UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da variabilidade fenotípica e molecular de isolados
de *Candida albicans* após período de armazenamento
das culturas e em duas ocasiões de coleta**

KÁTIA LESTON BACELO

Ribeirão Preto-SP

2008

RESUMO

BACELO, K. L. **Avaliação da variabilidade fenotípica e molecular de isolados de *Candida albicans* após período de armazenamento das culturas e em duas ocasiões de coleta.** 2008. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O gênero *Candida* é responsável pela maioria das infecções fúngicas nosocomiais. A identificação do provável foco de origem é de extrema importância para elucidar a epidemiologia desse tipo de infecção e nesse sentido, a utilização de métodos de tipagem, que avaliam características fenotípicas e moleculares dos isolados, é essencial. Assim, o objetivo desse estudo foi tipar isolados de *C. albicans*, antes e após armazenamento e em diferentes ocasiões de coleta, a fim de verificar a manutenção dos biotipos apresentados, e o poder de discriminação dos métodos utilizados. Foi avaliada a microbiota leveduriforme da saliva de 73 estudantes universitários (tempo 0) sendo que após 180 dias (tempo 180) foi realizada nova coleta de saliva daqueles que apresentaram isolamento de *C. albicans* na primeira coleta. Os isolados foram analisados por ocasião das duas coletas, quanto à produção de exoenzimas fosfolipase e proteinase, pela morfologia das colônias, pelo perfil de suscetibilidade frente à anfotericina B, fluconazol e itraconazol e pela tipagem molecular por RAPD. As leveduras, após isoladas, foram armazenadas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) e água destilada esterilizada. Após 180 dias, foram realizadas, novamente, as provas de tipagem. Todos isolados de *C. albicans* foram produtores de fosfolipase, nas duas coletas, embora tenha havido oscilação de atividade enzimática entre moderada e alta, no período. O enzimatipo prevalente nos tempos 0 e 180 foi, respectivamente, 22 e 32. Com relação à proteinase, 100% das leveduras apresentaram atividade moderada da enzima no tempo 0. No tempo 180 esse percentual foi de 85%, sendo que os demais não apresentaram atividade dessa enzima. Após armazenamento em ASD e água destilada, foi detectada alteração da atividade de ambas enzimas e conseqüente mudança de enzimatipos, em 40 e 30% dos isolados, respectivamente. Foram identificados 8 morfotipos diferentes de *C. albicans* no tempo 0 e apenas 50% foi mantido no tempo 180. O morfotipo mais comum foi 000-0. Após armazenamento, a maioria dos isolados apresentou alteração no morfotipo. Todos isolados mostraram-se sensíveis aos antifúngicos analisados nos tempos 0 e 180, denotando apenas um antifungotipo, o 111. Somente um isolado após estocagem em ASD, teve mudança de perfil de sensível para dose dependente ao itraconazol de modo que o antifungotipo foi alterado. A tipagem molecular por RAPD, com os primers OPA-09, OPB-11 e OPE-18, mostrou 19 tipos moleculares distintos entre os isolados obtidos na primeira coleta e permitiu identificar que um isolado de *C. albicans* obtido no tempo 180, não era relacionado ao obtido, do mesmo indivíduo, no tempo 0. Os demais mostraram perfil de fragmentos de DNA relacionado entre as coletas. Após estocagem, por ambos métodos, todos isolados mostraram correlação genética com o padrão obtido no tempo 0. Os resultados obtidos demonstram que os métodos de conservação aplicados neste estudo não permitem a manutenção da estabilidade das características fenotípicas avaliadas. Por outro lado, além da estabilidade dos biotipos gerados, a tipagem molecular por RAPD mostrou o melhor índice discriminatório, dentre as metodologias utilizadas, ratificando sua capacidade em diferenciar isolados, de uma mesma espécie e, portanto a sua utilidade em inquéritos epidemiológicos.

Palavras chaves: *Candida albicans*, tipagem fenotípica, tipagem molecular, armazenamento, RAPD, fosfolipase, proteinase, antifungograma.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Candida* e sua epidemiologia

Candida albicans é uma levedura considerada comensal da microbiota de humanos saudáveis. Espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastrointestinal de 20 a 80% da população adulta saudável (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Já na cavidade bucal, estima-se que ocorra colonização em 40 a 60 % dos indivíduos. O fluxo e a composição da saliva estabelecem um equilíbrio dinâmico entre *Candida* sp e outros membros da microbiota comensal, prevenindo o estabelecimento de candidíase no hospedeiro imunocompetente (ODDS et al., 2006; REPENTIGNY et al., 2004; VARGAS et al., 2005). Outros sítios anatômicos que podem apresentar colonização por esse microrganismo incluem as cavidades nasal, auricular, vaginal e retal. Cerca de 20 a 30% das mulheres apresentam *Candida* spp na vagina (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; LOTT et al., 2005).

Em 1963, cerca de cinco espécies de *Candida* eram consideradas de importância médica: *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*. Atualmente mais de 20 espécies de *Candida* são causadoras de infecções principalmente em pacientes hospitalizados, imunocomprometidos e/ou com doenças de base (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; HAZEN, 1995). Embora outras espécies, como *C. dubliniensis*, tenham emergido como patógenos importantes, *C. albicans* é o agente etiológico mais comum de candidíase bucal (BORST et al., 2003; COLEMAN et al., 1998; RIZK et al., 2001; SULLIVAN et al., 2004; YANG et al., 2003).

A relevância das infecções por *Candida* spp no ambiente hospitalar é bastante conhecida. No Brasil, um estudo sentinela recente em 11 unidades de saúde, apontou essa levedura como a quarta causa mais prevalente de infecção hospitalar com incidência de 2,49 casos por 1.000 admissões e taxa de mortalidade de 54% (COLOMBO et al., 2006).

A candidíase expressa muito bem, a variedade de relações que ocorrem entre o hospedeiro e a microbiota autóctone, isto é, do comensalismo à doença. Ainda que essa transição esteja associada com características de virulência do microrganismo, é amplamente aceito que fatores do hospedeiro são fundamentais para o desenvolvimento da infecção. Dentre esses fatores são citados a redução do fluxo salivar, alteração da microbiota comensal, como a diminuição de bactérias após antibioticoterapia, dieta rica em carboidratos, alterações hormonais, como no diabetes e hipotireoidismo, deficiência de ferro e folato, prematuridade e estados de imunossupressão, tanto os causados por drogas como por imunodeficiências, muito particularmente a AIDS (FARAH et al., 2000; PFALLER et al., 2007; RUIZ-DIEZ et al., 1997).

Candidíase orofaríngea é a complicação mais freqüente em pacientes infectados pelo HIV, ainda que a introdução da terapia anti-retroviral tenha reduzido a prevalência de infecções oportunistas, incluindo a candidíase (BOERLIN et al., 1996; VARGAS et al., 2005). Embora esses pacientes sofram de candidíase bucal recorrente, e algumas vezes, venham a óbito, devido a infecções avançadas de orofaringe, a colonização de mucosas usualmente não representa ameaça à vida, a menos que a levedura atinja a corrente circulatória, por meio de invasão do tecido do hospedeiro, ou por contaminação com fômites, como catéteres, e a infecção atinja órgãos como fígado, coração e cérebro (BERMAN; SUDBERY, 2002). Entretanto, durante as últimas duas décadas, as infecções por *Candida* spp têm aumentado em número e severidade, sendo responsáveis por um significativo aumento na morbidade e mortalidade em indivíduos suscetíveis (BOCCIA et al., 2002; OZKAN et al., 2005).

A maior parte das infecções causadas por *C. albicans* é de origem endógena e há a tendência de pacientes serem colonizados ou infectados pela mesma cepa em diferentes sítios anatômicos (AHAMAD et al., 2003; JACOBSEN et al., 2007; SCHMID et al., 1992). Embora

em alguns casos, haja alteração da microbiota comensal, estudos de tipagem têm indicado que a persistência de um único tipo de linhagem de *C. albicans*, por paciente, é a situação mais comum, e que pacientes adultos com fungemia são, usualmente, infectados com seus isolados comensais (McCREIGHT et al., 1982; ODDS et al., 2006; VRIONI; MATSIOTA-BERNARD, 2001). Entretanto, subclones de *C. albicans* com genótipos variáveis, podem colonizar indivíduos simultaneamente e, nesse caso, é difícil determinar, com certeza, a contribuição de cada clone individual na infecção e, além disso, a presença de mais de um tipo clonal pode ter importância terapêutica relevante, à medida que possam ter sensibilidade diferente aos antifúngicos utilizados (SAMARANAYAKE et al., 2003a; SAMARANAYAKE et al., 2003b).

1.2 Biologia da espécie *Candida albicans*

O entendimento da biologia de *C. albicans*, incluindo aspectos morfológicos e características bioquímicas, é necessário, entre outros aspectos, para o desenvolvimento de terapias que irão prevenir ou tratar a candidíase, bem como para entender alterações que possam ocorrer nos isolados e que venham interferir na discriminação entre cepas, dentro de uma mesma espécie (BERMAN; SUDBERY, 2002; SOLL, 2000).

C. albicans cresce vegetativamente com, pelo menos, três formas morfológicas distintas: forma leveduriforme ou de blastoconídio, forma de pseudo-hifa e forma de hifa verdadeira. O balanço entre as diferentes formas afeta a morfologia da colônia e as mudanças ocorridas durante o fenômeno conhecido como “switching” (JIN et al., 2005; SUDBERY, 2001). Colônias com hifas e pseudo-hifas, invadem o substrato de ágar e têm superfície irregular, em contraste com a superfície lisa daquelas formadas por blastoconídios. A presença de hifas também favorece a formação de projeções, na periferia das colônias (BERMAN; SUDBERY, 2002). A propriedade de apresentar alterações reversíveis nas

colônias, “switching”, demonstrada por essa levedura, foi primeiro caracterizada em 1985 (BERMAN; SUDBERY, 2002; SLUTSKY; BUFFO; SOLL, 1985). As células leveduriformes de *C. albicans*, normalmente formam colônias esbranquiçadas, lisas, em forma de cúpula. Entretanto, com uma frequência relativamente baixa e espontaneamente, as colônias desse fungo podem tornar-se pregueadas, frisadas, estreladas, irregulares, entre outras formas. A simples transformação de uma colônia branca para uma opaca ou plana e acinzentada, envolvendo a transformação de blastoconídios típicos em células leveduriformes retangulares, pode caracterizar o fenômeno. As alterações morfológicas podem ser também acompanhadas por alterações de virulência das cepas. Essas alterações são geneticamente controladas, e envolvem a transcrição de produtos de genes específicos (BERMAN; SUDBERY, 2002; SLUTSKY et al, 1987).

A natureza diplóide de *C. albicans* foi deduzida a partir da determinação do conteúdo de DNA e da cinética de re-associação e desnaturação do DNA total (PLA et al., 1996). O mapeamento, utilizando-se macro-restrição com a endonuclease *Sfi*I, revelou que o número de cromossomos é 8 e que o tamanho do genoma haplóide é de aproximadamente 16 Mb (BERMAN; SUDBERY, 2002; CHIBANA et al., 2005). A nomenclatura adotada, é a estabelecida na primeira Conferência da *American Society for Microbiology* (ASM) sobre *Candida* e Candidoses, em 1987, que estabelece o rótulo R para os cromossomos contendo o DNA ribossomal, e número de 1 a 7 para os demais, sendo o 1 correspondente ao maior, e o 7 ao menor cromossomo (PLA et al., 1996; VAN HET HOOG et al., 2007).

Embora *C. albicans* esteja relacionada com os ascomicetos, ainda não foi identificada uma fase meiótica perfeita, ou haplóide, representando reprodução sexuada. A reprodução ocorre primariamente por propagação clonal o que pode conduzir a polimorfismos entre cromossomos homólogos (CHIBANA et al., 2005). Pequenas alterações na sequência de DNA, de isolados obtidos de um mesmo paciente, em momentos diferentes, são descritas

como microvariações que podem ser atribuídas a expansões ou contrações de seqüências de DNA repetidas e conduzem a variações em fragmentos de DNA durante a tipagem de *C. albicans* (BERMAN; SUDBERY, 2002; ODDS et al., 2006).

Modificações do cariótipo podem ser resultantes da seleção de certas populações celulares, em diferentes meio ambientes, como novas fontes de carbono, presença de antifúngicos ou, simplesmente, por diferentes nichos de hospedeiros. Outras alterações não são atribuídas a nenhum fator em particular, mas aparecem espontaneamente. Modificações na macro e micromorfologia das colônias, na sensibilidade aos antifúngicos, na capacidade de causar infecção em humanos, na assimilação de fontes de carbono e na virulência em ratos, parecem ter relação com a reorganização de cromossomos (PLA et al., 1996).

A análise genética convencional ou molecular dessa levedura é difícil devido à ausência de um ciclo sexual completo. Contudo, avanços recentes em técnicas moleculares, em conjunto com a disponibilidade da seqüência genômica, têm revelado a existência de loci, tipo “mating type” (MTL) no cromossomo 5 e incluem os genes *MTLa1*, *MTLa1* e *MTLa2*. Normalmente esse fungo diplóide, encontra-se em heterozigose (*a/a*) (WU et al., 2005). Esses genes, quando em homozigose, podem conduzir à formação de recombinantes entre cepas diplóides, o que possibilita o uso de técnicas convencionais para manipulação genética desse fungo (BERMAN; SUDBERY, 2002).

Alterações no padrão de MTL podem refletir mudanças fenotípicas. Estudo desenvolvido por Tavanti e colaboradores (2005), mostra uma proporção significativamente alta de isolados homozigotos em relação ao MTL, resistentes aos antifúngicos fluconazol, itraconazol e flucitosina, sugerindo que a pressão desenvolvida pelo antimicrobiano desencadeia um mecanismo comum que leva tanto à resistência como à homozigose. Miller e Johnson (2002), mostraram que cepas geneticamente modificadas para expressar somente um MTL (*MTLa* ou *MTLa*) têm tendência aumentada para alterar a morfologia da colônia de

branca para opaca, relacionando, dessa forma, o MTL com a mudança de fenótipo (“switching”).

1.3 Métodos de armazenamento de leveduras

A realização de estudos sistemáticos e de biodiversidade, incluindo aqueles com propósitos epidemiológicos, muitas vezes depende de fungos mantidos e preservados *in vitro*. Uma vez que os fungos constituem um grupo heterogêneo, diversos métodos de cultura e preservação são necessários para assegurar a viabilidade e a integridade morfológica, fisiológica e genética das culturas (MUELLER; BILLS; FOSTER, 2004).

Dentre os processos utilizados na preservação de fungos, destacam-se a transferência seriada ou subcultivos periódicos, a liofilização, o congelamento com meio adicionado de glicerol em freezer a -70°C , a conservação em nitrogênio líquido, a estocagem sob óleo mineral e o armazenamento em água destilada esterilizada (MUELLER; BILLS; FOSTER, 2004; RODRIGUES; LÍRIO; LACAZ, 1992).

A transferência seriada de meios de cultura velhos para meios novos é o método originalmente empregado para manutenção de leveduras (KIRSOP; SNELL, 1984; MUELLER; BILLS; FOSTER, 2004). Este método, embora simples, é trabalhoso e economicamente inadequado, sendo mais apropriado para coleções pequenas, em constante uso por períodos inferiores a um ano. Outra desvantagem da metodologia é a necessidade de observar as culturas frequentemente, a fim de verificar possível contaminação por fungos filamentosos ou outros microrganismos, bem como desidratação do meio. Em adição a essas desvantagens, também há a possibilidade de mudança na morfologia e fisiologia do isolado interferindo na capacidade deste em infectar um hospedeiro (MUELLER; BILLS; FOSTER, 2004). A diminuição de pH, devido ao crescimento das leveduras em meios de cultura, pode

alterar a expressão de uma série de genes em *C. albicans* promovendo alterações nos isolados (DE- BERNARDIS, 1998).

A imersão de fungos em água destilada esterilizada (processo de Castellani), como meio de preservação, aparentemente suprime alterações morfológicas na maioria dos fungos. O método é utilizado com sucesso para preservação de oomicetos, basidiomicetos, ascomicetos, hifomicetos, tanto fitopatogênicos ou patogênicos ao homem (MUELLER; BILLS; FOSTER, 2004).

Estudos avaliando a manutenção de fungos em água destilada mostram excelentes taxas de sobrevivência das culturas de leveduras, principalmente *C. albicans*, com índices de viabilidade superiores a 96%, após 10 anos de armazenamento (ODDS, 1991; QIANGQIANG; JIAJUN; LI, 1998). Rodrigues e colaboradores (1992), atestaram a utilidade do processo de Castellani para conservação de culturas de fungos, demonstrando que alguns isolados, que não apresentaram crescimento após estocagem por intermédio de subcultivos periódicos, mantiveram sua viabilidade quando estocados em água destilada pelo mesmo período. De fato, leveduras incubadas em água sobrevivem por muito mais tempo que aquelas que crescem e são mantidas em meio completo de dextrose sintética (SDC). A média de “vida” de cepas selvagens de *Saccharomyces cerevisiae*, verificada através do monitoramento do tempo médio máximo de sobrevivência da população de células de leveduras não divididas, é três vezes maior em água do que em SDC (CHENG et al., 2007; FABRIZIO; LONGO, 2003). Leveduras incubadas em meio contendo quantidade limitada de nutrientes sobrevivem por seis a sete dias com altas taxas de metabolismo e após morrem rapidamente. Por outro lado, quando essas leveduras são transferidas para a água, entre o primeiro e quinto dia, forçadas dessa forma a passar para fase de repouso, a taxa de metabolismo decresce e a sobrevivência é estendida. A mudança de fase só vai ocorrer quando todos os nutrientes

requeridos para o crescimento forem novamente disponibilizados (FABRIZIO; LONGO, 2003).

Ao se comparar os métodos de conservação de leveduras, deve-se levar em consideração, além da manutenção da viabilidade, a estabilidade genética das culturas, a fim de se primar pela manutenção das características morfológicas, metabólicas e de patogenicidade, entre outros fatores. O método de preservação de culturas em água destilada apresenta vantagens em relação a outros processos, tais como seu baixo custo, alta taxa de viabilidade e capacidade de evitar pleomorfismos nos isolados, comum nos repiques periódicos (FABRIZIO; LONGO, 2003; MUELLER; BILLS; FOSTER, 2004; RODRIGUES; LÍRIO; LACAZ, 1992).

1.4 Biotipagem

C. albicans apresenta grande variação fenotípica e genotípica, o que resulta em biotipos diferentes. Diversas metodologias de tipagem, para a diferenciação de linhagens foram desenvolvidas, desde 1980 (ODDS et al., 1980; SOLL, 2000). Esses métodos permitem compreender a distribuição e comportamento dessa levedura, tais como: colonização de diferentes sítios anatômicos num mesmo indivíduo, por linhagens não relacionadas, substituição de biotipos em infecções recorrentes, presença de linhagens diferentes em um mesmo local, transferência de isolados entre indivíduos e existência de linhagens específicas em determinadas regiões geográficas (PUJOL et al., 1997).

Para avaliação dos métodos de tipagem, as três características principais a serem observadas são a tipabilidade, reprodutibilidade e o poder discriminatório. O custo, a facilidade de utilização do método e sua rapidez também devem ser considerados. A tipabilidade corresponde ao percentual de distintas linhagens que podem ser obtidas. A reprodutibilidade é o percentual de linhagens que apresentam os mesmos resultados sob

ensaios repetitivos, isto é, a habilidade de um método produzir o mesmo resultado quando uma linhagem particular é avaliada repetidamente. O poder discriminatório de um método é a habilidade que o mesmo apresenta em diferenciar, claramente, linhagens não relacionadas, o que é avaliado por meio do número de biotipos que são gerados (BORIOLLO, 2003; HUNTER; GASTON, 1988; QUINDÓS et al., 1992).

1.4.1 Biotipagem fenotípica

Os métodos fenotípicos de tipagem de leveduras têm como base principal a análise do perfil morfológico e bioquímico desses microrganismos (FREYDIERE; GUINET; BOIRON, 2001; SANDVEN, 1990). Dentre os métodos utilizados, estão a pesquisa da atividade das exoenzimas aspartil-proteinases (SAPs) e fosfolipases, a morfotipagem e a antifungotipagem (CANDIDO, 2000; GIAMMANCO et al., 2005; KHAN; CHANDY; METWALLI, 2003; PIZZO et al., 2005).

A produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase é um importante fator de patogenicidade de *C. albicans*, uma vez que essas enzimas hidrolíticas desenvolvem papel relevante no dano a membrana da célula do hospedeiro e, conseqüente invasão desta, causando infecções disseminadas e das mucosas (FOTEDAR; AL-HEDAITHY, 2005; HUBE; NAGLIK, 2001; KADIR; GUMRU; UYGUN-CAN, 2007). A prevalência de isolados de *C. albicans* secretores de exoenzimas é variável e está correlacionada com o sítio e o tipo de infecção. Para a grande maioria dos isolados da cavidade bucal, a produção de fosfolipase é observada (CANDIDO; AZEVEDO; KOMESU, 2000; KADIR; GUMRU; UYGUN-CAN, 2007; KUMAR; KUMAR; MENON, 2006). De modo semelhante, é relatada a produção de proteinase pela maioria das cepas oriundas da boca, porém com menor atividade proteolítica quando comparada à apresentada pelos isolados sistêmicos (FOTEDAR; AL-HEDAITHY, 2005; KUMAR; KUMAR; MENON, 2006).

Price, Wilkinson e Gentry (1982) descreveram um método quantitativo para estimar o valor da atividade enzimática de fosfolipase denominada de valor P_z (Zona de fosfolipase), o qual é resultante da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia com halo de precipitação, após crescimento em meio de cultura contendo ágar e gema de ovo. Os autores consideram como altamente produtores da enzima isolados com valores de P_z iguais ou inferiores a 0,63. Foi descrito um método semelhante, utilizando meio com albumina bovina para determinação da atividade de proteinase (KUMAR ; KUMAR ; MENON, 2006; RUCHEL; TEGELLER ; TROST, 1982).

Outro sistema de tipagem, a morfotipagem, foi desenvolvido, em 1987, por Phongpaichit e colaboradores, e baseia-se na avaliação da morfologia da colônia. Nesse método, são observados aspectos da franja e da topografia da colônia em ágar extrato de malte. Essas características são registradas em um código composto por quatro dígitos, segundo modelo proposto por Hunter, Fraser e Mackenzie (1989). Embora não haja clara associação entre determinado morfotipo e virulência, tem sido sugerido que no “tipo selvagem” predomine colônias lisas e sem franjas, enquanto que isolados de infecções sistêmicas e fatais, estariam associados com colônias com franjas descontínuas, o que facilita a aderência às células do hospedeiro e dificulta a fagocitose mediada por neutrófilos e macrófagos (BERMAN; SUDBERY, 2002; HUNTER; FRASER; MACKENZIE, 1989; KHAN; CHANDY; METWALI, 2003; MALIGHETTI et al.,1998). Nesses casos, o baixo número de células na forma filamentosa na margem da colônia, explica o caráter descontínuo das franjas. A presença de blastoconídios, os quais possibilitam a disseminação do microrganismo pela corrente circulatória, também é importante. Portanto, a virulência da levedura é condicionada à presença concomitante de blastoconídios e hifas (BERMAN; SUDBERY, 2002; HUNTER; FRASER; MACKENZIE, 1989).

O perfil de suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* (antifungigrama), também pode ser utilizado na tipagem de leveduras (CANDIDO et al., 1996; QUINDÓS et al., 1996). Em 1997, o National Commitee for Clinical Laboratory Standards (atual CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute), pelo documento M27-A, padronizou a metodologia de macrodiluição em caldo, para testar a suscetibilidade de *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans* frente à anfotericina B, flucitosina, fluconazol, itraconazol e cetoconazol. Modificações nas metodologias para a realização de testes de suscetibilidade aos antifúngicos têm sido propostas para torná-los mais convenientes e eficientes, aplicáveis a grande número de espécies, e apropriados para uso em laboratórios clínicos (HOFFMAN e PFALLER, 2001). O documento M27-A2 (NCCLS, 2002) adota, como referência, o método da macrodiluição em caldo, entretanto salienta que a microdiluição em caldo pode ser utilizada com a mesma eficiência. O uso da microdiluição em caldo tem como vantagens o uso de pequenos volumes, maior facilidade de execução e a possibilidade da incorporação de leitura por espectrofotometria (HOFFMAN e PFALLER, 2001; NCCLS, 2002).

1.4.2 Biotipagem molecular

Um sistema efetivo para tipagem de DNA deve permitir discriminação entre isolados não relacionados, reconhecer a mesma cepa em isolados independentes e finalmente, identificar isolados altamente relacionados, mas não idênticos, como aqueles que diferem por microevolução. Dessa maneira, deve ser apropriado e sensível para permitir classificar dois isolados como pertencentes à mesma linhagem, particularmente quando infecções são originadas à partir de microrganismos comensais, quando cepas se tornam especializadas para um determinado sítio anatômico ou condição de comprometimento, quando cepas sofreram microevolução para rápida adaptação, ou quando cepas são partilhadas entre indivíduos (SOLL,2000).

Métodos que empregam sistemas de DNA “fingerprinting” são utilizados na avaliação da relação genética de cepas de *C. albicans* que, em complemento aos métodos de tipagem fenotípicos ajudam a identificar subtipos de cepas dessa levedura ubíqua, colonizando ou infectando pacientes imunocomprometidos durante os múltiplos episódios de candidíase, a transmissão de cepas entre parceiros em indivíduos saudáveis e o envolvimento das diferentes cepas em infecções recorrentes (ERGON; GULAY, 2005; MARCO et al., 1999; SAMARANAYAKE et al., 2003b).

Dentre os métodos de tipagem molecular utilizados, destacam-se a eletroforese de enzima multilocus (MLEE), a cariotipagem eletroforética (EK), o DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), o polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição com e sem hibridação (RFLP com e sem hibridação) e a análise com enzima de restrição (REA). Dois outros métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), e mais recentemente utilizados na investigação de isolados, são a tipagem de sequência multilocus (MLST) e o polimorfismo de comprimento de microsatélite (MLP). Para *C. albicans*, um sistema de MLST baseado em sete fragmentos de DNA foi desenvolvido com alta acuidade para a tipagem de subtipos. Esses métodos são aplicados em diferentes estudos, e servem de base para a compreensão dos padrões de distribuição e características dos microrganismos (BORIOLLO et al., 2003; BORIOLLO et al., 2006; CAMPANHA et al. 2005; GARCIA-HERMOSO, 2007; OLIVE; BEAN, 1999; SOLL, 2000; TAVANTI et al., 2005; VALÉRIO; WEIKERT-OLIVEIRA; RESENDE, 2006; XU et al., 1999).

Os métodos moleculares utilizados para tipagem geram fragmentos de DNA visualizados como bandas que podem ser identificadas e digitalizadas para sistemas computadorizados. Essas medidas são usadas na geração de árvores filogenéticas (dendrogramas) para análise de grupos. No entanto, devido à maioria dos métodos de tipagem molecular, aplicados a fungos patogênicos, gerar padrões de fragmentos sem *loci* definido, as

fórmulas que melhor se adaptam aos mesmos são as que levam em consideração a presença ou ausência desses fragmentos e sua intensidade e localização, após corrida eletroforética, criando um coeficiente de similaridade genética entre as amostras de DNA A e B (S_{AB}). Esse valor varia entre 0 e 1,00. Valores entre 0,01 e 0,99 representam coeficientes crescentes de similaridade entre as amostras (SILVA, 2005; SOLL, 2000).

Em relação a infecções fúngicas, nenhuma metodologia de tipagem molecular é referida como ideal, visto que cada uma apresenta vantagens e desvantagens. Entretanto, ainda que tenham sido desenvolvidas uma variedade de metodologias baseadas na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), o RAPD é o método mais rotineiramente utilizado e tem apresentado sucesso para *C. albicans* (CAETANO-ANOLLÉS, 1993; SAMARANAYAKE, 2003b; SOLL, 2000; SONG et al. 2005; VALÉRIO; WEIKERT-OLIVEIRA; RESENDE, 2006; WELSCH; McCLELLAND, 1990). O RAPD baseia-se no uso de *primers* arbitrários com aproximadamente 10 bases, que são anelados sob baixas temperaturas ao DNA genômico. O anelamento de *primers* a sítios complementares relacionados conduz à subsequente amplificação de seqüências genômicas dispersas, pela enzima Taq DNA polimerase. Os produtos amplificados são separados em gel de agarose, corados com brometo de etídio, e o padrão de distribuição dos fragmentos, analisado. Ainda que um *primer* possa gerar um padrão complexo, na maioria dos casos 1 a 3 fragmentos diferenciam os isolados. Esse método detecta polimorfismos e não depende, necessariamente, do conhecimento de seqüências específicas nas espécies estudadas (VALÉRIO; WEIKERT-OLIVEIRA; RESENDE, 2006; SOLL, 2000). No desenvolvimento de um sistema de tipagem utilizando o RAPD, para uma determinada espécie, devem ser avaliados vários *primers*, e aqueles que apresentarem maior variabilidade ou polimorfismos, entre isolados independentes, devem ser selecionados para a confecção do dendrograma (MAROL; YUCESYOY, 2008).

A análise por RAPD é um método fácil e rápido para confirmação de espécies estocadas, previamente isoladas, e para tipar espécies de *Candida* em investigações epidemiológicas. Além disso, apresenta poder discriminatório comparável a métodos mais complexos (JAIN et al., 2001; VAN BELKUM et al., 1994). Entretanto, a metodologia apresenta limitações que devem ser cuidadosamente analisadas para que se possa garantir melhor qualidade e confiabilidade na análise. Entre elas pode ser citada a falta de reprodutibilidade, não apenas entre laboratórios, mas também em ensaios repetidos num mesmo laboratório, o que dificulta o desenvolvimento de banco de dados comum. Outro aspecto a ser considerado são as variações que podem ocorrer como resultado de pequenas diferenças na relação *primer*-concentração de DNA, na temperatura durante a reação de amplificação e na concentração de magnésio. Mudanças nesses parâmetros interferem principalmente nos fragmentos de baixa intensidade, mas podem interferir também nos de alta intensidade, inclusive com relação à posição. Alterações no padrão de fragmentos observado podem ocorrer, também, em virtude de mudança de fornecedor ou mesmo lote da enzima Taq DNA polimerase (SOLL, 2000).

Estudos demonstram que a metodologia do RAPD pode determinar variantes moleculares de *Candida* spp, mesmo em situações em que diferenças fenotípicas não sejam evidenciadas, e que ainda, permite avaliar a relação genética entre os mesmos (RIEDERER et al., 2002; SONG et al., 2005; VALÉRIO; WEIKERT-OLIVEIRA; RESENDE, 2006).

2 CONCLUSÕES

- A atividade de exoenzimas de um mesmo isolado de *C. albicans* foi alterada, entre duas ocasiões distintas de coleta e após estocagem do mesmo, ocasionando em instabilidade do enzimatipo gerado;
- Alterações nos morfotipos de *C. albicans* são passíveis de ocorrer tanto em diferentes momentos de coleta, quanto após estocagem dos mesmos, demonstrando pouca estabilidade dos morfotipos apresentados;
- O antifungotipo não foi alterado nas distintas ocasiões de coleta e manteve-se praticamente inalterado após armazenamento dos isolados, demonstrando boa conservação do perfil de sensibilidade dos isolados;
- O padrão de fragmentos de DNA dos isolados no RAPD permanece relacionado em ocasiões distintas de coleta e após estocagem dos isolados;
- Dentre as metodologias utilizadas, o RAPD foi a melhor metodologia de tipagem apresentando índice discriminatório superior a 0,9.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-ZAPATERO, C.; GOLDMAN, R.; MUCHMORE, S.W.; HUTCHINS, C.; STEWART, K.; NAVAZA, J.; PAYNE, C.D.; RAY, T.L. Structure of a secreted aspartic protease from *Candida albicans* complexed with a potent inhibitor: implication for the design of antifungal agents. **Protein Science**, Woodbury, v.5, n.4, p.640-5, apr.1996.

AHMAD, S.; KHAN, Z.; MUSTAFA, A.S.; KHAN, Z.U. Epidemiology of *Candida* colonization in an intensive care unit of a teaching hospital in Kuwait. **Medical Mycology**, Oxford, v.41, n.6, p.487-93, dec.2003.

BARTIE, K.L.; WILLIAMS, D.W.; WILSON, M.J.; POTTS, A.J.C.; LEWIS, M.A.O. PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplastic candidosis and other oral conditions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.11, p.4066-75, nov.2001.

BAUTISTA-MUÑOZ, C.B.; BOLDO, X.M.; TANACA, L.V.; RODRÍGUEZ, C.H. Identification of *Candida* spp. by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Direct PCR methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.1, p.414-20, jan.2003.

BERMAN, J.; SUDBERY, P.E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Reviews Genetics**, London, v.3, n.12, p.918-30, dec.2002.

BOCCIA, S.; POSTERARO, B.; LA-SORDA, M.; VENTO, G.; MATASSA, P.G.; TEMPERA, A.; PETRUCCI, S.; FADDA, G. Genotyping analysis by 27A DNA fingerprinting of *Candida albicans* strains isolated during an outbreak in a neonatal intensive care unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Chicago, v.23, n.5, p.281-284, may.2002.

BOERLIN, P.; PETZOLD, F.B.; GOUDET, J.; DURUSSEL, C.; PAGANI, J.L.; CHAVE, J.P.; BILLE, J. Typing *Candida albicans* oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.5, p.1235-48, may.1996.

BORIOLLO, M. F. **Análise da diversidade genética de amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças saudáveis por eletroforese de enzima multiloco.** 2004. 195p. Tese (Doutoramento) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2004.

BORIOLO, M.F.G.; ROSA E.A.R.; BERNARDO, W.L.C.; GONÇALVES, R.B.; HOFLING, J.F. Electrophoretic protein patterns and numerical analysis of *Candida albicans* from the oral cavities of healthy children. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.45, n.5, p.249-57, sep-oct.2003.

BORIOLO, M.F.; ROSA E.A.; GONÇALVES, R.B.; HOFLING, J.F. Parity among interpretation methods of MLEE patterns and disparity among clustering methods in epidemiological typing of *Candida albicans*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.64, n.3, p.346-65, mar.2006.

BORST, A.; THEELEN, B.; REINDERS, E.; BOEKHOUT, T.; FLUIT, A.C.; SAVELKOU, P. H. M. Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida spp.*, including *C. dubliniensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.4, p.1357-62, apr.2003.

CAETANO-ANOLLÉS, G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. **PCR methods and applications**, New York, v.3, n.2, p.85-94, oct.1993.

CAMPANHA, N.H.; NEPELENBROEK, K.H.; SPOLIDORIO, D.M.P.; SPOLIDORIO, L.C.; PAVARINA, A.C. . Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. **Oral Diseases**, Copenhagen, v.11, n.6, p.392-8, nov.2005.

CANDIDO, R.C.; AZEVEDO, R.V.P.; KOMESU, M.C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n.5, p. 437-42, sep-oct.2000.

CANDIDO, R.C. **Biofilme dentadura**: Caracterização fenotípica de amostras de leveduras isoladas em cinco ocasiões no período de um ano. 2000. 148p. Tese (Livre docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

CANDIDO, R.C.; FISCHMAN, O.; ITO, I.Y.; PAULA, C.R. *Candida albicans*: biotyping by susceptibility to antimycotics. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, n.2, p. 83-6, apr-jun.1996.

CHIBANA, H.; OKA, N.; NAKAYAMA, H.; AOYAMA, T.; MAGEE, B.B.; MAGEE, P.T.; MIKAMI, Y. Sequence finishing and gene mapping for *Candida albicans* chromosome 7 and syntenic analysis against the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Genetics**, Austin, v.170, n.4, p.1525-37, aug.2005.

CHENG, C.; FABRIZIO, P.; GE, H.; WEL, M.; LONGO, V.D.; LI, L.M. Significant and systematic expression differentiation in long-lived yeast strains. **Plas One**, São Francisco, v.2, n.10, e1095, oct.2007.

CLARK, T.A.; SLAVINSKI, S.A.; MORGAN, J.; LOTT, T.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; BRANDT, M.E.; WEBB, R.M.; CURRIER, M.; FLOWERS, R.H.; FRIDKIN, S.K.; HAJJEH, R.A. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, n.10, p.4468-4472, oct. 2004.

CLEMONS, K.V.; FEROZE, F.; HOLMBERG, K.; STEVENS, D.A. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.6, p.1332-6, jun.1997.

COLEMAN, D.C.; RINALDI, M.G.; HAYNES, K.A.; REX, J.H.; SUMMERBELL, R.C.; ANAÏSSIE, E.J.; LI, A.; SULLIVAN, D.J. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Medical Mycology**, Oxford, v.36, n.1, p.156-65, feb.1998.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n.5, p. 599-607, sep-oct.2003.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUËR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nation-wide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44, n.8, p.2816-23, aug.2006.

DE-BERNARDIS, F.; MUHLSCHLEGEL, F.A.; CASSONE, A.; FONZI, W.A. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.66, n.7, p. 3317-25, jul.1998.

DUBOIS, N.; COLINA, A.; AUMONT, F.; BELHUMEUR, P.; REPENTIGNY, L. Overexpression of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase 2 and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* do not augment virulence in mice. **Microbiology**, Reading, v.144, n.8, p.2299-2310, aug.1998.

ERGON, M.C.; GULAY, Z. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from urine at an intensive care unit. **Mycoses**, Berlin, v.48, n.2, p.126-31, mar.2005.

FABRIZIO, P.; LONGO, V.D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. **Aging Cell**, Oxford, v.2, n.2, p. 73-81, apr.2003.

FARAH, C.S; ASHMAN, R.B.; CHALLACOMBE, S.J. Oral Candidosis. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v.18, n.5, p. 553-62, sep-oct.2000.

FERNANDES, P.M.B. How does yeast respond to pressure? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.38, n.8, p.1239-45, aug.2005.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S.S.A. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* e *C. dubliniensis*. **Mycoses**, Berlin, v.48, n.1, p.62-7, jan.2005.

FREYDIERE, A.M.; GUINET, R.; BOIRON, P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. **Medical Mycology**, Oxford, v.39, n.1, p.9-33, feb.2001.

GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; HOUSTON, A.K.; JOLY, S.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C.; SOLL, D.R. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and α -methyl-D-glucoside as determined with API 20C AUX and Vitek YBC Systems. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.12, p.3804-8, dec.1999.

GARCIA-HERMOSO, D.; CABARET, O.; LECELLIER, G.; DESNOS-OLLIVIER, M.; HOINARD, D.; RAOUX, D.; COSTA, J.M.; DROMER, F.; BRETAGNE, S. Comparison of microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing for DNA-based typing of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.45, n.12, p.3958-63, dec.2007.

GENDRON, R.; GRENIER, D.; MAHEU-ROBERT, L.F. The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. **Microbes and Infection**, Paris, v.2, n.8, p.897-906, jul.2000.

GIAMMANCO, G.M.; LOPES, M.M.; COIMBRA, R.S.; PIGNATO, S.; GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F.; FREITAS, G.; GIAMMANCO, G. Value of morphotyping for the characterization of *Candida albicans* clinical isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n.5, p. 483-90, aug.2005.

GIRMENIA, C.; PIZZARELLI, G.; CRISTINI, F.; BARCHIESI, F.; SPREGHINI, E.; SCALISE, G.; MARTINO, P. *Candida guilliermondii* Fungemia in Patients with Hematologic Malignancies. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44, n.7, p.2458-64, jul.2006.

HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.8, n.4, p.462-78, oct.1995.

HOFFMAN, H.L.; PFALLER, M.A. In vitro antifungal susceptibility testing. **Pharmacotherapy**, Boston, v.21, n.8pt2, p.111S-23S, aug.2001.

HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, Washington, v.147, n.8, p.1997-2005, aug.2001.

HUNTER, P.R.; FRASER, C.A.M.; MACKENZIE, D.W.R. Morphotype markers of virulence in human candidal infections. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.28, n.2, p. 85-91, feb.1989.

HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.26, n.11, p.2465-6, nov.1988.

JACOBSEN, M.D.; GOW, N.A.R.; MAIDEN, M.C.J.; SHAW, D.J.; ODDS, F.C. Strain typing and determination of population structure of *Candida krusei* by Multilocus sequence typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.45, n.2, p.317-323, feb.2007.

JAIN, P.; KHAN, Z.K.; BHATTACHARYA, E.; RANADE, S.A. Variation in random amplified polymorphic DNA(RAPD) profiles specific to fluconazole resistant and sensitive strains of *Candida albicans*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v.41, n.3, p.113-9, nov.2001.

JIN, Y.; SAMARANAYAKE, Y.H.; YIP, H.K.; SAMARANAYAKE, L.P. Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilmes. **Mycopathologia**, Netherlands, v.160, n.3, p.191-200, oct.2005.

KADIR, T; GUMRU, B.; UYGUN-CAN, B. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v.52, n.7, p. 691-6, jul.2007.

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

KHAN, Z.U.; CHANDY, R.; METWALI. *Candida albicans* strain carriage in patients and nursing staff of an intensive care unit: a study of morphotypes and resistotypes. **Mycoses**, Berlin, v.46, n.11, p.479-86, dec.2003.

KIRSOP, B.E.; SNELL, J.J.S. **Maintenance of microorganisms:** a manual of laboratory methods. London: Academic press Inc., 1984. 207p.

KLEINEGGER, C.L.; LOCKHART, S.R.; VARGAS, K.; SOLL, D.R. Frequency, intensity, species and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.9, p.2246-54, sep.1996.

KUMAR, C.P.G.; KUMAR, S.S.J.; MENON, T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**, Netherlands, v.161, n.4, p.213-8, apr.2006.

LACAZ, C.S. PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica:** fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8ªed. São Paulo: Sarvier, 1991. 695p.

LEE, M.; WILLIAMS, L.E.; WARNOCK, D.W.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.53, n.2, p.217-24, feb.2004.

LOCKHART, S.R.; JOLY, S.; PUJOL, C.; SOBEL, J.D.; PFALLER, M.A.; SOLL, D.R. Development and verification of fingerprinting probes for *Candida glabrata*. **Microbiology**, Washington, v.143, n.12, p.3733-46, dec.1997.

LOTT, T.J.; FUNDYGA, R.E.; KUYKENDALL, R.J.; ARNOLD, J. The human commensal yeast *Candida albicans*, has an ancient origin. **Fungal Genetics Biology**, Orlando, v.42, n.5, p.444-51, may.2005.

MALIGHETTI, V.; AROSIO, M.; BELLOTTI, M.G.; SPADARI, E.; ZAMBELLINI ARTINI, M.; SPADARI, F.; RIVIERA, L. *Candida albicans*: the relationship between morphotypes and in vitro adhesivity to the oral mucosa cells of HIV-positive and AIDS patients.s. **Minerva Stomatologia**, Torino, v.47, n.9, p.351-9, sep.1998.

MARCO, F.; LOCKHART, S.R.; PFALLER, M.A.; PUJOL, C.; RANGEL-FRAUSTO, M.S.; WIBLIN, T.; BLUMBERG, H.M.; EDWARDS, J.E.; JARVIS, W.; SAIMAN, L.; PATTERSON, J.E.; RINALDI, M.G.WENZEL, R.P.; THE NEMIS STUDY GROUP; SOLL, D.R. Elucidating the origins of nosocomial infections with *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the complex probe Ca3. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.9, p.2817-28, sep.1999.

MARIANO, P.L.; MILAN, E.P.; DA MATTA, D.A.; COLOMBO, A.L. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.4, p.533-8, jun.2003.

MAROL, S.; YUCESAY, M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. **Mycoses**, Berlin, v.51, n.1, p.40-9, jan.2008.

MILLER, M.G.; JOHNNSON, A.D. White–opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. **Cell**, Cambridge, v.110, n.3, p.293–302, aug.2002.

McCREIGHT, M.C.; WARNOCK, D.W. Enhanced differentiation of isolates of *Candida albicans* using a modified resistogram method. **Mykosen**, Berlin, v.25, n.11, p.589-98, nov.1982.

MEDEIROS, E.A.S.; LOTT, T.J.; COLOMBO, A.L.; GODOY, P.; COUTINHO, A.P.; BRAGA, M.S.; NUCCI, M.; BRANDT, M.E. Evidence for a pseudo-outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in a university hospital in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.45, n.3, p.942-7, mar.2007.

METZGAR, D.; BELKUM, A.V.; FIELD, D.; HAUBRICH, R.; WILLS, C. Random amplification of polymorphic DNA and microsatellite genotyping of pre- and posttreatment isolates of *Candida* spp. from human immunodeficiency virus-infected patients on different fluconazole regimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.8, p.2308-13, aug.1998.

MUELLER, G.M.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. **Biodiversity of fungi**: inventory and monitoring methods. Amsterdam: Elsevier academic press, 2004. 777p.

MUKHERJEE, P.K.; CHANDRA, J.; KUN, D.M.; GHANNOM, M.A. Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) under various environmental and physiological conditions. **Microbiology**, Washington, v.149, n.1, p.261-7, jan.2003.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Publication of M27-A: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: approved standard. **NCCLS**, Wayne, v.17, p. 1-26, 1997.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Publication of M27-A2: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: approved standard. Second edition. **NCCLS**, Wayne, v.22, n. 15, p. 1-30, 2002.

ODDS, F.C. Long-term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v.29, n.6, p.413-5, nov-dec.1991.

ODDS, F.C.; BERNAERTS, R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.8, p.1923-9, aug.1994.

ODDS, F.C.; DAVIDSON, A.D.; JACOBSEN, M.D.; TAVANTI, A.; WHYTE, J.A. KIBBLER, C.C.; ELLIS, D.H.; MAIDEN, M.C.J.; SHAW, D.J.; GOW, N.A.R. *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by Multilocus Sequence Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44, n.10, p.3647-58, oct.2006.

ODDS, F.C.; ABBOTT, A.B. A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. **Saboraudia**, Edinburgh, v.18, n.4, p.301-17, dec.1980.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.6, p.1661-9, jun.1999.

OZKAN, S.; KAYNAK, F.; KALKANCI, A.; ABBASOGLU, U.; KUSTIMUR, S. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration value of antifungal agents . **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n.3, p. 319-24, may.2005.

PESTI, M.; VAGVOLGYI, C.S.; PAPP, T.; NAGY, A.; NOVAK, A. Variation of isoenzyme and RAPD patterns in *Candida albicans* morphological mutants with altered colony ultrastructure. **Acta Biologica Hungarica**, Budapest, v.52, n.2, p. 289-98, apr-jun.2001.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.20, n.1, p. 133-63, jan.2007.

PFALLER, M.A.; RHINE-CHALBERG, J.; REDDING, S.W.; SMITH, J.; FARINACCI, G.; FOTHERGILL, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.1, p.59-64, jan.1994.

PHONGPAICHIT, S.; MACKENZIE, D.W.; FRASER, C. Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.99, n.2, p.421-8, oct.1987.

PIRES-GONÇALVES, R.H.; MIRANDA, E.T.; BAEZA, LC.; MATSUMOTO, M.T.; ZAIA, J.E.; MENDES-GIANINNI, M.J.S.. Genetic relatedness of commensal strains of *Candida albicans* carried in the oral cavity of patients`dental prosthesis users in Brazil **Mycopathologia**, Netherlands, v.164, n.6, p.255-63, dec.2007

PIZZO, G.; GIAMMANCO, G.M.; PECORELLA, S.; CAMPISI, G.; MAMMINA, C.; D'ANGELO, M. Biotypes and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles of subgingival *Candida albicans* isolates in HIV infection. **The New Microbiologica**, Pavia, v.28, n.1, p.75-82, jan.2005.

PINTO, P.M.; RESENDE, M.A.; KOGA-ITO, C.Y.; TENDLER, M. Genetic variability analysis among *Candida* spp. isolates using random amplified polymorphic DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.99, n.2, p.147-52, mar.2004.

PLA, J.; GIL, C.; MONTEOLIVA, L.; NAVARRO-GARCIA, F.; SÁNCHEZ, M.; NOMBELA, C. Understanding *Candida albicans* at the molecular level. **Yeast**, New York, v.12, n.16, p.1677-702, dec.1996.

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v.20, n.1, p. 7-14, mar.1982.

PUJOL, C.; JOLY, S.; LOCKHART, S.R.; NOEL, S.; TIBAYRENC, M.; SOLL, D.R. Parity among randomly amplified polymorphic DNA method, Multilocus enzyme electrophoresis and southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.9, p.2348-58, sep.1997.

QIANGQIANG, Z., JIAJUN, W.; Li, L. Storage of fungi using sterile distilled water or liophilization: comparison after 12 years. **Mycoses**, Berlin, v.41, n.5, p.255-7, may-jun. 1998.

QUINDÓS, G.; LIPPERHEIDE V.; BARTUREN, B.; ALONSO, R.; BIKANDI, J.; SAN-MILLÁN, R.; TELLAETXE, M.; RIBACOBÁ, L.; PONTÓN, J. A new method of antibotyping yeasts for subspecies discrimination and distribution in human clinical specimens. **European Journal of Epidemiology**, Rome, v.12, n.1, p.55-62, feb.1996.

QUINDÓS, G.; RODRÍGUEZ, M.F.; BURGOS, A.; TELLAETXE, M.; CISTERNA, R.; PONTÓN, J. Colony morphotype on Sabouraud triphenyltetrazolium agar: a simple and inexpensive method for *Candida* subspecies discrimination. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.30, n.10, p.2748-52, oct.1992.

REPENTIGNY, L.; LEWANDOWSKI, D.; JOLIC OEUR, P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.17, n.4, p.729-59, oct. 2004.

RIEDERER, K.M.; RAMANATHAN, J.; BARCZAK, J.; BARAN, J.KHATIB, R. Utility of a pre-optimized kit for random amplified polymorphic DNA in typing *Candida albicans*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n.4, p. 369-73, apr.2002.

RIZK, M.A.J.; FERREIRA, S.M.S; SABET, M.; FALKLER, W.A.; MERZ, W.G.; MEILLER, T.F. Recovery of *Candida dubliniensis* and other yeasts from human immunodeficiency virus – associated periodontal lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.12, p.4520-2, dec.2001.

RODRIGUES, E.G.; LÍRIO, V.S.; LACAZ, C. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.34, n.2, p.159-65, mar-apr.1992.

RUCHEL, R. ; TEGELLER, R. ; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v.20, n.3, p. 233-44, sep.1982.

RUIZ-DIEZ, B.; MARTINEZ, V.; ALVAREZ, M.; RODRIGUEZ-TUDELA J.L.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V. Molecular tracking of *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: long-term colonizations versus catheter-related infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.12, p.3032-6, dec.1997.

SAMARANAYAKE, Y.H.; DASSANAYAKE, R.S.; CHEUNG, B.P.K.; JAYATILAKE, J.A.M.S.; YEUNG, K.W.S.; YAU, J.Y.Y.; SAMARANAYAKE, L.P. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v.114, n.12, p.857-66, dec.2006.

SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P.; TSANG, P.C.; WONG, K.H.; YEUNG, K.W.S. Heterogeneity in antifungal susceptibility of clones of *Candida albicans* isolated on single and sequential visits from a HIV-infected southern Chinese cohort. **Journal of Oral Pathology**, Copenhagen, v. 30, n.6, p. 336-46, jul.2001.

SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P.; YAU, J.Y.; DASSANAYAKE, R.S.; LI, T.K.; ANIL, S. Phenotypic diversity of oral *C. albicans* isolates on single and sequential visits in an HIV- infected Chinese cohort. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v.111, n.2, p.329-37, fev.2003a.

SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P.; DASSANAYAKE, R.S.; YAU, J.Y.Y.; TSANG, W.K.; CHEUNG, B.P.K.; YEUNG, K.W.S. "Genotypic shuffling" of sequential clones of *Candida albicans* in HIV- infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.52, n.4, p.349-59, apr.2003b.

SAMARANAYAKE, L.P.; RAESIDE, J.M.; MacFARLANE, T.W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida albicans* species in vitro. **Sabouraudia**, Edinburgh, v.22, n.3, p.201-7, jun.1984.

SANDVEN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontologica Scandinavica**, Stockholm, v.48, n.1, p.27-36, feb.1990.

SCHMID, J.; HERD, S.; HUNTER, P.R.; CANNON, R.D.; YASIN, M.S.M.; SAMAD, S.; CARR, M.; PARR, D.; McKINNEY, W.; SCHOUSBOE, M.; HARRIS, B.; IKRAM, R.; HARRIS, M.; RESTREPO, A.; HOYOS, G. Evidence for a general purpose genotype in *Candida albicans*, highly prevalent in multiple geographical regions, patient type and types of infection. **Microbiology**, Washington, v.145, n.9, p.2405-13, sep.1999.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.30, n.4, p.935-941, apr.1992.

SILVA, R. B. O. **Investigação de leveduras no âmbito hospitalar por diferentes técnicas moleculares**. 2005. 154 p. Tese (Doutoramento) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

SLUTSKY, B.; BUFFO, J.; SOLL, D. R. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. **Science**, New York, v.230, n.4726, p.666–9, nov.1985.

SLUTSKY, B.; STAEBELL, M.; ANDERSON, J.; RISEN, L.; PFALLER, M.; SOLL, D. R. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.169, n.1, p.189-97, jan.1987.

SOLL, D.R. The Ins and Outs of DNA Fingerprinting the Infections Fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.13, n.2, p.332-70, apr.2000.

SONG, X.; ERIBE, E.R.K.; SUN, J.; HANSEN, B.F.; OLSEN, I. Genetic relatedness of oral yeasts within and between patients with marginal periodontitis and subjects with oral health. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v.40, n.6, p.446-52, 2005.

SUDBERY, P.E. The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.41, n.1, p.19-31, jul.2001.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.P.; PINJON, E.; AL-MOSAID, A.; STOKES, C.; VAUGHAN, C.; COLEMAN, D.C. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS YEAST RESEARCH**, Copenhagen, v.4, n.4, p.369-76, jan.2004.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; FORDYCE, M.J.; GOW, N.A.R.; MAIDEN, M.C.J.; ODDS, F.C. Population Structure and Properties of *Candida albicans*, as Determined by Multilocus Sequence Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n.11, p.5601-5613, nov.2005.

TINTELNOT, K.; HAASE, G.; SEIBOLD, M.; BERGMANN, F.; STAEMMLER, M.; FRANZ, T. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.4, p.1599-608, apr.2000.

VALÉRIO, H.M.; WEIKERT-OLIVEIRA, R.C.B.; RESENDE, M.A.. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba, v.39, n.2, p.174-8, mar-apr.2006.

VAN BELKUM, A.; MELCHERS, W.; DE PAUW, B.E.; SCHERER, S.; QUINT, W.; MEIS, JF. Genotypic characterization of sequential *Candida albicans* isolates from fluconazole-treated neutropenic patients. **The Journal of Infectious Diseases**. Chicago, v.169, n.5, p.1062-70, may.1994.

VAN HET HOOG, M.; RAST, T.J.; MARTCHENKO, M.; GRINDLE, S.; DIGNARD, D.; HOGUES, H.; CUOMO, C.; BERRIMAN, M.; SCHERER, S.; MAGEE, B.B.; WHITEWAY, M.; CHIBANA, H.; NANTTEL, A.; MAGEE, P.T. Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. **Genome Biology**. London, v.8, n.4, p.52.1-12, apr.2007.

VARGAS, L.O.S.; LÓPEZ, N.G.O.; VILLAR, M.; MORAGUES, M.D.; AGUIRRE, J.M.; CRUZ, M.C.; RIBOT, J.L.L.; CEPEDA, L.A.G.; QUINDÓS, G. Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n.8, p.4159-62, aug.2005.

VRIONI, G.; MATSIOTA-BERNARD, P. Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. **The Journal of Infection**. Kent, v.42, n.1, p.50-6, jan.2001.

WALTIMO, T.M.; DASSANAYAKE, R.S.; ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M.P.; SAMARANAYAKE, L.P. Phenotypes and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Candida albicans* isolates from root canal infections in a Finnish population. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v.16, n.2, p.106-12, apr.2001.

WELSCH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.24, p.7213-8, dec.1990.

WILLIAMSON, M.; SAMARANAYAKE, L.P.; MacFARLANE, T.W. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v.24, n.5, p.415-17, oct.1986.

WU, W.; PUJOL, C.; LOCKHART, S.R.; SOLL, D.R. Chromosome loss followed by duplication is the major mechanism of spontaneous mating-type locus homozygosis in *Candida albicans*. **Genetics**, Austin, v.169, n.3, p.1311-27, mar.2005.

XU, J.; BOYD, C.M.; LIVINGSTON, E.; MEYER, W.; MADDEN, J.F.; MITCHELL, T.G. Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.12, p.3835-43, dec.1999.

XU, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T.G. Lack of genetic differentiation between two geographically diverse samples of *Candida albicans* isolated from patients infected with human immunodeficiency virus. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.181, n.4, p.1369-73, feb.1999.

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