.Agents Chemother., 13(2): 249-254, 1978.
- GARCIA-HERMOSO, D.; DROMER, F.; IMPROVISI, L.; PROVOST, F. & DUPONT, B. Fluconazole concentrations in saliva from AIDS patients with oropharyngeal Candidosis refractory to treatment with fluconazole. Antimicrob.Agents Chemother., 39(3): 656-660, 1995.
- GHANNOUM, M.A.; REX, J.H. & GALGANI, J.N. Susceptibility testing of fungi: current status of correlation of *in vitro* data with clinical outcome. J. Clin.Microbiol., 34(3): 489-495, 1996.
- GIL, C. PÉREZ DIAS, R. & NOMBELA, C. Inibitory and morphological effects of several antifungal agents on three types of *Candida albicans* morphological mutants. J.Med.Vet.Mycol., 32: 151-162, 1994.

- GLATT, A.E.; CHIRGWIN, K. & LANDESMANN, S.H. Treatment of infections associated with human immunodeficiency virus. N.Engl.J.Med., 318: 1439-48, 1988.
- GOFF, D.A.; KOLETAR, S.L.; BUESCHING, W.J.; BARNISHAN, J. & FASS, R.J. Isolation of fluconazole-resistant *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-negative patients never treated with azoles. Clin.Infect.Dis., 20: 77-83, 1995.
- GREEN, L.; PETERSEN, B.; STEIMEL, L.; HAEBER, P. & CURRENT, W. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. J.Clin.Microbiol., 32 (4): 1088-1091, 1994.
- GUENNEC, R.L.; REYNES, J.; MALLIÉ, M.; PUJOL, C.; JANBON, F. & BASTIDE, J.M. Fluconazole-and itraconazole-resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients: multilocus enzyme electrophoresis analysis and antifungal susceptibilities. J.Clin.Microbiol., 33(10): 2732-2737, 1995.
- HASENCLEVER, H.F. & MITCHELL, W.O. Antigenic studies of *Candida*. I. Observations of two antigenic groups in *Candida albicans*. J.Bacteriol., 82: 570-3, 1961.
- HAZEN, K.C., CHERY, M.P. & Han, Y. Potential use of bact-alert automated blood culture system for antifungal susceptibility testing. J.Clin.Microbiol., 32(3): 848-850, 1994.
- HELLYAR, A.G. The frequency distribution and consistency of assimilation biotypes of *Candida albicans*. J.Hyg.Caml., 96: 89-93, 1986.
- HOLMBERG, K. Laboratory monitoring of systemic antifungal therapy. Diagn.Ther.Syst.Fungal Infect., 16:179-1995, 1989.
- HOLT, R.J. & AZMI, A. Miconazole-resistant *Candida*. Lancet i: 50-51, 1978.
- HORSBURGH, C.R. & KIRKPATRICK, C.H. Long-term therapy of chronic mucocutaneous candidiasis with ketoconazole: experience with twenty-one patients. Am.J.Med., 74 (Suppl. 1B): 23-29, 1983.
- HUGHES, C.E.; BENNETT, R.L.; TUNA, I.C. & BEGGS, W.H. Activities of fluconazole (UK 49.858) and ketoconazole against ketoconazole-susceptible and-resistant *Candida albicans*. Antimicrob. Agents Chemother., 32(2): 209-212, 1988.
- HUNDT, W. & HOFMANN, H. *In vitro* susceptibility and sterol biosynthesis of *Candida albicans* strains after long term treatment with azoles in HIV-infected patients. Infection, 22(2):124-130, 1994
- HUNTER, P.R. A critical review of typing methods for *Candida albicans* and their applications. Crit. Reviews Microbiol., 17(6): 417-434, 1991a.

- HUNTER, P.R. The sub-specific numerical analysis of *Candida albicans*. J.Med.Vet. Mycol., 29: 105-115, 1991b.
- HUNTER, P.R. & FRASER, C.A.M. Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol., 27(10): 2156-2160, 1989.
- HUNTER, P.R.; FRASER, C.A.M & MACKENZIE, D.W.R. Morphotype markers of virulence in human candidal infections. J.Med.Microbiol., 28: 85-91, 1989.
- HUNTER, P.R. & GASTON, M.A. - Numerical index of the discriminatory ability of typing systems and an application of Simpson's index of diversity. J.Clin.Microbiol., 26(11): 2465-2466, 1988.
- IMBERT, B.C.; VALENTIM, A.; REYNES, J.; MALLIE, M. & BASTIDE, J.M. Relationship between fluconazole sensivity of *Candida albicans* isolates from HIV positive patients and serotype, adherence and CD4 + lymphocyte count. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 13(9): 711-6, 1994.
- INSTITUTO PASTEUR . Manual Cours de Mycologie Medicale, Paris, França, 1993. [Súmula de aulas práticas - mimiografado].
- JAKAB, K.; KELEMEN, E.; PRINZ, G. & TÖRÖK, I. Amphotericin-resistant invasive hepatosplenic candidiasis controlled by fluconazole. Lancet, 335:473-474, 1990.
- JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W.; LUDER, J.; PORTER, S.R. & SCULLY, C. Emergence of azole resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. J.Antimicrob. Chemother., 35 (1): 103-114, 1995.
- KLEIN, R.S.; HARRIS, C.A.; SMALL, C.B.; MOLL, B.; LESSER, M. & FRIEDLAND, G.H. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of acquired immunodeficiency syndrome. N.Engl. J.Med., 311: 354-8, 1984.
- KOBAYASHI, H.; GIUMMELLY, P.; TAKAHASHI, S.; ISHIDA, M.; SATO, J. TAKAKU, M.; NISHIDATE, Y.; SHIBATA, N.; OKAWA, Y. & SUZUKI, S. *Candida albicans* serotype a strain grow in yeast extract-added sabouraud liquid medium at pH 2.0. Elaborating mannans without β -1,2 linkage and phosphate group. Biochem.Biophys. Res. Commun., 175(3): 1003-1009, 1991.
- KORTING, H.C. & DORSCH, R. On the correlation of byotype and antimicrobial susceptibility in *Candida albicans*. Mycosen, 30(1): 512-519, 1987
- KORTING, H.C.; OLLERT, M.; GEORGII, A. & FRÖSCHL, M. *In vitro* susceptibilities and biotypes of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. J.Clin.Microbiol., 26(12): 2626-2631, 1988.

- KROGH, P.; HOLMSTRUP, P.; THORN, J.J.; VEDTOFTE, P. & PINDBORG, J.J. Yeast species and biotypes associated with oral leukoplakias and lichens planus. Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol., 63: 48-54, 1987.
- KWON-CHUNG, K.J.; RIGGSBY, W.S.; UPHOFF, R.A.; HICKS, J.B.; WHELAN, W.L.; REISS, E.; MAGEE, B.B. & WICKES, B.L. Genetic differences between type I and type II *Candida stellatoidea*. Infect.Immun., 57(2): 527-532, 1989.
- KWON-CHUNG, K.J.; WICKES, B.L. & MERZ, W.G. Association of electrophoretic karyotype of *Candida stellatoidea* with virulence for mice. Infect.Immun., 56(7): 1814-1819, 1988.
- LACASSIN, F.; DAMOND, F.; HOCHILLON, C.; LONGUET, P.; LEBRAS, J.; VILDE, J.L. & LEPORT, C. Response to fluconazole by 23 patients with human immunodeficiency virus infection and oral candidiasis: pharmacological and mycological factors. Antimicrob. Agents Chemother., 40(8): 1961-1963, 1996.
- LACAZ, C.da S.; PORTO, E. & MARTINS, J.E.C. Micologia médica: Actinomicetos, fungos e algas de interesse médico, Sarvier Ed., 8º ed., São Paulo, 1991.
- LAHTI, C. J. Pulsed field gel electrophoresis in the clinical microbiology laboratory. J.Clin.Lab.Anal., 10: 326-330, 1996.
- LEHMANN, P.F.; KEMKER, B.J.; HSIAO, C.B. & DEV, S. Isoenzyme biotypes of *Candida* species. J.Clin.Microbiol., 27(11): 2514-2521, 1989.
- LOMBARDI, G.; GRAMEGNA, G.; CAVANNA, C.; POMA, G.; MARANGONI, E. & MICHELONE, G. Itraconazole vs amphotericin B: in vitro comparative evaluation of the minimal inhibitory concentration (MIC) against clinically isolated yeasts. Mycopathologia, 106: 31-34, 1989.
- LOREN, L.; DRETHER, R.H.; CONTEAS, C.N.; TUAZON, C.; KOSTER, F.M.; SALTTLER, F.; SQUIRES, K. & ISLAM, M.Z. Fluconazole compared with ketoconazole for the treatment of *Candida* esophagitis in AIDS. Ann.Intern.Med., 117(8):655-660, 1992.
- LOTT, J.T., BOIRON, P. & REISS, E. An electrophoretic karyotype for *Candida albicans* reveals large chromosome multiples. Mol. Gen. Genet., 209: 170-174, 1987.
- LUPETTI, A.; GUZZI, G.; PALADINI, A.; SWART, K.; CAMPA, M. & SENESI, S. Molecular typing of *Candida albicans* in oral candidiasis karyotype epidemiology with human immunodeficiency virus-seropositive patients in comparison with that with healthy carriers. J.Clin.Microbiol., 33(5): 1238-1242, 1995.
- LYNCH, M.E.; SOBEL, J.D. & FIDEL Jr., P.L. Role of antifungal drug resistance in the pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. J.Med.Vet.Mycol., 34: 337-339, 1996.

- MACCREIGHT, M.C. & WARNOCK, D.W. Enhanced differentiation of isolates of *Candida albicans* using a modified resistogram method. Mykosen, 25(11): 589-598, 1982.
- MACCREIGHT, M.C.; WARNOCK, D.W. & WATKINSON, A.C. Prevalence of different strains of *Candida albicans* in patients with denture-induced stomatitis. Sabouraudia, 22: 83-5, 1984.
- MACDONALD, F. & ODDS, F.C. Virulence for mice of a proteinase secretaing strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. J.Gen.Microbiol., 129: 431-438, 1983.
- MAENZA, J.R.; KERULY, J.C.; MOORE, R.D.; CHAISSON, R.E.; MERZ, R.D. & GALLANT, J.E. Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus - infected patients. J. Infect. Dis., 173 (1): 219-225, 1996.
- MAENZA, J.R.; MERZ, W.G.; ROMAGNOLI, M.J.; KERULY, J.C.; MOORE, R.D. & GALLANT, J.E. Infection due to fluconazole-resistant *Candida* in patients with AIDS: prevalence and microbiology. Clin.Infect.Dis., 24: 28-34, 1997.
- MAFFEI, C.; MANSO, E.; BIAVASCO, F.; VARALDO, P.E.; MORO, M. L. Typing and nosocomial candidiasis. J.Clin.Microbiol., 28: 1086-7, 1990.
- MAGEE, P.T.; BOWDIN, L. & STAUDINGER, J. Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. J.Clin.Microbiol., 30(10): 2674-2679, 1992.
- MAHROUS, M.; LOTT, T.J.; MEYER, S.A.; SAWANT, A.D. & AHEARN, D.G. Electrophoretic karyotyping of typical and atypical *Candida albicans*. J.Clin.Microbiol., 28(5): 876-881, 1990.
- MANAFI, M.; KNEIFEL, W. & BASCOMB, S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiol.Rev., 55(3): 335-348, 1991.
- MARUMO, K. & AOKI, Y. Discriminant analysis of cellular fatty acids of *Candida* species, *Torulopsis glabrata*, and *Cryptococcus neoformans* determined by gas-liquid chromatography. J.Clin.Microbiol., 28(7): 1509-1513, 1990.
- MATHABA, L.T.; DAVIES, G. & WARMINGTON, J.R. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. J.Med.Microbiol., 42(5): 372-9, 1995.
- McCULLOUGH, M, & HUME, S. A longitudinal study of the change in resistance patterns and genetic relationship of oral *Candida albicans* from HIV-infected patients. J.Med.Vet.Mycol., 33(1):33-7, 1995.

- McCULLOUGH, M.; ROSS, B. & READE, P. Characterization of genetically distinct subgroup of *Candida albicans* strains isolated from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. J.Clin.Microbiol., 33(3): 696-700, 1995.
- MEYER, S.A.; AHEARN, D.G. & YARROW, D. Genus 4. *Candida* Berkhout. In: N.J.W.KREGER-van RIJ ed. The yeasts: a taxonomic study., 2nd ed., Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1984. p.585-844.
- MELNICK, S.; ENGEL, D. & TRUELOVE, E.M. Oral disease and HIV infection. In: Fourth Conference on AIDS, Stockholm, 1988. Abstract book 2. Stockholm, 1988. p. 316.
- MERZ, W.G.; CONELLY, C. & HIETER, P. Variation of electrophoretic kariotypes among clinical isolates of *Candida albicans*. J.Clin.Microbiol., 26(5):842-845, 1988.
- METZER, S.; JAGER, H. & HOFMANN, H. Fluconazole sensitivity of *Candida* strains *in vitro* in the microdilution test and agar diffusion test. Mycoses, 37 (Suppl.I): 64-70, 1994.
- MILLON, L.; MANTEAUX, A.; REBOUX, G.; BROBACHEFF, C.; MONOD, M.; BARALE, T. & MICHEL-BRIAND, Y. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. J.Clin.Microbiol., 32(4): 115-118, 1994.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. PROGRAMA NACIONAL CONTROLE DST/AIDS. Boletim Epidemiológico AIDS, 4, setembro a novembro, Brasília, 1996.
- MOCROFT, A.J.; JOHNSON, M.A.; SABIN, C.A.; LIPMAN, M.; EFORD, J.; EMERY, V.; MORCINEK, J.; YOULE, M.; JANOSSY, G.; LEE, C.A. and Royal Free/Chelsea and Westminster Hospitals Collaborative Group. Staging system for clinical AIDS patients. Lancet, 346 (8966): 12-7, 1995.
- MONOD, M.; PORCHET, S.; BAUDRAZ-ROSSELET, F. & FRENK, E. The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis of their chromosomes. J. Med. Microbiol., 32: 123-129, 1990.
- MORACE, G.; ARCHIBUSACCI, C.; SESTITO, M. & POLONELLI, L. Strain differentiation of pathogenic yeasts by the killer system. Mycopathologia, 84: 81-85, 1984.
- MORAN, G.P.; SULLIVAN, D.J.; HENMAN, M.C.; McCREARY, C.E.; HARRINGTON, B.J.; SHANLEY, D.B. & COLEMAN, D.C. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. Antimicrob.Agents Chemother., 41(3): 617-623, 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS).
Antifungal susceptibility testing: committee report M20-CR, Villanova, PA., 1985.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS).
Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. Document M27-P, Villanova, PA., 1992.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS).
Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. Document M27-T, Villanova, PA., 1995.

NEWMAN, S.L.; FLANIGAN, T.P.; FISHER, A.; RINALDI, M.G.; STEIN, M. & VIGILANTE.K. Clinically significant mucosal candidiasis resistant to fluconazole treatment in patients with AIDS. Clin.Infect.Dis. 19(4): 684-6, 1994.

NOLTE, F.S.; PARKINSON, T.; FALCONER, D.J.; DIX, S.; WILLIAMS , j.; GILMORE, C.; GELLER, R. & WINGARD, J.R. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. Antimicrob. Agents Chemother., 44(1): 196-199, 1997.

ODDS, F.C. Antifungal susceptibility testing of *Candida* spp by relative growth measurement at single concentrations of antifungal agents. Antimicrob.Agents Chemother., 36(8): 1727-1737, 1992.

ODDS, F.C. *Candida* and candidosis: a review and bibliography, 2^a ed. Londres, Ballière Tindall ed., 1988.

ODDS, F.C. Quantitative microculture system with standardized inocula for strain typing, susceptibility testing, and other physiologic measurements with *Candida albicans* and other yeasts. J.Clin. Microbiol., 29(12): 2735-2740, 1991.

ODDS, F.C. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. J.Antimicrob. Chemother., 31 (4): 463-471, 1993.

ODDS, F.C. & ABBOTT, A.B. A simple method for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. Sabouraudia, 18: 301-18, 1980.

ODDS, F.C.; ABBOTT, A.B.; PYE, G. & TROKE, P.F. Improved method for estimation of azole antifungal inhibitory concentrations against *Candida* species, based on azole/antibiotic interactions. J.Med.Vet.Mycol., 24: 305-311, 1986.

ODDS, F.C.; ABBOTT, A.B.; STILLER, R.L.; SCHOLER, H.J.; POLACK, A. & STEVENS, D.A. Analysis of *Candida albicans* phenotypes from different geographical and anatomical sources. J.Clin.Microbiol., 18(4): 849-857, 1983.

- ODDS, F.C.; BRAUNER, D.L.; STAUDINGER, J.; MAGEE, P.T. & SOLL, D.R. Typing of *Candida albicans* strains. J.Med.Vet.Mycol., 30 (Supl 1): 87-94, 1992.
- ODDS, F.C.; DAMS, G.; JUST, G. & LEWI, P. Susceptibilities of *Candida* spp to antifungal agents visualized by two-dimensional scatterplots of relative growth. Antimicrob.Agents Chemother., 40(3): 588-594, 1996.
- ODDS, F.C.; VRANCKX, L. & WOESTENBORGH, F. Antifungal susceptibility testing of yeasts: evaluation of technical variables for test automation. Antimicrob. Agents Chemother., 39(9): 2051-2060, 1995.
- OLDFIELD, E.C. Increasing resistance of *Candida albicans* to fluconazole. Am.J.Gastroenterol. 90(7): 1182, 1995.
- OLIVER, A.J. & READE, P.C. Morphotypes of oral isolates of *Candida albicans* from patients infected with the human immunodeficiency virus. J.Med.Vet.Mycol., 31: 289-297, 1993.
- PATTERSON, T.F.; KIRKPATRICK, W.R.; REVANKAR, S.Y.G.; McATEE, R.K.; FOTHERGILL, A.W.; McCARTHY, D.I. & RINALDI, M.G. Comparative evaluation of macrodilution and chromogenic agar screening for determining fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. J.Clin.Microbiol., 34(12): 3237-3239, 1996.
- PAULA, C.R.; SAMPAIO, M.C.C.; BIRMAN, E.G.; SIQUEIRA, A.M. Oral yeasts in patients with cancer of the mouth, before and during radiotherapy. Mycopathologia, 112: 119-24, 1990.
- PFALLER, M.A. Epidemiology of fungal infections: current perspectives and future directions. Clin.Infect.Dis., 20: 1525, 1995.
- PFALLER, M.A. Epidemiological typing methods for mycoses. Clin. Infect.Dis., 14: S4-S10, 1992.
- PFALLER, M.A.; BALE, M.; BUSCHELMAN, B.; LANCASTER, M.; ESPINEL-INGROFF, A.; REX, J.H.; RINALDI, M.G.; COOPER, C.R. & MCGINNIS, M.R. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole and flucytosine. J.Clin.Microbiol., 33(5): 1104-1107, 1995.
- PFALLER, M.A. & BARRY, A.L. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. J.Clin.Microbiol., 32(8): 1992-1996, 1994.
- PFALLER, M.A.; BURMEISTER, L.; BARTLETT, M.S. & RINALDI, M.G. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. J.Clin.Microbiol., 26(8): 1437-1441, 1988.

- PFALLER, M.A.; RHINE-CHALBERG, J.; REDDING, S.W.; SMITH, J.; FARINACCI, G.; FOTHERGIL, A.W. & RINALDI, M.G. Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. J.Clin.Microbiol., 32(1): 59-64, 1994.
- PFALLER, M.A.; RINALDI, M.G.; GALGANI, J.N.; BARTLETT, M.S.; BODY, B.A.; ESPINEL-INGROFF, A.; FROMTLING, R.A.; HALL, G.S.; HUGHES, C.E.; ODDS, F.C. & SUGAR, A.M. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. Antimicrob.Agents Chemother., 34: 1648-1654, 1990.
- PHELPS, M.; AYLIFFE, G.A.J. & BABB, J.R. An outbreak of candidiasis in a special care baby unit: the use of resistogram typing method. J.Hosp.Infect., 7: 13-20, 1986.
- PHONGPAICHIT, S.; MACKENZIE, D.W.R. & FRASER, C. Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. Epidem.Infect., 99: 421-428, 1987.
- PINDBORG, J.J. Classification of oral lesions associated HIV infection. Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol., 67: 292-5, 1989.
- PLA, J.; GIL, C.; MONTEOLIVA, F.; NAVARRO-GARCÍA, F.; SÁNCHEZ, M. & NOMBELA, C. Understanding *Candida albicans* at the molecular level. Yeast, 12: 1677-1702, 1996.
- POLONELLI, L.; CONTI, S.; GERLONI, M.; MAGLIANI, W. & CHEZZI, C. Interfaces of the yeast killer phenomenon. Crit.Rev.Microbiol., 18(1): 47-87, 1991.
- PORTILLA, J.; SANCHEZ-PAYA, J.; BOIX, V.; MUNOZ, C.; TAMARATI, J.; MERINO, J. & PEREZ-MATEO, M. The usefulness of different markers in the diagnosis of advance HIV infection. Med.Clin.Barç., 103(19): 725-9, 1994.
- POWDERLY, W.G. Resistant candidiasis. AIDS Res.Hum.Retroviruses, 10(8): 925-9, 1994.
- POWDERLY, W.G.; KOBAYASHI, G.S.; HERZIG, G.P. & MEDOFF, G. Amphotericin B-resistant yeast infection in severely immunocompromised patients. Am. J. Med., 84: 826-832, 1988.
- POWDERLY, W.G.; ROBINSON, K. & KEATH, E.J. Molecular typing of *Candida albicans* isolated from oral lesions of HIV-infected individuals. AIDS, 6: 81-84, 1992.
- PUJOL, C.; REYNES, J.; RENAUD, F.; RAYMOND, M.; TIBAYRANC, M.; AYALA, F.J.; JANBON, F.; MALLIÉ, M. & BASTIDE, J.M. The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 9456-9459, 1993.

- QUIRINO, M.R.S. Estudo clínico e microbiota fúngica da cavidade bucal de diabéticos controlados e não controlados. Taubaté, 1990. [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia da Universidade de Taubaté].
- RABENECK, L. & LAINE, L. Esophageal candidiasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. A decision analysis to assess cost-effectiveness of alternative management strategies. Arch.Intern.Med., 154(23): 2705-10, 1994.
- RADETSKY, M.; WHEELER, R.C.; ROE, M.H. & TODD, J.K. Microtiter broth dilution method for yeast susceptibility testing with validation by clinical outcome. J.Clin.Microbiol., 24(4): 600-606, 1986.
- REDDING, S.; SMITH, J.; FARINACCI, G.; RINALDI, M.; FOTHERGILL, A.; RHINE-CHALBERG, J. & PFALLER, M. Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: documentation by *in vitro* susceptibility testing and DNA subtype analysis. Clin. Infect.Dis., 18: 240-2, 1994.
- REMOLOD, H.; FASOLD, H. & STAIB, F. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. Biochim.Biophys.Acta, 167: 399-406, 1968.
- REX, J.H.; PFALLER, M.A.; GALGANI, J.N.; BARTLETT, M.S.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M.A.; LANCASTER, M.; ODDS, F.C.; RINALDI, M.G.; WALSH, T.J. & BARRY, A.L. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Clin.Infect.Dis., 24: 235-47, 1997.
- REX, J.H.; PFALLER, M.A.; LANCASTER, M.; ODDS, F.C.; BOLMSTROM, A. & RINALDI, M.G. Quality control guidelines for national committee for clinical laboratory standards-recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. J.Clin.Microbiol., 34(4): 816-817, 1996.
- REX, J.H.; PFALLER, M.A.; RINALDI, M.G.; POLAK, A. & GALGANI, J.N. Antifungal susceptibility testing. Clin.Microbiol.Rev., 6(4): 367-381, 1993.
- REX, J.H.; RINALDI, M.G. & PFALLER, M.A. Resistance of *Candida* Species to fluconazole. Antimicrobiol. Agents Chemother., 39(1): 1-8, 1995.
- RICCI, T.A.; MORAES, R.A.; CARVALHO, R.X.; TOSCANO, E.; BRANCO, F.C.; MELHEM, M.S.C.; GIUDICE, M.C. & MENDES-GIANNINI, M.J. Diferenças entre cepas de *Candida albicans* de pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida e de indivíduos aparentemente normais. Rev.Microbiol., 22: 84, 1991.
- RINALDI, M.G. Laboratory evaluation of antifungal agents: a brief overview. Clin.Infect.Dis., 14: 130-3, 1992.

- RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V.; DRONDA, F.; LAGUNA, F.; CHAVES, F. & VALENCIA, E. Correlation of in vitro susceptibility test results with clinical response: a study of azoles therapy in AIDS patients. J.Antimicrob.Chemother., 35: 793-804, 1995.
- ROMÁN, M.C. & SICILIA, M.J.L. Preliminary investigation of *Candida albicans* biovars. J.Clin.Microbiol., 18(2): 430-431, 1983.
- RUHNKE, M.; EIGLER, A.; ENGELMANN, E.; GEISELER, B. & TRAUTMANN, M. Correlation between antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from patients with HIV infection and clinical results after treatment with fluconazole. Infection, 22(2):132-136, 1994a.
- RUHNKE, M.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.; ENGELMANN, E. & TRAUTMANN, M. Comparative evaluation of three antifungal susceptibility test methods for *Candida albicans* isolates and correlation with response to fluconazole therapy. J.Clin.Microbiol., 34(12): 3208-3211, 1996.
- RUHNKE, M.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A. & TRAUTMANN, M. *In vitro* activities of voriconazole (UK- 109-496) against fluconazole susceptible and-resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients with human immunodeficiency virus infection. Antimicrob. Agents Chemother., 41(3): 575-577, 1997.
- RUHNKE, M.; TENNAGEN, I. & ENGELMANN, E. Correlation between resistance testing and typing of *Candida albicans*-isolates from AIDS patients and chronic recurrent oral candidiasis. Mycoses, 60: 3, 1994b.
- SAMARANAYAKE, L.P. & MACFARLANE, T.W., ed. Oral Candidosis, Cambridge, UK, Butterworth & Co. Publ., 1990.
- SAMARANAYAKE, L.P. & SCULLTY, C. Oral candidosis in HIV infection. Lancet, ii: 1941-1942, 1989.
- SANGEORZAN, J.A.; BRADLEY, S.F.; XIAOGANG HE; ZARINS, L.T.; RIDENOUR, G.L.; TIBALLI, R.N.; KAUFFMAN, C.A. & MICHIGAN, A. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. Am. J. Med., 97: 339-346, 1994.
- SANTOS, B.; BECK, E.J. & PEIXOTO, M.F. Survival and medical intervention in southern Brazilian AIDS patients. Int.J.STD AIDS, 5(4): 279-83, 1994.
- SCHERER, S. & STEVENS, D.A. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. J.Clin.Microbiol., 25(4): 675-679, 1987.

- SCHMID, J.; ODDS, F.C.; WISELKA, M.J.; NICHOLSON, K.G. & SOLL, D.R. Genetic similarity and maintenance of *Candida albicans* strains from a group of AIDS patients, demonstrated by DNA fingerprinting. J.Clin.Microbiol., 30: 935-941, 1992.
- SCHMID, J.; VOSS, E. & SOLL, D.R. Computer-assisted methods for assessing strain relatedness in *Candida albicans* by fingerprinting with the moderately repetitive sequence Ca3. J.Clin.Microbiol., 28: 1236-1243, 1990.
- SHADOMY, S. & PFALLER, M.A. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and quantitation in body fluids. *In*: Balows, A.; Hausler, Jr. W.J.; Herrmann, K.L.; Isemer, H.D. & Shadomy, H.J., ed. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. Washington D.C, ASM Press, 1992. p.1173-1183.
- SHEEHAN, D.J.; ESPINEL-INGROFF, A.; MOORE, L.S. & WEBB, C.D. Antifungal susceptibility testing of yeasts: a brief overview. Clin.Infect. Dis., 17 (Supl.2): S494-S500, 1993.
- SHIMIZU, M.T. Enzimas histolíticas produzidas por leveduras do gênero *Candida*. Rev.Microbiol., 19: 442-5, 1988.
- SHIMIZU, M.T. Produção de hialuronidase, condroitin-sulfatase, proteínas e fosfolipase, por amostras de *Candida albicans* e sua correlação com virulência para camundongos inoculados experimentalmente. São José dos Campos, 1990. 105p. Tese de Livre-Docência, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP.
- SHIMIZU, M.T. Proteinase como fator de virulência de *Candida albicans*. Rev.Microbiol., 20 (Supl. 1): 337, 1989.
- SILVEIRA, F.R.X.; BIRMAN, E.G.; PAULA, C.R. & BATISTA, J.M. Proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from oral mucosa of healthy carriers (smokers and non smokers). Rev.Iber.Micol., 10: 105-8, 1993.
- SNELL, R.G.; HERMANS, I.F.; WILKINS, R.J. & CORNER, B.E. Chromosomal variation in *Candida albicans*. Nucleic Acids Res., 15: 3625, 1987.
- SOARES, M.M.S.R. & CURY, A.E. Atividade de alguns antimicóticos contra fungos isolados de diferentes classes de pacientes. Rev.Bras. An.Clin., 27(1): 3-11, 1995.
- SOLL, D.R. High-frequency switching in *Candida albicans*. Clin.Microbiol.Rev., 5(2): 183-203, 1992.
- SOLL, D.R.; LANGTIMM, C.J.; McDOWELL, J.; HICKS, J. & GALASK, R. High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. J.Clin.Microbiol., 25: 1611-1622, 1987.

- SOUZA, E.M.B.; CURY, A.E.; PIGNATARI, A.C.C. & CAMARGO Z.P. Chromosomal DNA profile and susceptibility to amphotericin B of *Candida albicans* clones. Rev.Microbiol., 23(3): 159-162, 1992.
- SOUZA, E.M.B.; PAULA, C.R.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B. & CURY, A.E. Aspectos morfo-fisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos de amostras de *Candida albicans*, sorotipos A e B, isoladas em São Paulo, Brasil. Rev. Microbiol., 21: 247-53, 1990.
- STEVENS, D.A.; ODDS, F.C. & SCHERER, S. Application of DNA typing methods to *Candida albicans* epidemiology and correlations with phenotype. Rev.Infect.Dis., 12(2): 258-266, 1990.
- SULLIVAN, D.J.; WESTERNENG, T.J.; HAYNES, K.A.; BENNETT, D.E. & COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology, 141(7): 1507-21, 1995.
- ST-GERMAIN, G.; DION, C.; ESPINEL-INGROFF, A.; RATELLE, J. & REPENTIGNY, L. Ketoconazole and itraconazole susceptibility of *Candida albicans* isolate from patients infected with HIV. J.Antimicrob. Chemother., 36(1): 109-118, 1995.
- TAVITIAN, A.; RAUFMAN, J.P. & ROSENTHAL, L.E. Oral candidiasis as a marker for esophageal candidiasis in the acquired immunodeficient syndrome. Ann.Int.Med., 104: 54-5, 1986a.
- TAVITIAN, A.; RAUFMAN, J.P.; ROSENTHAL, L.E.; WEBER, J.; WEBBER, C.A. & DINCISOY, H.P. Ketoconazole-resistant *Candida* esophagitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Gastroenterology, 90: 443-5, 1986b.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H. & SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J.Clin.Microbiol., 33(9): 2233-2239, 1995.
- TIBALLI, R.N.; HE, X.; ZARINS, L.T.; REVANKAR, S.G.; KAUFFMAN, C.A. Use of a colorimetric system for yeast susceptibility testing. J.Clin.Microbiol., 33(4): 915-7, 1995.
- TSANG, P.C.; SAMARANAYAKE, L.P.; PHILIPSEN, H.P.; McCULLOUGH, M. REICHART, P.A.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.; SCULLY, C. & PORTER, S.R. Biotypes of oral *Candida albicans* isolates in human immunodeficiency virus-infected patients from diverse geographic locations. J.Oral Pathol. Med., 24(1): 32 1985

- VAZQUEZ, J.A.; BECKLEY, A.; SOBEL, J.D. & ZERVOS, M.J. Comparison of restriction enzyme analysis and pulsed-field gradient gel electrophoresis as typing systems for *Candida albicans*. J.Clin.Microbiol., 29(5): 962-967, 1991.
- VENKATESWARLU, K.; DENNING, D.W.; MANNING, N.J. & KELLY, S.L. Resistance to fluconazole in *Candida albicans* from AIDS patients correlated with reduced intracellular accumulation of drug. FEMS Microbiol.Lett., 131(3): 337-41, 1995.
- WANGER, A.; MILLS, K.; NELSON, P.W. & REX, J.H. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. Antimicrob.Agents Chemother., 39(11): 2520-2522, 1995.
- WARNOCK, D.W.; JOHNSON, E.M.; RICHARDSON, M.D. & VICKERS, C.F.H. Modified response to ketoconazole of *Candida albicans* from a treatment failure. Lancet, 19: 642-643, 1983.
- WARNOCK, D.W.; SPELLER, D.C.E.; DAY, J.K. & FARRELL, A.J. Resistogram method for differentiation of strains of *Candida albicans*. J.Appl.Bacteriol., 46: 571-578, 1979.
- WHELAN, W.L.; KIRSCH, D.R.; KWON-CHUNG, K.J.; WAHL, S.M. & SMITH, P.D. *Candida albicans* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: absence of a novel or hypervirulent strain. J.Infect.Dis., 162: 513-518, 1990.
- WHITE, A. & GOETZ, M.B. Azole-resistant *Candida albicans*: report of two cases of resistance to fluconazole and review. Clin.Infect.Dis., 19: 687-92, 1994.
- WILCOX, C.M. & KAROWE, M.W. Esophageal infections: etiology, diagnosis, and management. Gastroenterologia, 2(3): 188-206, 1994.
- WILLIAMSON, M.I.; SAMARANAYAKE, L.P. & MACFARLANE, T.W. A new simple method for biotyping *Candida albicans*. Microbios, 51: 159-68, 1987.
- WILLIAMSON, M.I.; SAMARANAYAKE, L.P. & MACFARLANE, T.W. Biotypes of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates. J.Med.Vet. Mycol., 24: 81-4, 1986b.
- WILLIAMSON, M.I.; SAMARANAYAKE, L.P. & MacFARLANE, T.W. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. J.Med.Vet.Mycol., 24: 415-7, 1986a.
- WINGARD, J.R. infections due to resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiving chemotherapy. Clin.Infect.Dis., 19 (Suppl. I): 49-53, 1994.