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

KÁTIA LESTON BACELO

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biociências Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profª. Drª. Regina Celia Candido

Ribeirão Preto-SP

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO, TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bacelo, Kátia Leston.
Avaliação da variabilidade fenotípica e molecular de isolados de *Candida albicans* após período de armazenamento das culturas e em duas ocasiões de coleta. Ribeirão Preto, 2008.
110 p.: il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociências aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
Orientadora: Candido, Regina Celia.

1. *Candida albicans*. 2. tipagem fenotípica. 3. tipagem molecular. 4. armazenamento. 5. RAPD. 6. fosfolipase. 7. proteinase. 8. antifungigrama.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Kátia Leston Bacelo

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biociências Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profª. Drª. Regina Celia Candido

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Ao André, meu marido, amor, amigo, cujo incentivo e apoio foi fundamental para realização deste objetivo, dedico este trabalho.

Homenagem Especial

Aos meus pais Vitor e Marta que desde a minha mais tenra idade, sempre valorizaram e proporcionaram a minha educação e formação profissional.

Ao meu filho Inácio que apenas com seu sorriso sincero e amoroso, me incentiva e me lembra diariamente que tudo vale a pena...

Às minhas avós Iriocilda e Idorila pelas "lições de vida"que muito contribuíram para minha formação.

Aos meus irmãos Ângela e Jacques pelo carinho e apoio sempre recebidos.

Agradecimentos

À Profª. Drª. Regina Celia Candido por ter me recebido tão gentilmente em seu laboratório e me proporcionado este aprendizado, pela orientação, pelos conhecimentos de micologia recebidos e pelo apoio e compreensão sempre a mim dispensados.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) – USP pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Aos colegas de pós-graduação Reginaldo dos Santos Pedroso, Karen Regina Carim da Costa e Manuela Luíza Toti Rodrigues pela valiosa contribuição durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Joseane Cristina Ferreira, técnica do Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP, pela colaboração na execução dos experimentos e pelos ensinamentos de Biologia Molecular.

À Solange Aparecida Bocardo, funcionária do Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP pelo auxílio recebido.

À Ludmilla Tonani, técnica do Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP, pelo suporte recebido para a realização dos experimentos.

Ao Prof.Dr. Marco Aurélio Sicchiroli Lavrador pela colaboração na análise estatística dos dados.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Carlos Armando Faustino Silva, Rosana Florêncio, Ana Lúcia Turatti e Eleni Passos pela atenção sempre recebida.

Aos alunos de graduação e pós-graduação que gentilmente aceitaram participar deste estudo.

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

Muito Obrigada

"No porto de antes, apreensivo, eu tentava imaginar as dificuldades e lutas futuras. No de agora, dono do tempo que eu conquistara, simplesmente admirava o que estava ao redor e desfrutava do que estava feito. Não era a sensação de uma batalha ganha, de uma luta em que os obstáculos foram vencidos. Muito mais do que isso, era o prazer interior, de ter realizado algo que tanto desejei, de ter feito e visto o que fiz e vi".

Amyr Klink

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 enzimotipo 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 enzimotipos, 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, antifungigrama.

ABSTRACT

BACELO, K. L. **Evaluation of phenotypic and molecular variability of *Candida albicans* isolates after culture storage period and in two collection occasions**. 2008. 110 f. Dissertation (Master`s Degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The *Candida* genus is responsible for most nosocomial fungal infections. The identification of the probable origin focus is very important to elucidate the epidemiology of this kind of infection and so, the usage of typing methods that evaluate phenotypic and molecular characteristics are essential. Therefore, the objective of this study was to type *C. albicans* isolates, before and after culture storage and in two different collection occasions to verify the biotype maintenance and the discriminatory power of the utilized methods. The salivary yeast microbiota of 73 university students (time 0) was evaluated and after 180 days (time 180) a new saliva collection of those that had presented *C. albicans* on the first collection was made. The isolates were analysed, in the two collection occasions on the basis of exoenzymes phospholipase and proteinase production, by colonial morphology, susceptibility profile to amphotericin B, fluconazole and itraconazole and according to molecular typing by RAPD. After isolation, the yeasts were storage on Sabouraud dextrose agar (SDA) and in sterile distilled water. After 180 days, typing tests were carried out again. All *C. albicans* isolates were phospholipase productors, in both collections, even though enzyme activity had oscillated between moderate and high at that period. The prevalent enzymotype at time 0 and 180 were, respectively, 22 and 32. In relation to the proteinase, 100% of the yeasts showed moderate enzyme activity at time 0. At time 180, this percentage was 85%, and the others didn`t show enzyme activity. After storage on SDA and in distilled water, it was detected activity alteration of both enzymes and consequent enzymotype change, in 40 and 30% of isolates, respectively. Eight different *C. albicans* morphotypes were identified at time 0 and just 50% were maintained at time 180. The most common morphotype was 000-0. After storage most isolates presented changes in the morphotype. All isolates showed susceptibility to the analysed antifungals at times 0 and 180, showing just one antifungaltype, the 111. Only one isolate, after storage on SDA had a profile change from susceptible to dose dependent susceptible to itraconazole in a way that the antifungaltype wasn`t changed. The molecular typing by RAPD, with primers OPA-09, OPB-11 and OPE-18, showed 19 distinct molecular types among first collection isolates and allowed to identify that one *C. albicans* isolate from time 180 wasn`t related with the isolate obtained at time 0, from the same individual. The others showed DNA fragment profiles related between collection occasions. After storage by both methods, every isolate showed genetic relatedness with the profile obtained at time 0. The obtained results showed that the preservation methods used in this study don`t allow stability maintenance of the phenotypical characteristics evaluated. On the other hand, besides biotypes generated stability, the molecular typing by RAPD showed the best discriminatory index, between methodologies used, ratifying its ability in discriminating isolates of the same specie and so, its utility in epidemiological inquiries.

Keywords: *Candida albicans*, phenotypic typing, molecular typing, storage, RAPD, phospholipase, proteinase, antifungal susceptibility testing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do enzimotipo 32 apresentado por isolados de *C. albicans*: (A) alta atividade de fosfolipase em ágar gema de ovo - código 3 (P*z* = 0,49); (B) atividade moderada de proteinase em ágar proteinase- código 2 (Pr*z* = 0,71) 42

Figura 2. Morfotipos apresentados por alguns isolados de *C. albicans*: (A) 000-0; (B) 123-0; (C) 733-0; (D) 123-4; (E) 752-6 45

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose do produto da extração do DNA fúngico por ocasião das duas coletas. A raia da esquerda mostra o marcador de tamanho de fragmentos Lambda DNA/Hind III Marker,2. Demais raias correspondem às amostras. (A) primeira coleta-tempo 0 (B) segunda coleta-tempo180 48

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do RAPD com os *primers* (A) OPA-9, (B) OPB-11, (C) OPE-18 e (D) SEQ-6. A raia da esquerda mostra o marcador de tamanho de fragmentos Lambda DNA/Hind III. Demais raias representam as amostras de DNA, amplificadas, obtidas na primeira coleta (tempo 0) 50

Figura 5. Dendrograma mostrando o agrupamento entre os isolados de *C. albicans* obtidos no tempo 0 (A-F), elaborado utilizando-se o algoritmo UPGMA/ Jaccard. Na linha horizontal estão indicados os coeficientes de similaridade genética (S_{AB}). A linha vertical representa o limiar S_{AB}=0,81, o qual separa os grupamentos relacionados e não relacionados. A direita do número correspondente ao isolado, encontra-se o respectivo tipo molecular..... 51

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do RAPD referente aos isolados de *C. albicans* nos tempos 0, 180, 180S e 180A, com os *primers* OPA-9, OPB-11 e OPE-18 dos indivíduos n°. (A) 1, (B) 4 e (C) 63 54

Figura 7. Dendrogramas mostrando o agrupamento dos isolados dos indivíduos n°. (A) 1, (B) 4 e (C) 63 obtidos nas diferentes ocasiões de coleta e pós armazenamento, elaborado à partir da análise conjunta da eletroforese com os *primers* OPA-9, OPB-11 e OPE-18 utilizando-se o algoritmo UPGMA/ Jaccard 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de P_Z e códigos relativos à atividade de fosfolipase de *C. albicans*, nas diferentes ocasiões de coleta e após armazenamento dos isolados 37

Tabela 2 - Atividade da enzima fosfolipase, dos isolados de *C. albicans,* nos tempos 0 e 180 e após armazenamento em ASD e água destilada esterilizada 38

Tabela 3 - Valores de Pr_Z e códigos relativos à atividade de proteinase de *C. albicans* nos diferentes momentos de coleta e após o armazenamento dos isolados 40

Tabela 4 - Atividade da enzima proteinase, dos isolados de *C. albicans,* nos tempos 0 e 180 e após armazenamento em ASD e água destilada esterilizada 41

Tabela 5 - Enzimotipos de *C. albicans* nos tempos 0 e 180 e após o armazenamento em ASD e água destilada esterilizada 43

Tabela 6 - Morfotipos de *C. albicans* nos diferentes momentos de coleta, e após o armazenamento em ASD e água destilada esterilizada 46

Tabela 7 - Concentrações inibitórias mínimas das cepas-padrão 47

Tabela 8 - Correlação genética, entre os 20 isolados de *C. albicans*, nos 2 momentos de coleta e após armazenamento, utilizando-se como referência o padrão obtido no tempo 0 52

Tabela 9 - Índices discriminatórios (ID) das metodologias utilizadas para a tipagem de *C. albicans*, analisadas individualmente e em conjunto 57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Esquema de codificação de morfotipos segundo modelo proposto por Hunter, Fraser e Mackenzie, 1989 26

Quadro 2 - Valores de CIM para interpretação de testes de suscetibilidade de leveduras frente a anfotericina B (GIRMENIA et al., 2006; PFALLER et al., 2007) e ao fluconazol e itraconazol (NCCLS, 2002) 29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome/ Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ASD	Ágar Sabouraud dextrose
ASM	American Society for Microbiology
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid/ Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic/ Ácido etileno diamino tetracético
EK	Electrophoretic Karyotyping/ Cariotipagem eletroforética
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
HIV	Human Immunodeficiency Vírus/ Vírus da Imunodeficiência Humana
ID	Índice Discriminatório
KNO_3	Nitrato de prata

Meio C	Meio para assimilação de fontes de cabono
Meio N	Meio para assimilação de fontes de nitrogênio
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis/ Eletroforese de enzima multilocus
MLP	Microsatellite length polymorphism/ Polimorfismo de comprimento de microssatélite
MLST	Multilocus sequence typing/ Tipagem de seqüência multilocus
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
MTL	Mating type like locus Loci tipo "mating type"
MVSP	Multi Variate Statistical Package
NCCLS	National Commitee for Clinical Laboratory Standards
PCR	Polymerase chain reaction/ Reação em cadeia da polimerase
pH	potential of Hidrogen/ potencial hidrogeniônico
RAPD	Randon amplified polymorphic DNA/ DNA polimórfico amplificado ao acaso
REA	Restriction Enzyme Analysis Análise com enzima de restrição
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism/ Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição
RNA	Ribonucleic Acid/ Ácido ribonucléico
RNAase	Enzima que catalisa hidrólise do RNA

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAP	Secreted aspartyl (acid) protease/ Aspartil proteinases secretadas
SDA	Sabouraud dextrose agar
SDC	Synthetic dextrose complete / Meio de cultura de dextrose sintética completo
Tempo 0	Primeira coleta
Tempo 180	Segunda coleta
Tempo 180A	Armazenamento em água destilada esterilizada por 180 dias
Tempo 180S	Armazenamento em ASD por 180 dias
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean/ Método da média aritmética não ponderada
USP	Universidade de São Paulo
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
YPD	Yeast Peptone Dextrose Meio de cultura a base de extrato de levedura, peptona e dextrose

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figures iii
Lista de tabelas iv
Lista de quadros v
Lista de abreviaturas e siglas vi
1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Gênero *Candida* e sua epidemiologia 2
1.2 Biologia da espécie *Candida albicans* 4
1.3 Métodos de armazenamento de leveduras 7
1.4 Biotipagem 9
1.4.1 Biotipagem fenotípica 10
1.4.2 Biotipagem molecular 12
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 16
2.1 Objetivo geral 17
2.2 Objetivos específicos 18
3. MATERIAL E MÉTODOS 19
3.1 Amostras clínicas 20
3.1.1 Estudo longitudinal 20
3.2 Isolamento das leveduras 20
3.3 Identificação das leveduras 21
3.3.1 Estudo da micromorfologia em ágar Tween-80 21
3.3.2 Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio –Auxanograma 22
3.3.3 Fermentação de carboidratos – Zimograma 22
3.3.4 Crescimento a 37°C e 45°C 23
3.4 Métodos de manutenção de culturas 23
3.4.1 Manutenção em ASD com transferências seriadas 23
3.4.2 Armazenamento em água destilada esterilizada 23
3.5 Biotipagem fenotípica 24
3.5.1 Pesquisa de fosfolipase 24
3.5.2 Pesquisa de proteinase 25
3.5.3 Morfotipagem 25
3.5.4 Antifungotipagem 27
3.6 Biotipagem molecular por RAPD 30
3.6.1 Extração do DNA genômico 30
3.6.2 Amplificação do DNA genômico por RAPD 31
3.6.3 Eletroforese em gel de agarose 32
3.6.4 Interpretação do padrão dos fragmentos de DNA 32
3.7 Análise dos dados 33
4. RESULTADOS 34
4.1 Biotipagem fenotípica 35
4.1.1 Pesquisa de fosfolipase e proteinase 35
4.1.2 Morfotipagem 44
4.1.3 Antifungotipagem 47
4.2 Biotipagem molecular por RAPD 48
4.3 Poder discriminatório das metodologias 56
5. DISCUSSÃO 58

5.1. Biotipagem fenotípica 59
5.1.1 Pesquisa de fosfolipase e proteinase 59
5.1.2 Morfotipagem 64
5.1.3 Antifungotipagem 65
5.2 Biotipagem molecular por RAPD 68
5.3 Poder discriminatório das metodologias 72
6. CONCLUSÕES 74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 76
APÊNDICES 90
ANEXO 109

1. Introdução

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 significante 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 freqüência 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 S*fi*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 seqüência 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, MTLα1 e MTLα2. Normalmente esse fungo diplóide, encontra-se em heterozigose (a/α) (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 MTLα) 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 sobrevida 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 seqüência multilocus (MLST) e o polimorfismo de comprimento de microssatélite (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 subseqüente 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; YUCESOY, 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.Justificativa e Objetivos

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A tipagem de *C. albicans* é importante em estudos epidemiológicos, permitindo identificar surtos de infecções, detectar possíveis transmissões cruzadas, conhecer o foco de origem de uma infecção e identificar cepas particularmente virulentas ou resistentes aos antifúngicos (GARCIA-HERMOSO et al., 2007; MEDEIROS et al., 2007; ODDS et al., 2006; QUINDÓS et al., 1992; SOLL, 2000). Desse modo, a estabilidade das propriedades utilizadas na caracterização dos isolados é determinante para a obtenção de resultados satisfatórios e fidedignos nesses ensaios, especialmente quando é necessária a comparação entre isolados obtidos em diferentes ocasiões ou ainda entre leveduras estocadas no laboratório e recém isoladas. A partir dessa necessidade é que são traçados os objetivos deste estudo.

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar isolados de *C. albicans* obtidos em duas ocasiões de coleta distintas, em um intervalo de seis meses, e após estocagem dos mesmos, por igual período em ASD e água destilada esterilizada, utilizando-se métodos fenotípicos e a tipagem molecular, a fim de verificar a manutenção das características avaliadas.

2.2 Objetivos Específicos

✓ Avaliar isolados de *C. albicans* obtidos nas diferentes ocasiões de coleta e após período de armazenamento, quanto:

- À produção de exoenzimas fosfolipase e proteinase;
- À morfotipagem em ágar extrato de malte;
- Ao perfil de suscetibilidade das leveduras, frente aos antifúngicos itraconazol, fluconazol e anfotericina B;
- À tipagem molecular por meio da análise do polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD);

✓ Averiguar o poder discriminatório das metodologias utilizadas no estudo para tipagem dos isolados

3.Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras clínicas

Foram avaliados quanto a presença de leveduras na cavidade bucal, 73 indivíduos adultos, aparentemente saudáveis, universitários, maiores de 18 anos, de ambos os sexos, que não estavam fazendo uso de antiinflamatórios esteroidais ou antimicrobianos, no momento da coleta, ou nos últimos 15 dias que a antecederam.

Foi coletado um volume de aproximadamente 2,0 mL de saliva, após estimulação com goma de mascar sem açúcar, em tubo de ensaio esterilizado, contendo pérolas de vidro,e imediatamente o tubo foi transportado ao Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP, para processamento (tempo 0).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP conforme protocolo CEP/FCFRP nº 70 (Anexo 1).

3.1.1 Estudo longitudinal

Após 180 dias (tempo 180), foram repetidas as coletas dos indivíduos que apresentaram positividade para *C. albicans* na primeira coleta.

3.2 Isolamento das leveduras

No Laboratório de Micologia Clínica, os tubos contendo saliva foram submetidos à agitação até a obtenção de uma suspensão uniforme. Alíquotas de 100 µL de saliva foram depositadas no centro de placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD)[1] com cloranfenicol, e em placa contendo CHROMagar ® *Candida* (DIFCO). A seguir, foi efetuada diluição 1:10 da saliva em solução fisiológica 0,85% esterilizada e dessa diluição foram

[1] As formulações dos meios de cultura utilizados no estudo, estão descritas no apêndice F

depositados 100 µL em placa contendo ASD. A semeadura foi feita com auxílio de um bastão de vidro, em forma de L (bastão de Drigalski), esterilizado, com posterior incubação a 35ºC, durante três dias, com observação diária.

As colônias com morfologia característica de levedura, isoladas de ambos os meios foram semeadas para tubo contendo ASD e incubadas a 35ºC por 48horas para então serem identificadas. Quando, em uma mesma placa, foram observadas colônias com morfotipos distintos, essas foram semeadas para diferentes tubos contendo ASD.

3.3 Identificação das leveduras

A identificação foi realizada de acordo com a metodologia clássica, empregando-se as seguintes provas: estudo da micromorfologia em ágar *tween*-80, assimilação de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio, fermentação de carboidratos e crescimento a 45ºC.

3.3.1 Estudo da micromorfologia em ágar *tween*-80

Para o cultivo em lâmina, o meio ágar fubá com *tween*-80 foi fundido e resfriado a aproximadamente 50ºC. Com o auxílio de uma pipeta de vidro esterilizada, o meio de cultura foi depositado sobre uma lâmina, contida em uma placa de microcultivo, formando uma camada espessa. Após solidificação, a levedura foi semeada no ágar em estrias e incubada a 25ºC, em câmara úmida, durante 4-7 dias. Decorrido esse período, foram observadas em microscópio óptico as seguintes estruturas: células leveduriformes, pseudomicélio, micélio e clamidósporos.

3.3.2 Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio - Auxanograma

Foi preparada uma suspensão das leveduras, com turvação equivalente ao padrão 2 da escala de McFarland, em 3 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, 1 mL da suspensão foi vertido em um tubo contendo, aproxidamente, 18 mL do meio N (meio isento de fontes de nitrogênio), e em outro contendo, aproxidamente, 18 mL do meio C (meio isento de fontes de carbono), ambos previamente fundidos e resfriados a, aproximadamente, 60ºC. Após agitação, os meios foram vertidos em placas de Petri. Uma vez solidificados os meios de cultura, foram depositadas, em pontos eqüidistantes, pequenas alíquotas de peptona e KNO_3, na placa contendo o meio N e, na placa contendo o meio C, os seguintes carboidratos: glicose, maltose, sacarose, lactose, inositol, eritritol, rafinose, D-galactose, L-ramnose, trealose, D-xilose, melibiose, melizitose e outros quando necessário. A leitura foi realizada após incubação de 24-48 horas a 35ºC, observando-se a presença ou não de halo de assimilação em torno da fonte de carbono ou nitrogênio utilizada.

3.3.3 Fermentação de carboidratos - Zimograma

Para avaliar a fermentação da glicose, maltose, sacarose e lactose, as leveduras foram semeadas, com auxílio de uma alça microbiológica, em tubos contendo meio de cultura correspondente ao carboidrato em teste, com tubo de Durhan em posição invertida. Os tubos foram incubados a 35ºC durante 10-14 dias. A prova de fermentação foi considerada positiva quando houve produção de bolhas de gás retidas no tubo de Durhan. As leituras foram feitas com 24-48 horas e no 7º dia. Os tubos que não apresentaram fermentação foram reincubados a 35ºC até o 14º dia.

3.3.4 Crescimento a 37°C e 45°C

Das leveduras que apresentaram clamidósporos no microcultivo, foram preparadas suspensões em água destilada esterilizada, com turvação equivalente ao padrão 2 da escala de McFarland. A seguir 5 µL foram depositados na superfície de duas placas de ágar Sabouraud dextrose. Uma das placas foi incubada a 37°C e a outra a 45°C, por 48 horas. O crescimento simultâneo nas duas temperaturas, foi considerado indicativo de *C. albicans* e excluída a presença de *C. dubliniensis* (GALES et al., 1999; MARIANO et al., 2003; TINTELNOT et al., 2000).

3.4 Métodos de manutenção de culturas

Os isolados identificados como *C. albicans*, foram armazenados, por um período de 180 dias, em ASD à temperatura ambiente com transferências e em água destilada esterilizada.

3.4.1 Manutenção em ASD com transferências seriadas

As leveduras puras foram semeadas na superfície do meio ASD, em tubo inclinado, com auxílio de alça microbiológica. Após crescimento por 24 horas a 35°C, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente com transferências para meios novos em intervalos de 90 dias. Ao final do período de armazenamento, que correspondeu a 180 dias, foi efetuada reativação dos isolados em placa de Petri contendo ASD e, novamente os testes fenotípicos e moleculares foram realizados.

3.4.2 Armazenamento em água destilada esterilizada

Após crescimento de cultura pura, em ASD, cerca de 8 a 10 colônias de leveduras foram suspensas em 4-5 mL de água destilada esterilizada, em tubos de ensaio com tampa de

rosca, vedados com filme plástico, os quais foram armazenados por 180 dias em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Foram utilizados dois tubos para cada isolado. Ao término do período de armazenamento as leveduras foram reativadas em placa contendo ASD e uma colônia isolada foi transferida para tubo contendo o mesmo meio de cultura. Antes que os testes de tipagem fossem repetidos, uma nova transferência para tubo contendo ASD foi processada. Para atestar a pureza das leveduras reativadas, as mesmas foram reisoladas em CHROMagar *Candida*.

3.5 Biotipagem fenotípica

Todos os isolados de *C. albicans* foram submetidos aos testes fenotípicos que compõem o estudo, após o primo isolamento, bem como após armazenamento em ASD (tempo 180S) e água destilada esterilizada (tempo 180A).

3.5.1 Pesquisa de fosfolipase

A produção de fosfolipase, pelos isolados, foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Price, Wilkinson e Gentry (1982). Cinco microlitros das suspensões de leveduras, preparadas com fisiológica 0,85% esterilizada, com turvação equivalente ao padrão 2 da escala de McFarland, foram inoculados em pontos eqüidistantes, no meio ágar fosfolipase. O teste foi realizado em duplicata. As placas contendo cinco inóculos de diferentes cultivos, permaneceram incubadas durante 4 dias a 35ºC. Os isolados foram considerados produtores de fosfolipase quando produziam zona branca de precipitação ao redor da colônia da levedura. A atividade da fosfolipase foi representada pelo valor P*z* (zona de atividade de fosfolipase) de acordo com a técnica descrita por Price, Wilkinson e Gentry (1982). O valor P*z* é a razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), ou seja, P*z* =dc/dcp. De acordo com esse sistema, P*z* =1 significa que o isolado não apresenta atividade da fosfolipase. Quanto menor o P*z*, maior a atividade enzimática da levedura. Os

resultados são apresentados em códigos de modo que o valor 1 representa Pz =1; o valor 2 utilizado para Pz entre 0,63-1,0 e, o valor 3 para Pz menor ou igual a 0,63.

3.5.2 Pesquisa de proteinase

A pesquisa de proteinase foi padronizada com base em estudos prévios (KUMAR ; KUMAR ; MENON, 2006; RUCHEL; TEGELLER ; TROST, 1982). As suspensões de leveduras, equivalentes ao padrão 2 da escala de McFarland, foram inoculadas em pontos eqüidistantes, no meio ágar proteinase. As placas contendo 5 inóculos, de diferentes cultivos, permaneceram incubadas durante 7 dias a 35ºC. O teste foi realizado em duplicata. A presença de enzima foi observada pela formação de um halo claro ao redor da colônia de levedura e, a atividade enzimática, medida pelo valor Prz (zona de atividade de proteinase), calculado conforme descrito para o valor Pz na avaliação da enzima fosfolipase.

3.5.3 Morfotipagem

A determinação dos morfotipos de *C. albicans*, foi realizada de acordo com o método descrito por Hunter, Fraser e Mackenzie (1989). Suspensões de leveduras, equivalentes ao padrão 2 da escala de McFarland, foram inoculadas em estrias paralelas na superfície do ágar extrato de malte, com o auxílio de um "swab", e incubadas a 30ºC por 10 dias. Após esse período foram avaliados os aspectos macromorfológicos da franja (presença, tamanho e textura) e superfície das colônias, os quais foram registrados em um código composto por 4 dígitos (Quadro 1).

Aspecto	Descrição	Código
Franja – Distribuição	Ausente	0
	Descontínua (< 20% da margem)	1
	Descontínua (20-50% da margem)	2
	Descontínua (60-90% da margem)	3
	Contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques	5
	Contínua, com filamentos paralelos	7
Franja – Largura	Ausente	0
	Menor ou igual a 2 mm	2
	Entre 3 e 5 mm	3
	Maior ou igual a 6 mm	5
Franja - Textura	Ausente	0
	Muito grosseira	1
	Grosseira	2
	Intermediária	3
	Fina	4
Superfície - Topografia	Lisa	0
	Nodular	1
	Escavada	2
	Crateriforme	4
	Crateriforme com dobras ou pregas	5
	Dobras ou pregas	6

Quadro 1 - Esquema de codificação de morfotipos segundo modelo proposto por Hunter, Fraser e Mackenzie, 1989

3.5.4 Antifungotipagem

As leveduras isoladas foram avaliadas quanto à suscetibilidade aos antifúngicos pela técnica da microdiluição em caldo, segundo o documento M-27A2 (2002) do NCCLS.

Os antifúngicos utilizados para a antifungotipagem dos isolados foram anfotericina B (Sigma, St. Louis, USA), fluconazol (Pfizer, Sandwich, Reino Unido) e itraconazol (Janssen, Beerse, Bélgica), preparados em solução, a partir de suas respectivas formas em pó, com dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec, RJ, Brasil), na concentração de 1.600 µg/mL para a anfotericina B e o itraconazol e, em água destilada, na concentração de 1.280 µg/µL para o fluconazol (NCCLS, 2002).

Preparação da diluição dos antifúngicos: a partir da solução estoque de cada droga, foram preparadas, com RPMI-1640, soluções teste com duas vezes a concentração final desejada: anfotericina B, 32 a 0,06 µg/mL; fluconazol, 128 a 0,25 µg/mL e itraconazol 32 a 0,06 µg/mL. Alíquotas de 100 µL de cada concentração foram dispensadas, em seqüência, nas placas de microdiluição, de modo que os poços identificados com os números 2 a 11, apresentassem as 10 diferentes concentrações do antifúngico, de forma decrescente. Os poços identificados com os números 1 e 12 continham os controles do meio e do inóculo, respectivamente. As placas foram estocadas a -20°C por até 30 dias.

Meio de cultivo e preparação do inóculo: o meio de cultivo utilizado, foi o meio líquido RPMI-1640 GIBCO® BRL (Life Technologies, Grand Island, EUA), com glutamina, sem bicarbonato de sódio e tamponado com MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico) 0,165 mol/L a pH 7,0. Para o preparo do inóculo, os isolados foram cultivados em ASD e incubados à temperatura de 35°C, durante 24 horas. A suspensão inicial do inóculo foi preparada em água deionizada, esterilizada, de modo que se obtivesse um inóculo equivalente à escala 0,5 de McFarland, ajustado por meio da contagem de células em câmara de Neubauer, para obtenção de concentração igual 1 a 5 x 10^6 UFC/mL. A viabilidade e a pureza

do inóculo foram controladas por cultivos de alíquotas da suspensão em placas de ASD, incubadas à 35°C por 48horas. As cepas controles utilizadas foram *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258.

Diluição em caldo realizada em placa de microdiluição: as placas contendo os antifúngicos ficaram à temperatura ambiente, por aproximadamente 1 hora, antes do uso. Tendo em vista a obtenção de solução balanceada de inóculo-meio, a preparação inicial de cada microrganismo foi diluída a 1:50, seguida de uma diluição 1:20 em RPMI-1640, o que resultou num inóculo com concentração entre 1 a 5 x 10^3 UFC/mL. Esse inóculo concentrado duas vezes foi diluído 1:2, quando inoculado com o antifúngico, de modo que atingiu a concentração desejada (0,5 a 2,5 x 10^3 UFC/mL).

Nos poços das colunas de 2 a 12 da placa foram colocados 100 µL da suspensão do inóculo em RPMI-1640. Os poços pertencentes à coluna identificada com o número 12, de cada placa de microdiluição, foram utilizados como controles positivos, sendo neles dispensadas a solução do inóculo e 100 µL de RPMI-1640. Os poços da coluna número 1 foram considerados como controles negativos, contendo apenas 200 µL do meio RPMI-1640. As cepas controle receberam o mesmo tratamento e foram colocadas em cada placa.

Incubação, leitura e interpretação: as placas foram incubadas à 35°C, durante 48 horas. No momento da leitura, o crescimento do microrganismo, no poço do controle positivo, coluna 12, foi comparado visualmente ao crescimento nos poços referentes às diferentes concentrações avaliadas. Nos ensaios com os azólicos, a menor concentração capaz de inibir, em torno de 50% do crescimento do microrganismo avaliado, em relação ao poço controle, foi identificada como concentração inibitória mínima – CIM da droga para este microrganismo conforme sugerido pelo NCCLS (2002). Os valores de ponto de corte, para interpretação dos ensaios de sensibilidade, foram os sugeridos pelo Comitê supra mencionado, e são os apresentados no quadro 2. Para a anfotericina B a CIM foi considerada a menor concentração

capaz de inibir qualquer crescimento visivelmente detectável. Devido ao estreito intervalo de CIMs obtidas para esse antifúngico, o estabelecimento de um ponto de corte tem sido problemático e os valores ainda não estão definidos. Entretanto, CIMs maiores que 1μg/mL não são, usualmente, encontradas para isolados de *Candida* e, quando ocorrem, esses isolados são possivelmente resistentes ou pelo menos requerem altas doses de anfotericina B para a efetividade do tratamento (GIRMENIA et al., 2006; PFALLER et al., 2007). Desse modo foi adotado esse critério para definir sensibilidade ou resistência a esse antifúngico (Quadro 2). As leveduras foram codificadas por meio de um sistema numérico de 3 dígitos no qual foi atribuído o número 1, 2 ou 3 conforme a sensibilidade, resistência ou sensibilidade dose-dependente ao antifúngico, respectivamente. Cada dígito corresponde a um antifúngico, na ordem em que são apresentados no quadro 2. Por exemplo, um isolado com o antifungotipo 111, denota sensibilidade aos três antifúngicos utilizados no estudo. Um antifungotipo 122 refere-se a um isolado que seja sensível à anfotericina B e resistente ao fluconazol e ao itraconazol.

Antifúngico	Sensível (μg/mL)	S-DD* (μg/mL)	Resistente (μg/mL)
Anfotericina B	≤1	-	≥2
Fluconazol	≤8	16-32	≥64
Itraconazol	≤0,125	0,25-0,5	≥1

Quadro 2 - Valores de CIM para interpretação de testes de suscetibilidade de leveduras frente a anfotericina B (GIRMENIA et al., 2006; PFALLER et al., 2007) e ao fluconazol e itraconazol (NCCLS, 2002)

- S-DD: Sensibilidade dose-dependente

3.6 Biotipagem molecular por RAPD

Após identificação de *C. albicans* nos tempos 0 e 180, o DNA dos isolados foi extraído e armazenado a -20°C até o momento da tipagem molecular. Após 180 dias de armazenamento em ASD e água destilada esterilizada, os isolados foram novamente submetidos à extração de DNA.

3.6.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA das células leveduriformes, foi baseada na metodologia descrita por Jain et al. (2001). As amostras de *C. albicans* foram subcultivadas em caldo YPD a 35°C por 24 horas.

Após a incubação, as suspensões de leveduras foram transferidas para tubos tipo Falcon de 15 mL, e centrifugadas a 3214 *g* por 5 minutos. Os sedimentos das leveduras foram lavados com solução tamponante tris-NaCl[1]. Nova centrifugação foi realizada e foi adicionada em relação à quantidade das leveduras, uma proporção 1:1 (v/v) de pérolas de vidro (2 mm) tratadas com dietil pirocarbonato 0,1% (DEPC Sigma) para inativação de endonucleases e 1:3 de tampão de extração. Após agitação vigorosa por 10 minutos, 500 µL da parte líquida foram transferidos para tubo tipo *eppendorf* de 2 mL e 500 µL adicionados de mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, para que o lisado fosse desproteinizado. Essa mistura foi homogeneizada, cuidadosamente, manualmente, por 15 segundos, para então ser centrifugada a 15294 *g* por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo *eppendorf* e foi adicionado isopropanol absoluto na proporção de 1:1, para precipitação do DNA genômico. O tubo foi incubado, a –20°C, por aproximadamente 18 horas.

O tubo contendo o DNA foi então, centrifugado a 15294 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi acrescentado 1 mL de etanol 70% refrigerado

[1] As formulações dos reagentes utilizados no estudo, estão descritas no apêndice G

a 2 a 8°C. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi novamente desprezado e o tubo contendo a amostra de DNA permaneceu, à temperatura ambiente, até secagem do sedimento. Um volume de 75 µL de água mili-Q foi adicionado e o tubo foi refrigerado a 4°C por aproximadamente 18horas. A seguir a amostra foi tratada com 1 µL de RNAse a 1mg/mL e incubada 1 hora a 37°C. Após esse tempo de incubação, a amostra foi conservada a -20°C até o momento do uso.

A concentração do DNA foi determinada por meio da medida de absorbância em 260 nm e 280 nm de comprimento de onda. Uma relação A_{260}/A_{280} de 1.8 a 2.1 foi considerada aceitável.

Para se determinar a qualidade do DNA obtido, este foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando o marcador de tamanho de fragmentos Lambda DNA/Hind III Marker, 2 (DNA Ladder- Fermentas) como referência. Após eletroforese em solução tamponante de Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 X, a 90V por 90 minutos, o gel foi corado com brometo de etídio (1µg/mL), visualizado em transiluminador ultravioleta e fotodocumentado por sistema de captação de imagens (Alpha-Innotech).

3.6.2 Amplificação do DNA genômico por RAPD

O RAPD foi realizado utilizando-se quatro *primers*, previamente descritos, OPE-18 (5'GGACTGCAGA3'), OPB-11 (5'GTAGACCCGT3'), OPA-9 (5'GGGTAACGCC3'), SEQ-6 (5'CCCGTCAGCA3') (BAUTISTA- MUÑOZ et al. 2003; JAIN et al. 2001; PINTO, 2004; RIEDERER et al., 2002).

As amostras de DNA das leveduras isoladas de 20 estudantes, dos quais foram isolados *C. albicans* nas duas ocasiões de coleta, foram amplificadas. O DNA obtido após 180 dias de armazenamento pelos dois métodos descritos, também foi processado, totalizando 80 amostras para cada *primer*. A amplificação do DNA foi padronizada com base em estudos

precedentes (BAUTISTA-MUNOZ et al., 2003; LOCKHART et al., 1997; VALÉRIO; WEIKERT-OLIVEIRA; RESENDE, 2006), com algumas modificações. Para um volume final de 25 µL, foram adicionados 2,5 µL do tampão da enzima com KCl 10X (Fermentas), contendo $MgCl_2$ a 3 mM, 0,2 mM de dNTPs, aproximadamente 50 ng do DNA da levedura, 0,4 µM de *primer*, 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e água mili-Q suficiente para completar o volume de reação desejado.

A PCR foi realizada em termociclador convencional (Mastercycler – Eppendorf), de acordo com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94ºC por 5 minuto, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 94ºC por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 36ºC por 1 minuto e extensão a 72ºC por 2 minutos, concluindo com extensão final a 72ºC, por 10 minutos. Os produtos resultantes da amplificação, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, para determinação dos perfis moleculares.

3.6.3 Eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (BioAgency) a 1%, em tampão TBE 0,5 X. A eletroforese foi processada a 80V, 100mA, por 3 horas. Em cada gel foi incluído o marcador de tamanho de fragmentos Lambda DNA/Hind III Marker, 2 (DNA Ladder- Fermentas). Após a separação eletroforética, os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados à luz ultravioleta e fotodocumentados.

3.6.4 Interpretação do padrão dos fragmentos de DNA

O tamanho dos fragmentos de DNA gerados foram determinados, por comparação, com o marcador de tamanho de fragmentos utilizado. O padrão de fragmentos, foi visualmente inspecionado e, as imagens obtidas no tempo 0 foram confrontadas àquelas

obtidas nos tempos 180, 180S e 180A. A análise foi feita considerando-se o número de fragmentos obtidos bem como a presença ou ausência destes.

3.7 Análise dos dados

A correlação genética entre os isolados, foi verificada pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA), utilizando-se o coeficiente de Jaccard (S*j*), no programa de computador "Multi Variate Statistical Package 3.0" (MVSP 3.0). O coeficiente de Jaccard baseia-se na posição dos fragmentos, e é calculado por intermédio da fórmula $Sj = n_{AB}/ (n_{AB} + a + b)$ onde n_{AB} é o número de fragmentos partilhados pelos dois isolados (A e B), a é o número de fragmentos presentes apenas no primeiro isolado e b o número de fragmentos presentes apenas no segundo isolado. Um valor de S*j* de 1,00, representa que os isolados compartilham o mesmo genótipo ou tipo molecular, valores de S*j* entre 0,81 e 0,99 representam isolados geneticamente relacionados e um valor de S*j* menor que 0,80, representa isolados distintos (ERGON; GULAY, 2005).

O índice numérico utilizado para calcular o poder discriminatório, que é a probabilidade que dois isolados não relacionados, extraídos da população, sejam colocados em diferentes grupos de tipagem, foi calculado, para cada metodologia, por meio do índice de diversidade de Simpson, segundo fórmula descrita por Hunter e Gaston (1988):

$$ID = 1 - \frac{1}{N(N\text{-}1)} \sum_{j=1}^{s} n_j (n_j - 1)$$

Onde *N* é o número total de isolados na amostragem da população, *s* é o total de tipos descritos e n_j é o número de isolados pertencentes a um determinado tipo (^{j}).

A análise estatística dos dados para comparação dos valores Pz, Prz e S*j* nas diferentes ocasiões e após armazenamento foi realizada utilizando-se o teste não paramétrico de Signal.

4.Resultados

4 RESULTADOS

Dentre as amostras de saliva dos 73 estudantes universitários avaliados no estudo por ocasião da primeira coleta (tempo 0), 28/38% apresentaram a levedura *C. albicans*; Destes, somente 20 apresentaram *C. albicans* no momento da segunda coleta (tempo 180), resultando em 20 casos de positividade simultânea para a levedura nas duas ocasiões (Apêndice A), os quais foram avaliados quanto as características fenotípicas e por RAPD.

Foram biotipados também os isolados de *C. albicans* obtidos no tempo 0, após armazenamento de 180 dias pelos métodos descritos.

4.1 Biotipagem fenotípica

4.1.1 Pesquisa de fosfolipase e proteinase

Todos os 20 isolados de *C. albicans,* oriundos da primeira coleta (tempo 0) utilizados no estudo, foram produtores da enzima fosfolipase (Tabela 1). Onze (55%) apresentaram atividade moderada, com P*z* variando de 0,65 a 0,72, representados pelo código 2. Os demais (9/45%) demonstraram alta atividade de fosfolipase e foram codificados com o algarismo 3 (Pz≤ 0,63) conforme demonstra a tabela 2. A média dos valores de P*z* e o desvio padrão (s), respectivamente, foram 0,65 e 0,05 (Tabela 1). Quanto aos isolados recuperados no tempo 180, 8 (40%) isolados, apresentaram atividade moderada da enzima e 12 (60%) alta atividade de fosfolipase (Tabela 2). Nesse momento, a média de P*z* foi 0,61 e o desvio padrão 0,16 (Tabela 1).

Após armazenamento em ASD (tempo 180S), 19 isolados de *C. albicans* mantiveram a atividade de fosfolipase sendo que 6 (30%) apresentaram atividade moderada e 13(65%), alta atividade da enzima. Um (5%) não apresentou atividade da enzima (Tabela 2). A média da atividade enzimática foi 0,60 e o desvio padrão 0,21 (Tabela 1). Com relação ao

armazenamento em água (tempo 180A), 16 mantiveram atividade de fosfolipase sendo que 4 (20%) e 12 (60%) isolados, apresentaram atividade moderada e alta, respectivamente. Quatro (20%) não apresentaram atividade após essa estocagem (Tabelas 1 e 2). A média da atividade e o desvio padrão, foram, respectivamente 0,66 e 0,22.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($\alpha \leq 0,05$) entre os valores médios de P*z* obtidos no tempo 0, quando esses foram comparados àqueles obtidos nos tempos 180 (P=0,360), 180S (P= 0,260) e 180A (P= 0,820).

Tabela 1 - Valores de P_Z e códigos relativos à atividade de fosfolipase de *C. albicans*, nas diferentes ocasiões de coleta e após armazenamento dos isolados

Isolado nº	Tempo 0		Tempo 180		Tempo 180S		Tempo 180A	
	P_Z	código	P_Z	código	P_Z	Código	P_Z	Código
1	0,63	3	0,84	2	0,77	2	0,78	2
4	0,70	2	0,60	3	0,77	2	0,92	2
13	0,67	2	0,88	2	1	1	0,76	2
15	0,65	2	0,50	3	0,54	3	1	1
24	0,63	3	0,75	2	0,74	2	0,80	2
29	0,72	2	0,93	2	0,92	2	1	1
30	0,70	2	0,52	3	0,42	3	0,56	3
34	0,61	3	0,65	2	0,53	3	0,60	3
40	0,69	2	0,68	2	0,92	2	1	1
41	0,58	3	0,58	3	0,56	3	0,60	3
42	0,63	3	0,84	2	0,92	2	1	1
45	0,57	3	0,70	2	0,46	3	0,45	3
53	0,63	3	0,50	3	0,41	3	0,50	3
60	0,70	2	0,47	3	0,41	3	0,51	3
61	0,69	2	0,48	3	0,45	3	0,50	3
62	0,60	3	0,48	3	0,36	3	0,49	3
63	0,67	2	0,47	3	0,48	3	0,50	3
70	0,67	2	0,46	3	0,47	3	0,47	3
71	0,68	2	0,45	3	0,45	3	0,46	3
73	0,54	3	0,44	3	0,44	3	0,41	3
Média	0,65	-	0,61	-	0,60	-	0,66	-
Desvio padrão	0,05	-	0,16	-	0,21	-	0,22	-

tempo 0: primeira coleta; tempo 180: segunda coleta; tempo 180S: 180 dias de armazenamento no ASD; tempo 180A: 180 dias de armazenamento na água; $P_Z = 1$: cepa não produtora da enzima; $0,64 \leq P_Z \leq 0,99$: atividade moderada da enzima; $P_Z \leq 0,63$: cepa fortemente produtora de enzima.

Tabela 2 - Atividade da enzima fosfolipase, dos isolados de *C. albicans,* nos tempos 0 e 180 e após armazenamento em ASD e água destilada esterilizada

Atividade Enzimática	Tempo 0		Tempo 180		Tempo 180S		Tempo 180A	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Ausente	0	0	0	0	1	5	4	20
Moderada	11	55	8	40	6	30	4	20
Alta	9	45	12	60	13	65	12	60
Total	20	100	20	100	20	100	20	100

ausente: $P_Z = 1$; moderada: $0,64 \leq P_Z \leq 0,99$; alta: P_Z Z $\leq 0,63$; tempo 0: primeira coleta; tempo 180: segunda coleta; tempo 180S: 180 dias de armazenamento em ASD; tempo 180A: 180 dias de armazenamento em água destilada esterilizada.

A enzima proteinase foi produzida por 100% dos isolados de *C. albicans* na primeira coleta. Todos apresentaram atividade moderada, com Prz variando de 0,64 a 0,89. A média do valor Prz foi 0,77 e desvio padrão 0,08 (Tabela 3). No tempo 180, 17 (85%) isolados de *C. albicans* apresentaram atividade de proteinase moderada, enquanto que 3 (15%) não demonstraram atividade da enzima pela metodologia utilizada (Tabela 4). O valor médio de Prz foi 0,83 e o desvio padrão 0,10.

Dezessete (85%) e 14 (70%) isolados mantiveram a atividade da enzima após armazenamento em ASD e em água destilada esterilizada, respectivamente. Os demais não apresentaram atividade de proteinase após estocagem (Tabela 4). Após armazenamento por 180 dias em ASD, a média da atividade enzimática (Prz) foi 0,80 e o desvio padrão 0,10. Com relação a análise da atividade enzimática após manutenção em água destilada esterilizada por igual período, a média da atividade enzimática da proteinase e o desvio padrão foram, respectivamente, 0,84 e 0,12 (Tabela 3). Duas leveduras (isolados n°. 60 e 62) deixaram de apresentar atividade após estocagem pelos dois métodos referidos, concomitantemente.

Não foram observadas diferenças estatísticas, significativas entre o valor médio de Prz dos isolados do tempo 0 quando comparado aos dos tempos 180 (P= 0,160) e 180S (P=0,820). Por outro lado, a comparação da média da atividade de proteinase dos isolados da primeira coleta com àquela obtida após armazenamento em água destilada esterilizada, mostrou diferença significativa (P= 0,044).

Tabela 3 - Valores de Pr_Z e códigos relativos à atividade de proteinase de *C. albicans* nos diferentes momentos de coleta e após o armazenamento dos isolados

Isolado nº	Tempo 0		Tempo 180		Tempo 180S		Tempo 180A	
	Pr_Z	Código	Pr_Z	código	Pr_Z	Código	Pr_Z	Código
1	0,78	2	0,78	2	0,84	2	1,00	1
4	0,89	2	0,82	2	0,78	2	1,00	1
13	0,78	2	0,86	2	0,90	2	0,81	2
15	0,83	2	0,73	2	0,78	2	0,90	2
24	0,80	2	0,72	2	0,76	2	0,69	2
29	0,80	2	0,9	2	0,84	2	0,76	2
30	0,67	2	0,84	2	0,70	2	0,74	2
34	0,78	2	0,8	2	0,69	2	0,68	2
40	0,78	2	0,85	2	0,66	2	0,80	2
41	0,79	2	0,82	2	0,74	2	0,88	2
42	0,64	2	0,96	2	0,79	2	0,66	2
45	0,81	2	0,80	2	0,74	2	0,77	2
53	0,82	2	0,71	2	0,74	2	0,74	2
60	0,88	2	0,80	2	1	1	1	1
61	0,64	2	0,72	2	0,80	2	0,74	2
62	0,88	2	1	1	1	1	1	1
63	0,68	2	1	1	0,76	2	1	1
70	0,73	2	1	1	1	1	0,89	2
71	0,74	2	0,76	2	0,72	2	1	1
73	0,68	2	0,70	2	0,81	2	0,76	2
Média	0,77	-	0,83	-	0,80	-	0,84	-
Desvio padrão	0,08	-	0,10	-	0,10	-	0,12	-

tempo 0: primeira coleta; tempo 180: segunda coleta; tempo 180S: 180 dias de armazenamento no ágar Sabouraud dextrose; tempo 180A: 180 dias de armazenamento na água; $Pr_Z = 1$: cepa não produtora da enzima; $0,64 \leq Pr_Z \leq 0,99$: atividade moderada da enzima; $Pr_Z \leq 0,63$: cepa fortemente produtora de enzima.

Tabela 4 - Atividade da enzima proteinase, dos isolados de *C. albicans,* nos tempos 0 e 180 e após armazenamento em ASD e água destilada esterilizada

Atividade Enzimática	Tempo 0		Tempo 180		Tempo 180S		Tempo 180A	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Ausente	0	0	3	15	3	15	6	30
Moderada	20	100	17	85	17	85	14	70
Alta	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	20	100	20	100	20	100	20	100

ausente: $Pr_Z = 1$; moderada: $0,64 \leq Pr_Z \leq 0,99$; alta: $Pr_Z \leq 0,63$; tempo 0: primeira coleta; tempo 180: segunda coleta; tempo 180S: 180 dias de armazenamento em ASD; tempo 180A: 180 dias de armazenamento em água destilada esterilizada.

O enzimotipo prevalente no tempo 0 foi o 22 (atividade moderada para ambas as enzimas), o qual foi apresentado por 11 (55%) isolados, seguido pelo 32 (alta atividade de fosfolipase e atividade moderada de proteinase) conforme demonstrado na tabela 5. No tempo 180, a prevalência foi do enzimotipo 32 apresentado por 9 (45%) isolados. Os demais enzimotipos encontrados foram o 22 e o 31 (alta atividade de fosfolipase e ausência de atividade de proteinase), respectivamente em 40% e 15% das leveduras analisadas (Tabela 5). A figura 1 ilustra o enzimotipo 32, mostrado por isolados de *C. albicans*.

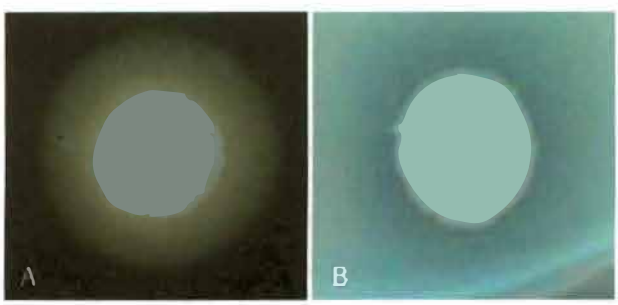

Figura 1. Representação do enzimotipo 32 apresentado por isolados de *C. albicans*: (A) alta atividade de fosfolipase em ágar gema de ovo - código 3 (P*z* =0,49); (B) atividade moderada de proteinase em ágar proteinase- código 2 (Pr*z* =0,71)

Tabela 5 - Enzimotipos de *C. albicans* nos tempos 0 e 180 e após o armazenamento em ASD e água destilada esterilizada

Isolado nº	Tempo 0	Tempo 180	Tempo 180S	Tempo 180A
1	32	22	22	21
4	22	32	22	21
13	22	22	12	22
15	22	32	32	12
24	32	22	22	22
29	22	22	22	12
30	22	32	32	32
34	32	22	32	32
40	22	22	22	12
41	32	32	32	32
42	32	22	22	12
45	32	22	32	32
53	32	32	32	32
60	22	32	31	31
61	22	32	32	32
62	32	31	31	31
63	22	31	32	31
70	22	31	31	32
71	22	32	32	31
73	32	32	32	32

tempo 0: primeira coleta; tempo 180: segunda coleta; tempo 180S: 180 dias de armazenamento no ágar Sabouraud dextrose; tempo 180A: 180 dias de armazenamento na água; primeiro dígito refere-se à atividade de fosfolipase e o segundo a de proteinase.

Apenas 5 (25%) isolados (nº13, 29, 40, 53 e 73) mantiveram o mesmo enzimotipo nos dois momentos de coleta. Com relação à estocagem em ASD, 8 (40%) mantiveram o enzimotipo obtido no tempo 0 (isolados nº 4, 29, 34, 40, 41, 45, 53 e 73). Após estocagem, em água destilada esterilizada, 6 (30%), apresentaram enzimotipo idêntico ao do tempo 0 (isolados nº 13, 34, 41, 45, 53,e 73).

4.1.2 Morfotipagem

Foram identificados oito morfotipos diferentes de *C. albicans* no momento da primeira coleta (000-0, 223-0, 323-0, 333-0, 334-0, 723-0, 733-0 e 734-0) conforme demonstrado na tabela 6. Todos apresentaram a superfície lisa (XXX-0). O morfotipo mais comum, de acordo com o esquema proposto por Hunter, Fraser e Mackenzie (1989), mostrado por 7 *C. albicans*, foi o 000-0, que representa isolados sem franjas e com a topografia da superfície da colônia lisa. Por ocasião da segunda coleta, foram também identificados oito morfotipos distintos (000-0, 123-0, 323-0, 223-0, 324-0, 333-0, 732-0 e 734-0), os quais estão ilustrados na tabela 6. O predomínio foi do 000-0, apresentado por 11 *C. albicans*. Todos os isolados da segunda coleta também mostraram a superfície lisa. Dez (50%) isolados (nº 1, 24, 29, 53, 60, 62, 63, 70, 71 e 73) mantiveram o morfotipo nos tempos 0 e 180 (Tabela 6). Com relação a morfotipagem, após armazenamento em ASD e água destilada esterilizada, respectivamente, 3/15% (nº 15, 29 e 45) e 4/20% (nº 1, 29, 60 e 73) isolados, mantiveram o morfotipo apresentado antes da estocagem (Tabela 6). A superfície da colônia que no tempo 0 apresentou-se lisa para todos os isolados, após estocagem pelos métodos utilizados mostrou-se crateriforme ou com dobras e pregas em 3/15% leveduras (nº 15, 30 e 63) armazenadas em água e crateriforme para 6/30% (nº 13, 24, 30, 40, 42 e 63) armazenadas em ASD. Na figura 2 estão representados alguns morfotipos apresentados pelos isolados do presente estudo.

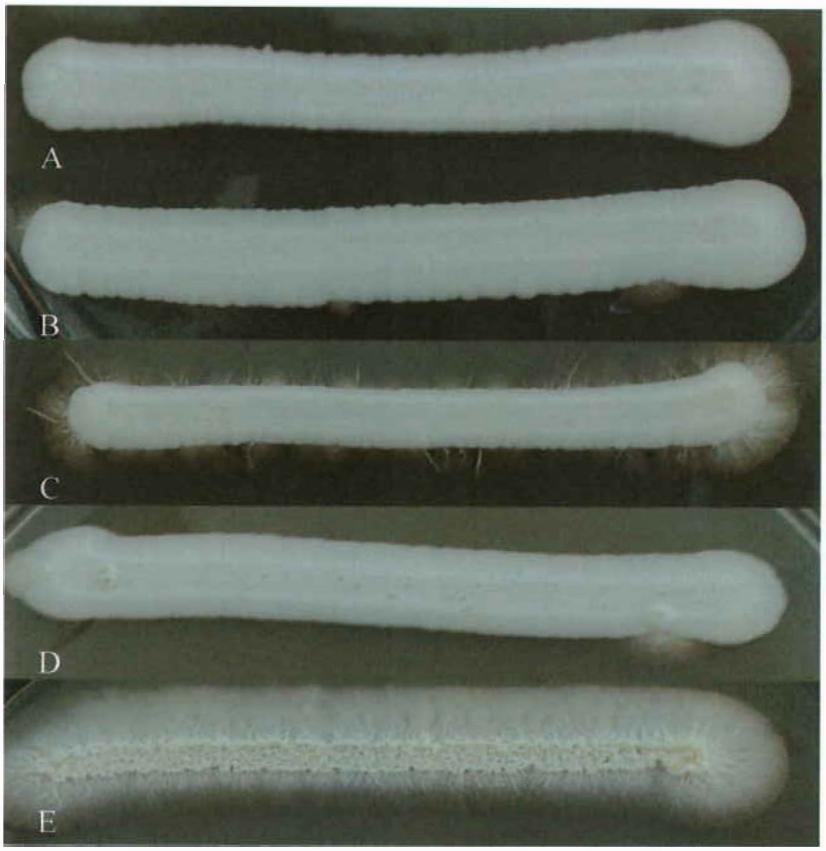

Figura 2. Morfotipos apresentados por alguns isolados de *C. albicans*: (A) 000-0; (B) 123-0; (C) 733-0; (D) 123-4; (E) 752-6

Tabela 6 - Morfotipos de *C. albicans* nos diferentes momentos de coleta, e após o armazenamento em ASD e água destilada esterilizada

Isolado nº	Tempo 0	Tempo 180	Tempo 180S	Tempo 180A
1	000-0	000-0	234-0	000-0
4	334-0	000-0	732-0	332-0
13	723-0	223-0	723-4	223-0
15	733-0	000-0	733-0	752-6
24	323-0	323-0	123-4	123-0
29	734-0	734-0	734-0	734-0
30	333-0	123-0	323-4	323-6
34	333-0	123-0	123-0	123-0
40	223-0	000-0	223-4	000-0
41	733-0	000-0	123-0	123-0
42	334-0	324-0	234-4	333-0
45	223-0	000-0	223-0	000-0
53	323-0	323-0	333-0	233-0
60	000-0	000-0	733-0	000-0
61	000-0	732-0	333-0	322-0
62	000-0	000-0	123-0	323-0
63	000-0	000-0	323-4	323-4
70	000-0	000-0	333-0	233-0
71	333-0	333-0	332-0	332-0
73	000-0	000-0	123-0	000-0

tempo 0: primeira coleta; tempo 180:segunda coleta; tempo 180S: 180 dias de armazenamento no ASD; tempo 180A: 180 dias de armazenamento em água destilada esterilizada.

4.1.3 Antifungotipagem

De acordo com a CIM (concentração inibitória mínima), 100% das leveduras mostraram sensibilidade aos antifúngicos analisados, por ocasião da primeira (tempo 0) e segunda coletas (tempo 180), denotando o antifungotipo 111. A CIM dos isolados nos tempos 0, 180 e após armazenamento é detalhada nos apêndices B, C e D.

Após armazenamento em água destilada esterilizada todos isolados de *C. albicans* foram sensíveis a anfotericina B, fluconazol e itraconazol, mantendo o antifungotipo 111. Apenas o isolado de nº 45 mudou o perfil de sensível para dose dependente (S-DD) ao itraconazol após armazenamento em ASD com alteração de CIM de 0,06 μg/ mL para 0,25 μg/ mL (Apêndice C). Somente nesse caso, o antifungotipo mudou de 111 para 113.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) obtidas com as cepas-padrão *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 estão de acordo com os valores de referência descritos no documento M27-A2 (NCCLS, 2002), demonstrando a validade do ensaio (Tabela 7).

Tabela 7 - Concentrações inibitórias mínimas das cepas-padrão

Cepa	Antifúngico	CIM de referência (μg/mL)*	CIM obtida (μg/mL)
C. parapsilosis ATCC 22019	Anfotericina B	0,5-4,0	1,0
	Fluconazol	1,0-4,0	1,0
	Itraconazol	0,125-0,5	0,125
C. krusei ATCC 6258	Anfotericina B	1,0-4,0	2,0
	Fluconazol	16-64	32
	Itraconazol	0,25-1,0	0,25

* Valores de referência segundo o documento M27-A2 (NCCLS, 2002).

4.2 Biotipagem molecular por RAPD

A concentração de DNA foi medida em espectrofotômetro, e a relação A_{260}/A_{280} foi superior a 1.8 para todas as amostras. A eletroforese em gel de agarose do material genômico dos isolados revelou um fragmento de DNA único e de boa qualidade, de tamanho superior à 20kb (Figura 3).

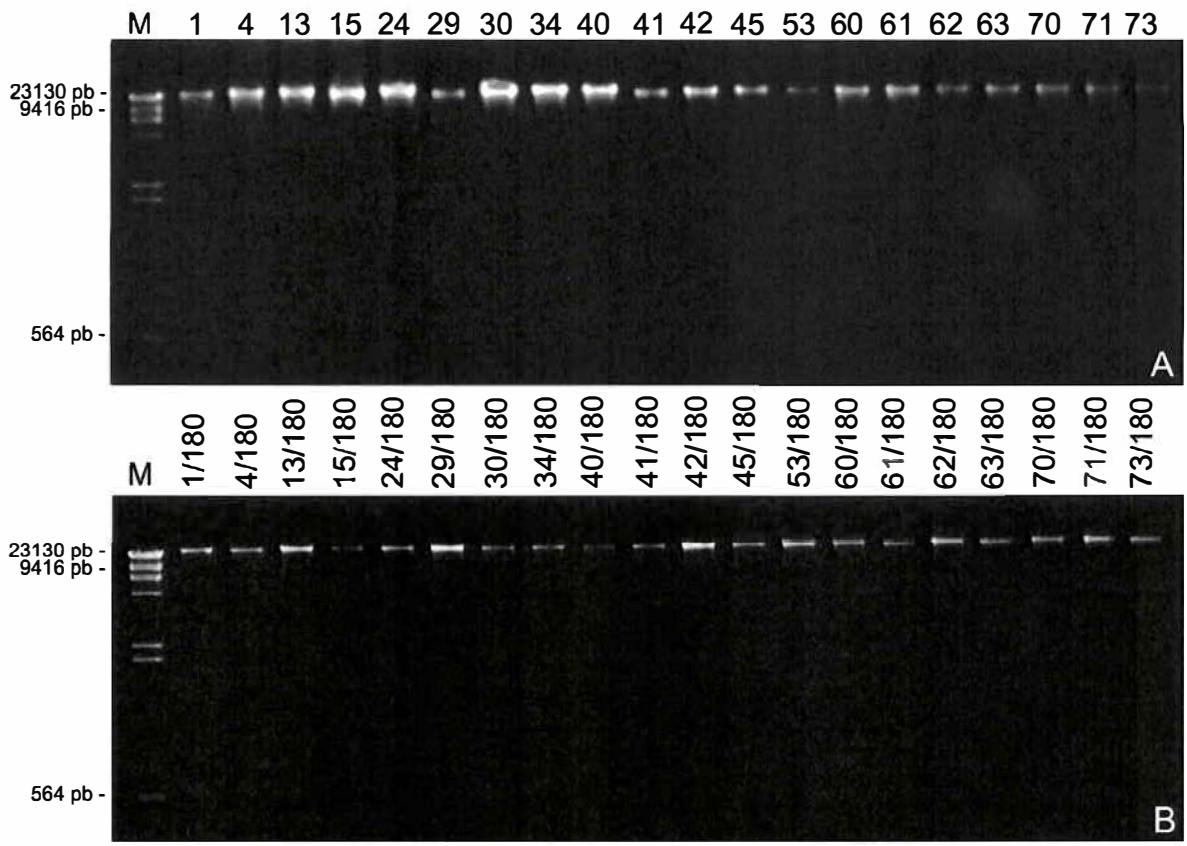

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose do produto da extração do DNA fúngico por ocasião das duas coletas. A raia da esquerda mostra o marcador de tamanho de fragmentos Lambda DNA/Hind III Marker,2. Demais raias correspondem às amostras. (A) primeira coleta-tempo 0 (B) segunda coleta-tempo180

A análise dos perfis moleculares gerados pelo RAPD utilizando-se os *primers* OPA-9, OPB-11 e OPE-18, revelou considerável heterogeneidade entre os isolados de *C. albicans* obtidos por ocasião da primeira coleta (Figura 4). O mesmo não ocorreu com o *primer* SEQ-6, que mostrou polimorfismo de fragmentos, de modo que, o resultado deste *primer*, não foi considerado para elaboração da árvore filogenética ou dendrograma pelo algoritmo UPGMA/ Jaccard, que determinou a correlação genética entre as leveduras estudadas (Figura 4). Foram observados 6 grupamentos (A, B, C, D, E e F) e 19 tipos moleculares distintos (A1; B1; C1; D1 a D4; E1 e E2; F1 a F10) entre os 20 isolados de *C. albicans* analisados. Os isolados 63 e 70, obtiveram o mesmo tipo molecular (Figura 5). O coeficiente de similaridade de Jaccard, S_{AB}=0,81, foi utilizado como limiar para separar os grupamentos relacionados e não relacionados.

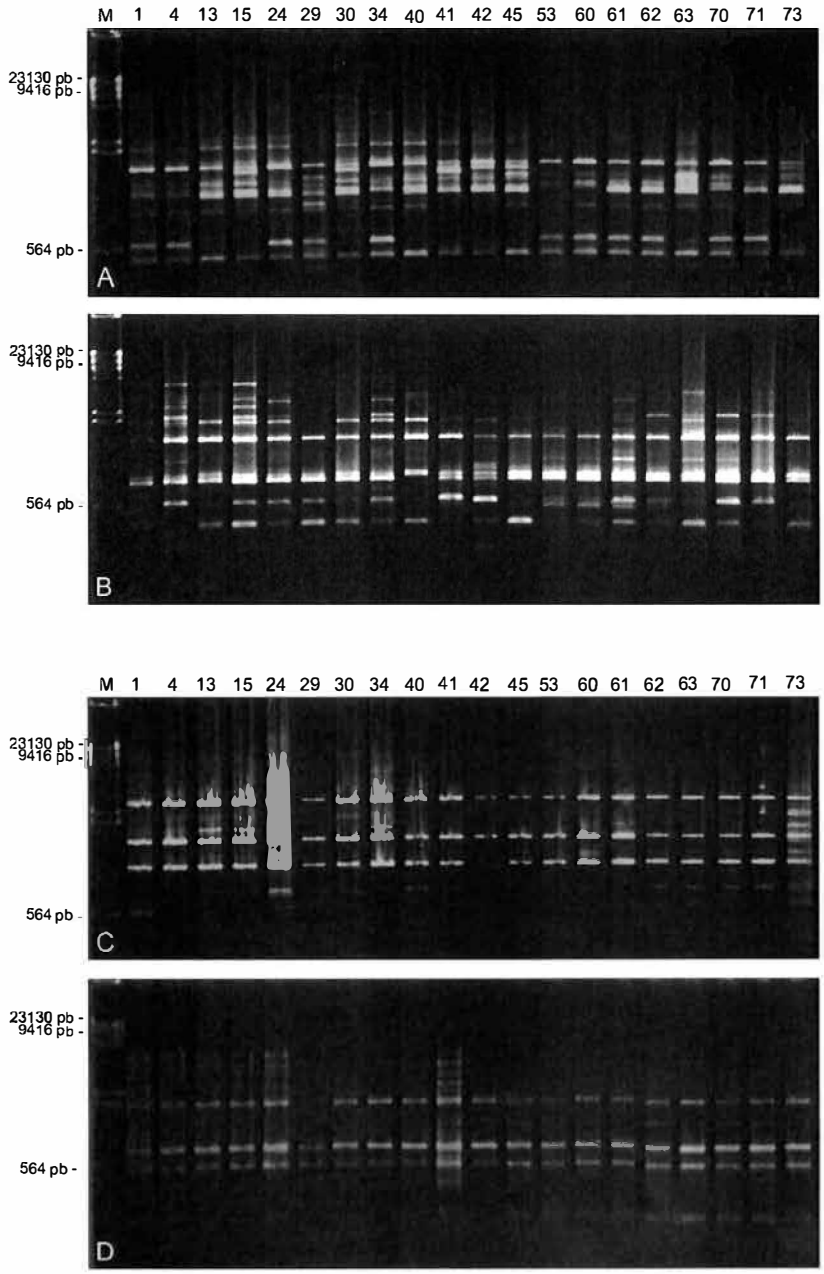

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do RAPD com os *primers* (A) OPA-9, (B) OPB-11, (C) OPE-18 e (D) SEQ-6. A raia da esquerda mostra o marcador de tamanho de fragmentos Lambda DNA/Hind III. Demais raias representam as amostras de DNA, amplificadas, obtidas na primeira coleta (tempo 0)

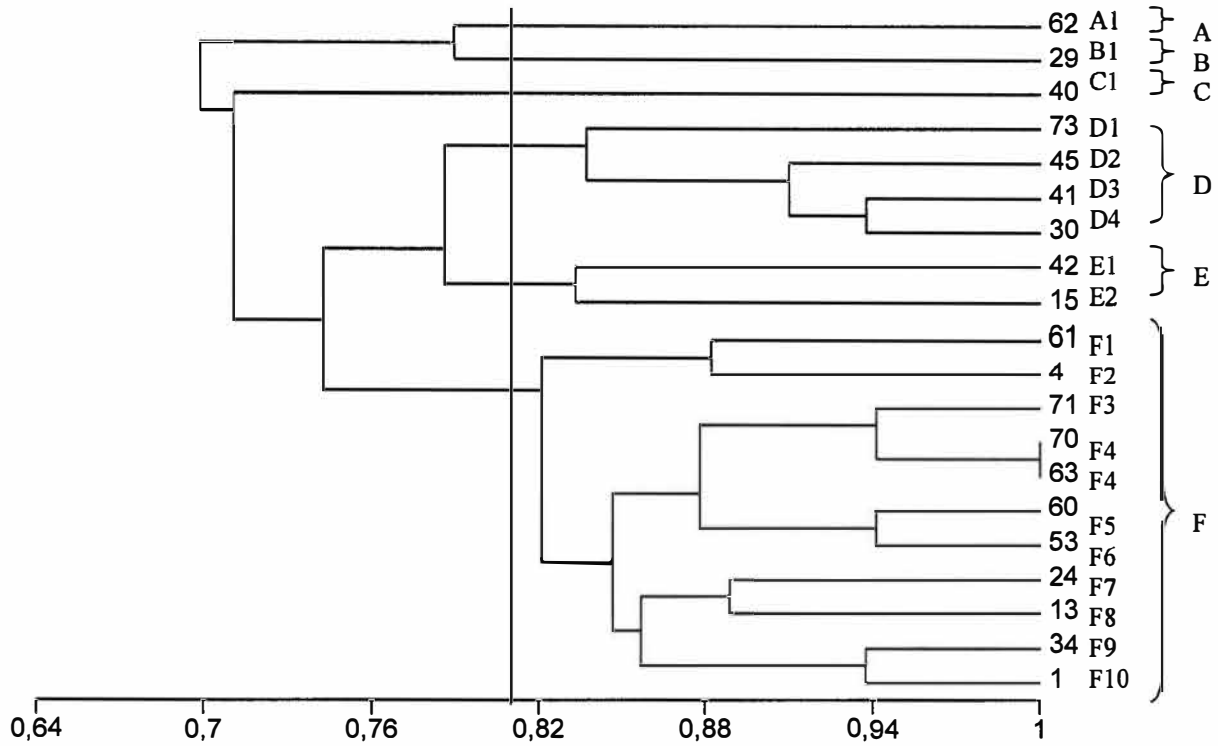

Figura 5. Dendrograma mostrando o agrupamento entre os isolados de *C. albicans* obtidos no tempo 0 (A-F), elaborado utilizando-se o algoritmo UPGMA/ Jaccard. Na linha horizontal estão indicados os coeficientes de similaridade genética (S_{AB}). A linha vertical representa o limiar S_{AB}=0,81, o qual separa os grupamentos relacionados e não relacionados. A direita do número correspondente ao isolado, encontra-se o respectivo tipo molecular

O padrão de fragmentos de DNA obtidos na eletroforese em gel de agarose no tempo 0, foi adotado como referência para verificar a manutenção do tipo molecular.

A maioria das leveduras (17) recuperadas na segunda ocasião de coleta (tempo 180) apresentaram correlação genética àquelas obtidas no tempo 0, com coeficiente de similaridade S*j* variando entre 0,822 e 0,960 (Tabela 8). A título de ilustração são apresentados nas figuras 6 e 7 os padrões de fragmentos do isolado nº 63, gerados pelo RAPD com os *primers* OPA-9, OPB-11 e OPE-18 e o dendrograma mostrando a similaridade desse isolado nas diferentes ocasiões, respectivamente.

Tabela 8 – Correlação genética, entre os 20 isolados de *C. albicans*, nos 2 momentos de coleta e após armazenamento, utilizando-se como referência o padrão obtido no tempo 0

Nº isolado	Sj 0-180	Sj 0-180S	Sj 0-180A
1	1,000	0,947	0,947
4	0,247	0,941	0,941
13	0,906	0,906	0,952
15	0,903	0,903	0,952
24	0,909	0,905	0,905
29	0,947	0,947	0,947
30	0,955	0,931	0,931
34	0,822	0,822	0,822
40	0,933	1,000	1,000
41	0,875	0,875	0,875
42	0,874	0,874	0,950
45	0,950	1,000	1,000
53	0,893	0,893	0,947
60	0,950	0,924	0,914
61	0,868	0,868	1,000
62	0,952	1,000	0,920
63	0,960	1,000	0,933
70	0,943	0,958	0,958
71	0,880	1,000	0,947
73	1,000	0,950	0,950
Média	0,888	0,932	0,940
Desvio padrão	0,158	0,052	0,041

Sj 0-180: correlação genética entre isolados nos tempos 0 e 180; Sj 0-180S: correlação genética entre isolados nos tempos 0 e 180S; Sj 0-180A: correlação genética entre isolados nos tempos 0 e 180A

Dois isolados (nº 1 e 73) mostraram tipos moleculares idênticos (S*j* =1,000) entre os tempos 0 e 180 (Tabela 8). O perfil obtido nos géis de agarose do isolado nº 1, bem como o dendrograma mostrando a relação molecular das leveduras isoladas na primeira e na segunda coleta são apresentadas nas figuras 6 e 7.

A análise dos padrões gerados com os *primers* utilizados no estudo, mostrou ainda que apenas o isolado nº 4, obtido no momento da segunda coleta (Figuras 6 e 7), apresentou perfil não relacionado ao da primeira coleta, com um coeficiente de similaridade S*j* de 0,247 (Tabela 8).

Cinco (25%) isolados (nº 40, 45, 62, 63 e 71) apresentaram tipo molecular idêntico (S*j*=1,000) após 180 dias de armazenamento em ASD. Os demais 15/75% mostraram perfis de RAPD relacionados (S*j*>0,81). O S*j* variou entre 0,822 e 1,000, com uma média de 0,932 e desvio padrão de 0,052 (Tabela 8). Após a estocagem em água destilada esterilizada, 3/15% (nº40, 45 e 61) e 17/85% apresentaram tipo molecular idêntico e relacionado, respectivamente. O S*j* variou entre 0,822 e 1,000, com média de 0,940 e desvio padrão de 0,041 (Tabela 8). Cabe ressaltar que a maioria dos isolados que após estocagem mostrou padrão de fragmentos geneticamente relacionado ao obtido no tempo 0, apresentaram coeficiente de similaridade superior a 0,90 evidenciando alta correlação entre *C. albicans* antes e após estocagem. Comparando-se as média de S*j* obtidas após os 2 métodos de estocagem adotados no estudo, não houve diferença estatística significativa entre elas (P=1,000).

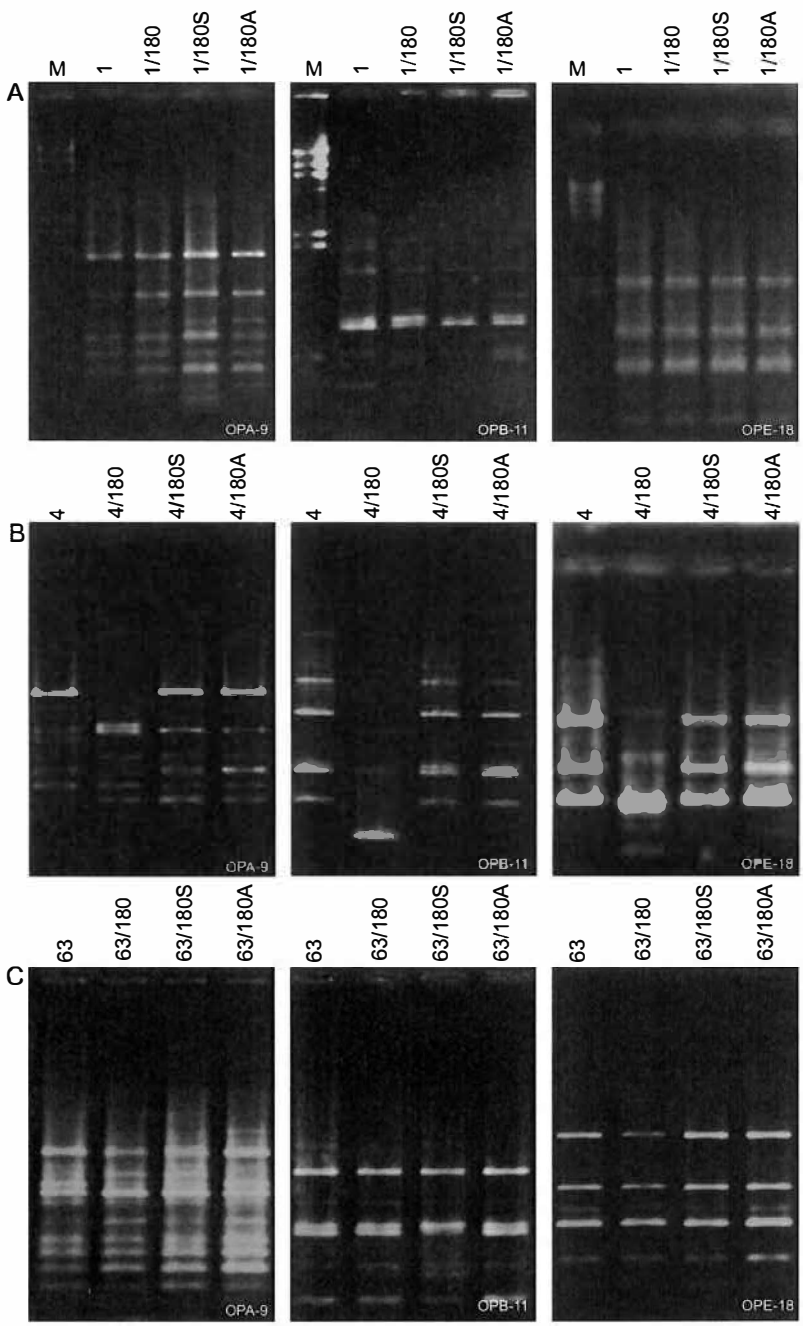

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do RAPD referente aos isolados de *C. albicans* nos tempos 0, 180, 180S e 180A, com os *primers* OPA-9, OPB-11 e OPE-18 dos indivíduos n°. (A) 1, (B) 4 e (C) 63

-/180: isolado obtido no tempo 180; -/180S:isolado após 180 dias de armazenamento em ASD; -/180A: isolado após 180 dias de armazenamento em água destilada esterilizada; M: marcador de tamanho de fragmentos.

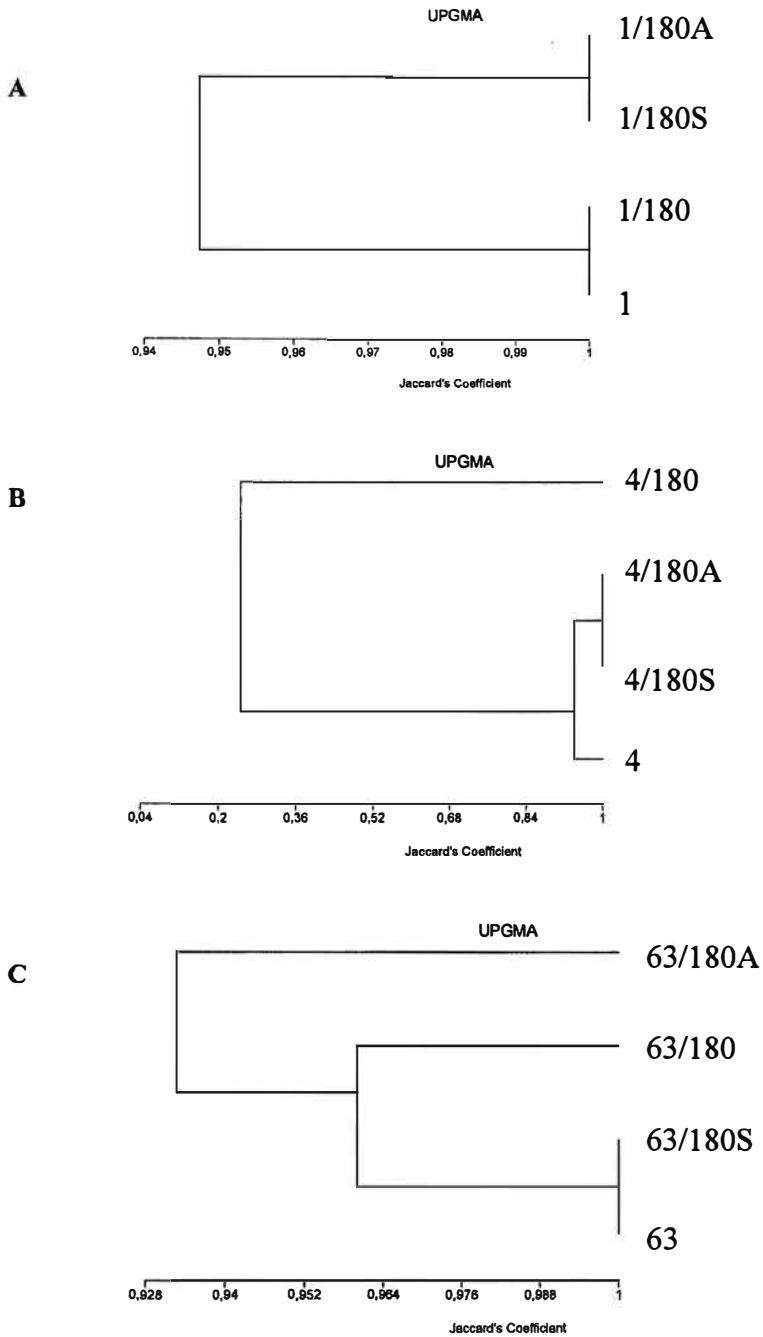

Figura 7. Dendrogramas mostrando o agrupamento dos isolados dos indivíduos nº. (A) 1, (B) 4 e (C) 63 obtidos nas diferentes ocasiões de coleta e pós armazenamento, elaborado à partir da análise conjunta da eletroforese com os *primers* OPA-9, OPB-11 e OPE-18 utilizando-se o algoritmo UPGMA/ Jaccard

-/180: isolado obtido no tempo 180; -/180S: isolado após 180 dias de armazenamento em ágar Sabouraud dextrose; -/180A: isolado após 180 dias de armazenamento em água destilada esterilizada.

4.3 Poder discriminatório das metodologias

Para avaliar o poder discriminatório das metodologias foram analisados somente os biotipos dos isolados de *C. albicans* obtidos no tempo 0.

A metodologia da enzimotipagem revelou dois diferentes enzimotipos, o 22 e o 32 (Tabela 5) e o seu índice discriminatório foi de 0,521 (Tabela 9).

A morfotipagem mostrou oito biotipos distintos, sendo o mais comum apresentado por sete isolados, o 000-0 (Tabela 6). O índice discriminatório foi de 0,853 (Tabela 9).

A antifungotipagem apresentou apenas 1 biotipo, o 111, e o índice discriminatório foi 0,000.

O RAPD revelou 19 distintos tipos moleculares de *C. albicans* (A1; B1; C1; D1 a D4; E1 e E2; F1 a F10) e o melhor poder em discriminar os isolados (ID=0,995) conforme mostra a tabela 9.

Quando os biotipos de 2 metodologias fenotípicas, a enzimotipagem e a morfotipagem, foram analisados em conjunto (Apêndice E) o índice discriminatório aumentou para 0,942 (Tabela 9). Por outro lado, os biotipos obtidos da conjunção da genotipagem com a enzimotipagem e com a morfotipagem (Apêndice E), não mostrou incremento no poder discriminatório em relação a tipagem molecular analisada isoladamente (Tabela 9).

Tabela 9 - Índices discriminatórios (ID) das metodologias utilizadas para a tipagem de *C. albicans*, analisadas individualmente e em conjunto

Método	nº. isolados	nº. tipos	ID
Enzimotipagem	20	2	0,521
Morfotipagem	20	8	0,853
Antifungotipagem	20	1	0,000
RAPD	20	19	0,995
Enzimotipagem e morfotipagem	20	13	0,942
Enzimotipagem e RAPD	20	19	0,995
Morfotipagem e RAPD	20	19	0,995

5. Discussão

5 DISCUSSÃO

Infecções causadas por espécies de *Candida* representam uma importante causa de infecções sistêmicas nosocomiais, pois são responsáveis pela grande maioria das infecções fúngicas documentadas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; ERGON; GULAY, 2005). Métodos de tipagem são essenciais para elucidar a epidemiologia desse tipo de infecção e auxiliar na determinação do foco de origem da mesma. Tais métodos se baseiam na determinação de características fenotípicas ou moleculares dos isolados. Dessa forma, nosso estudo teve como propósito verificar a estabilidade de algumas dessas características, *in vivo* e *in vitro* a fim de primar pela validade da execução de algumas metodologias de tipagem utilizadas.

5.1 Biotipagem fenotípica

5.1.1 Pesquisa de fosfolipase e proteinase

No presente estudo, 100% dos isolados avaliados por ocasião dos dois momentos de coleta foram produtores de fosfolipase, concordando com os achados de Kumar, Kumar e Menon (2006) que obtiveram igual percentual em isolados bucais. Percentual menor foi observado por Candido, Azevedo e Komesu (2000) e Kadir, Gumru e Uygun-Can (2007) que verificaram, respectivamente, 71,9% e 77% de atividade da enzima, em cepas de *C. albicans* provenientes da boca de indivíduos saudáveis.

Com relação à proteinase, isolados de estudantes que na primeira coleta apresentaram atividade dessa enzima, deixaram de apresentá-la por ocasião da segunda coleta, sendo que o percentual de positividade diminuiu de 100 para 85%, entre os tempos 0 e 180. Kumar, Kumar e Menon (2006) também observaram que 100% de isolados da boca de pacientes imunocomprometidos eram produtores de proteinase. Percentual menor (68,7%) foi

observado por Candido, Azevedo e Komesu (2000), analisando isolados comensais de *C. albicans*, da boca.

Uma vez que a produção de enzimas hidrolíticas, fosfolipases e proteinases, encontra-se dentre os vários fatores responsáveis pela virulência de leveduras (FOTEDAR; AL-HEDAITHY, 2005), pode-se esperar que fatores do hospedeiro, como imunocompetência e uso de antibióticos e/ou imunosupressores, possam interferir na expressão dos genes e conseqüente produção ou não dessas enzimas por isolados, em diferentes momentos de um estudo longitudinal.

Embora não foi observada diferença estatística significativa dos valores médios de P_Z entre os tempos 0 e após armazenamento por ambos métodos descritos, a manutenção da atividade de fosfolipase foi maior após armazenamento em ASD do que em água destilada esterilizada. A mesma situação ocorreu em relação à proteinase. Cabe ressaltar que, com relação a essa enzima, houve aumento estatístico significativo do valor médio de Pr_Z após armazenamento em água destilada esterilizada, compatível com uma diminuição na produção dessa enzima após esse tipo de estocagem. Essa aparente maior estabilidade na produção de exoenzimas após estocagem em ASD em relação à água destilada esterilizada, a princípio, não era esperada, uma vez que em meio com disposição de nutrientes, as células leveduriformes encontram-se em alta taxa de metabolismo nos 7 primeiros dias, para então morrerem rapidamente. Ao contrário, as leveduras uma vez transferidas para a água, num período ainda metabolicamente ativo, entram imediatamente em uma fase de repouso, aumentando a sobrevida (CHENG et al., 2007; FABRIZIO; LONGO, 2003) e, conseqüentemente, a probabilidade de manter as características apresentadas antes do armazenamento.

A secreção de proteinase também pode ser afetada pelo fenômeno do "switching". Enquanto as células de colônias brancas secretam quantidades insignificantes de proteinase, em meio contendo soro de leite utilizado como substrato para otimização da produção

enzimática, células de colônias na fase opaca ou plana-acinzentada, secretam copiosa quantidade de enzima. Essa condição é reversível em cada switch espontâneo, isto é, a cada alteração na morfologia da colônia (BERMAN; SUDBERY, 2002). O "switching" também pode explicar a perda de atividade secretora de proteinase por alguns isolados, obtidos, de um mesmo indivíduo num intervalo de seis meses, bem como após estocagem dos mesmos.

As proteinases possuem diferenças de pH ótimo de atividade, sendo que aquelas relacionadas a mucosas (SAP1-SAP-3), apresentam atividade ideal em pH ácido (KUMAR; KUMAR; MENON, 2006). Portanto fatores que promovem modificações nas condições locais com alteração do pH da boca, como por exemplo aquelas ocasionadas por acúmulo de placa dental (GENDRON; GRENIER; MAHEU-ROBERT, 2000) podem vir a interferir na atividade dessas enzimas em distintas ocasiões de coleta.

In vitro, alterações na atividade enzimática em virtude de mudanças de pH também são passíveis de ocorrer. O meio ASD possui pH em torno de 5,7, entretanto, à medida que ocorre crescimento das células das leveduras, há diminuição deste pH, o que pode vir a alterar a expressão de uma série de genes em *C. albicans* levando a alterações nos isolados (DE-BERNARDIS, 1998). Estudos têm sugerido que a expressão variável de fosfolipase *in vitro* deve ser possivelmente regulada pela temperatura, pH, fontes de carbono, nutrientes e vitaminas no meio de cultura e que esses fatores, por sua vez, poderiam modular a infecção *in vivo* (MUKHERJEE et al., 2003; SAMARANAYAKE et al., 2006).

A atividade da enzima fosfolipase *in vitro* é restrita a uma pequena faixa de pH (3,6-4,7). Com relação às proteinases, é relatado que em meios contendo proteína como única fonte de nitrogênio, a enzima transcrita predominantemente é a SAP-2, que tem pH ótimo de atividade entre 2,2 e 4,5, embora seja ativa em pH neutro, na presença de substratos apropriados (ABAD-ZAPATERO et al., 1996; DUBOIS et al., 1998; SAMARANAYAKE; RAESIDE; MacFARLANE, 1984). Dada as condições ideais de atividade enzimática das

exoenzimas alvo desse estudo, pode-se esperar que a acidificação do meio de cultura ASD resultante do consumo de nutrientes, possa favorecer a atividade das mesmas.

Por outro lado, embora os isolados armazenados em água destilada esterilizada passem rapidamente para a fase de repouso, na qual o crescimento e a replicação do DNA cessam, aumentando dessa forma sua longevidade, o pH desse meio (em torno de 6,7), não é ideal para atividade das exoenzimas fosfolipase e proteinase. Uma vez reativados, os isolados foram transferidos para tubos contendo ASD que por sua vez, embora possua pH ácido, somente torna-se mais adequado, após o crescimento das células leveduriformes e a metabolização de nutrientes, o que intensifica a acidez do meio. Nesse sentido, os isolados mantidos por transferências seriadas em ASD permaneceriam em condições ideais de atividade enzimática por período maior, o que poderia tentar explicar a aparente maior estabilidade na produção de proteinase e fosfolipase após estocagem em ASD, comparando-se a estocagem em água destilada esterilizada.

Pela metodologia adotada não ocorreu perda da atividade enzimática ou alteração do valor de Pz/ Prz, concomitantemente, para as duas enzimas, num mesmo isolado, sugerindo independência na regulação da expressão dessas enzimas.

A variabilidade na produção enzimática pode também ocorrer por limitações inerentes à própria metodologia utilizada nos ensaios. A utilização do ágar gema de ovo (ágar fosfolipase) para detecção da atividade de fosfolipases, torna o método de especificidade limitada, uma vez que contém substratos tanto para essas enzimas (fosfolipídios) quanto para lípases (triglicerídios). O método também não é adequado para detectar concentrações baixas da enzima. Da mesma forma, o uso de ágar com albumina para avaliação da atividade de proteinase, é um método relativamente pouco sensível para detectar quantidades muito baixas da enzima (KUMAR; KUMAR; MENON, 2006). Portanto, não foi possível afirmar que isolados que passaram a apresentar Prz =1 na segunda ocasião de coleta ou após estocagem

dos isolados, deixaram de apresentar atividade enzimática de proteinase ou se a quantidade produzida da enzima, tornou-se inferior a capacidade de detecção do método. Aliado a isso, a leitura de certa forma subjetiva, confere confiabilidade limitada ao método.

Embora a maioria dos isolados tenha produzido fosfolipase, nos dois momentos de coleta e após armazenamento dos isolados, as variações no valor P*z*, fizeram com que a atividade oscilasse entre moderada e alta, entre os tempos 0 e 180 e após a estocagem. Essa alteração no padrão de atividade enzimática de fosfolipase, bem como a perda de atividade de proteinase por alguns isolados, sugere que a secreção de enzimas hidrolíticas é variável para um mesmo isolado, em ensaios repetidos em momentos diferentes. Samaranayake, Raeside e MacFarlane (1984), relataram que o grau de atividade de fosfolipase representado pelo valor P*z*, se mantinha constante para um mesmo isolado, em ensaios repetidos. Entretanto, posteriormente o mesmo grupo de pesquisa (WILLIAMSON; SAMARANAYAKE; MacFARLANE, 1986), observou uma ampla variação no grau de atividade de fosfolipase em repetidas culturas de um isolado, mostrando que a estabilidade na produção de atividade enzimática, utilizando como medida o valor P*z*, é controvérsia de modo que a incorporação deste teste como método de tipagem pode ser problemática. Recentemente, Fotedar e Al-Hedaithy (2005) analisando isolados de *C. albicans* pela mesma técnica relataram que embora tenha havido variação no grau de atividade de fosfolipase em repetidos testes positivos, não houve mudança no perfil da atividade enzimática, diferente do que ocorreu no presente trabalho.

As alterações de P*z* ocasionaram alteração de enzimotipo das leveduras. Apenas 25% dos isolados manteve o enzimotipo entre as ocasiões de coleta e após estocagem, embora apenas 1 isolado tenha mostrado tipo molecular distinto entre os tempos 0 e 180. Aliada a baixa estabilidade na manutenção dos enzimotipos, o pequeno número de tipos (2) apresentado pela metodologia, no tempo 0, conduziu a um baixo poder discriminatório

(ID=0,521) frente a amostragem analisada. Embora estudo anterior tenha mostrado um melhor poder em discriminar isolados de *C. albicans* (CANDIDO; AZEVEDO; KOMESU, 2000), os resultados deste estudo não apontam a metodologia como uma boa opção de tipagem dessa levedura.

5.1.2 Morfotipagem

O morfotipo mais comum nas duas ocasiões de coleta foi o 000-0, o que, de certo modo era esperado, visto que os isolados de *C. albicans* analisados, eram comensais. A presença de franjas está relacionada com a aderência às células do hospedeiro e, portanto, essa característica morfológica é mais importante para isolados que estejam infectando e não colonizando indivíduos (BERMAN; SUDBERY, 2002; HUNTER; FRASER; MACKENZIE, 1989). Malighetti e colaboradores (1998), demonstraram essa relação entre morfotipos e a adesividade *in vitro* às células da mucosa da boca, analisando isolados de pacientes com HIV/AIDS. Nesse estudo, a adesividade das cepas que produziam franjas grosseiras ou muito grosseiras foi maior do que naquelas que não possuíam franjas. A presença de franjas nos isolados e sua relação com maior potencial de causar infecção também foi objeto de estudo de Khan, Chandy e Metwali (2003), que analisaram 88 cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (UTIs). Nesse estudo, 34 morfotipos foram identificados, 59(67%) isolados tinham franjas contínuas e 29 (33%) descontínuas sendo o morfotipo mais comum o 753-0 caracterizando isolados de *C. albicans* com franjas contínuas, com largura maior ou igual a 6 mm, textura intermediária e com a superfície da colônia lisa.

A metade dos isolados do presente estudo manteve na segunda coleta o morfotipo apresentado por ocasião da primeira. Os demais (10) tiveram o morfotipo alterado, embora, os estudos subseqüentes de tipagem molecular mostrem que desses, apenas um isolado é

sugestivo de recolonização. Os demais representavam os mesmos isolados da primeira coleta caracterizando uma baixa estabilidade na manutenção dos morfotipos.

Ao contrário do que ocorreu para a enzimotipagem, a manutenção do morfotipo após o armazenamento em água sofreu menos alteração do que após estocagem em ASD. Do mesmo modo, um número maior de isolados manteve a superfície das colônias lisa após o armazenamento na água, o que é considerado coerente pelo fato dos isolados mantidos em água destilada permanecerem na fase de repouso, como já foi mencionado anteriormente.

No entanto, as variações nos biotipos, por vezes, ocorreram apenas em um aspecto, refletindo mudança em apenas um dígito na codificação. O aspecto que avalia a textura da franja foi o que mais se manteve estável. Esses resultados concordam com os de Giammanco e colaboradores (2005) que observaram diferença em, pelo menos, um dígito do código de morfotipagem, em 92,9% dos isolados após um ano de armazenamento em ASD.

A enzimotipagem e a morfotipagem mostraram que podem ocorrer alterações no comportamento fenotípico de *C. albicans* após armazenamento. Além dos fatores mencionados acima que podem contribuir para essas alterações, deve-se considerar que o processo de armazenamento gera uma situação de estresse à levedura (alteração de meio, redução de nutrientes, acúmulo de produtos tóxicos resultantes do metabolismo, etc.) e que, por conseguinte, um processo de regulação da expressão gênica, pode ser desencadeado de modo que a célula se adapte à essa situação desfavorável (FERNANDES, 2005).

5.1.3 Antifungotipagem

Apesar da simplicidade e da boa reprodutibilidade do método, o teste de suscetibilidade aos antifúngicos não se mostrou ser metodologia satisfatória para tipar os isolados obtidos da população estudada. Todos isolados, por ocasião das coletas, foram sensíveis aos antifúngicos utilizados no estudo, de modo que não se observou antifungotipos

diferentes. Apenas um isolado apresentou biotipo distinto após armazenamento em ASD. Entretanto, a alteração na CIM desse isolado frente ao itraconazol, que ocasionou mudança da categoria de sensível para dose-dependente e conseqüente mudança de antifungotipo, pode ser questionada devido à interferência significativa do efeito *trailing*, termo utilizado para descrever o crescimento reduzido mas persistente apresentado por alguns isolados nos testes de diluição em caldo frente aos azóis (LEE et al., 2004), que pode prejudicar a leitura dos resultados, muito embora os testes, realizados em duplicata, tenham sido repetidos e confirmados.

Marol e Yucesoy (2008) analisando 70 isolados de *Candida* provenientes de pacientes de unidade de tratamento intensivo, frente a anfotericina B e fluconazol, pelo método da microdiluição em caldo também não observaram resistência entre os mesmos relatando a utilidade limitada do padrão de sensibilidade aos antifúngicos na avaliação nosocomial de infecções por *Candida* spp. Embora a metodologia adotada não foi a mesma, resultado diferente foi observado por Candido et al. (1996) e Quindós et al. (1996), que encontraram 12 e 26 biotipos distintos de *C. albicans*, analisando 100 e 482 isolados, respectivamente. No primeiro estudo, verificando a sensibilidade de *C. albicans* frente aos antifúngicos anfotericina B, cetoconazol, miconazol e flucitosina pelo método da diluição em ágar, a predominância foi do tipo 1211 denotando resistência ao cetoconazol e sensibilidade aos demais (CANDIDO et al 1996). No estudo de Quindós e colaboradores (1996), observando a sensibilidade a flucitosina, anfotericina B, nistatina, miconazol, econazol e cetoconazol, por meio do método comercial ATB-Fungus (API-bioMérieux), o biotipo mais freqüente apresentado por 31% dos isolados da boca e do trato digestivo, foi o 000000, denotando sensibilidade a todos antifúngicos testados. De acordo com os resultados apresentados, ambos autores apontaram a metodologia como um marcador epidemiológico útil para tipagem de isolados de *C. albicans*, que pode auxiliar no estabelecimento de protocolos quimioterápicos.

Casos de resistência adquirida aos azólicos são descritos em pacientes que foram expostos por períodos prolongados a essas drogas, ao passo que resistência à anfotericina B é raramente observada (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Casos de resistência ao fluconazol, itraconazol e flucitosina, foram observados por Tavanti e colaboradores (2005), avaliando 416 isolados de *C. albicans* originários de diferentes sítios anatômicos e fontes de origem. Os autores relacionaram a resistência aos antifúngicos a homozigose no padrão de MTL, sugerindo que um evento comum seria responsável tanto pela alteração molecular quanto à de fenótipo em isolados selvagens.

Portanto, em vista da população (estudantes universitários saudáveis), da qual foi extraída a amostragem, os resultados eram de certa forma esperados, pois a espécie *C. albicans* é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Estudos relatam que testes de suscetibilidade não são suficientemente discriminatórios para tipagem de isolados, tornando a sua utilização, em vigilância epidemiológica, limitada (CLARK et al., 2004; ERGON; GULAY, 2005). Logo, frente à amostragem utilizada e à metodologia adotada, por estes resultados o uso da antifungotipagem como método para tipagem de cepas de *C. albicans* não seria recomendado . No entanto, a determinação dos padrões de sensibilidade e resistência é de extrema importância, sobretudo em isolados oriundos de pacientes de unidades de tratamento intensivo e/ou imunocomprometidos para que se possa fazer, de maneira adequada, a vigilância e manejo dessa infecção, a fim de suprimir gastos desnecessários e reações adversas indesejáveis aos pacientes, os quais podem advir do uso inadequado das medicações antifúngicas.

5.2 Biotipagem molecular por RAPD

O uso do RAPD como método de tipagem já está bem documentado e é amplamente utilizado para biotipar *C. albicans* (SOLL, 2000), o que foi certificado pelo bom índice discriminatório apresentado pela metodologia no presente estudo (ID=0,995).

Convém ressaltar que mesmo entre isolados de *C. albicans* que não apresentaram diferenças fenotípicas, a tipagem molecular permitiu excelente discriminação. Esses resultados corroboram com os de Riederer et al. (2002), os quais analisando 162 colônias obtidas de 18 pacientes (9 de cada), através da metodologia do RAPD com o uso de seis *primers* (RAPD Kit Amersham Pharmacia Biotech) observaram variação nos isolados de 12 dos 18 pacientes, com um total de 34 tipos moleculares entre as colônias estudadas, ainda que não tenham observado diferenças fenotípicas entre as nove colônias, selecionadas de cada paciente.

A maioria dos isolados puderam ser alocados dentro de um mesmo grupamento, o "F", com coeficiente de similaridade entre eles superior a 0,81. Embora o conhecimento da homogeneidade genética, evolução e persistência da espécie durante a colonização e no curso de uma infecção seja escasso (BARTIE et al., 2001), a presença de uma única linhagem de *C. albicans* predominante, isolada de um grupo específico de indivíduos com determinadas patologias ou provenientes de determinada região geográfica tem sido demonstrada (CLEMONS et al., 1997; KLEINEGGER et al., 1996; PIRES-GONÇALVES et al., 2007; SCHMID et al., 1999; XU; VILGAYS; MITCHELL, 1999). A associação de genótipos ou tipos moleculares de *C. albicans* com localização geográfica sugere que a origem das variações na seqüência de DNA desse patógeno e conseqüente microevolução coincide com a evolução dos hominídeos explicando a capacidade desse complexo microrganismo de viver em estado de comensalismo com o homem (LOTT et al., 2005).

O achado de isolados altamente relacionados, mas não idênticos pode ser atribuído a microevolução das cepas em resposta a alterações no ambiente (PIRES-GONÇALVES et al., 2007), no entanto as informações a cerca da utilidade dessa metodologia em detectar essas modificações genéticas *in vitro* ou *in vivo* são escassas. Da mesma forma, os fatores que propiciam e mantêm a diversidade genética bem como o quanto as cepas são capazes de refletir sua história evolucionária, não é bem esclarecido (LOTT et al., 2005). Pujol e colaboradores (1997) comparando a análise por RAPD, MLEE e hibridização com sonda Ca3 e sonda CARE2, demonstraram que a capacidade da metodologia baseada no padrão de hibridização com seqüências moderadamente repetitivas foi superior às demais em discriminar isolados altamente relacionados e, por conseguinte, mais adequado para identificar mudanças microevolucionárias. Por outro lado, Metzgar et al. (1998), avaliando alterações genéticas *in vivo* em espécies de *Candida* provenientes de pacientes portadores do vírus HIV, isoladas no pré e pós-tratamento com fluconazol, identificaram pequenas alterações nas leveduras, utilizando a metodologia do DNA polimórfico amplificado ao caso. Pesti e colaboradores (2001) também obtiveram sucesso na detecção de variações no padrão de RAPD e MLEE de mutantes morfológicos de *C. albicans*.

Ainda que vários autores relatem a tendência à manutenção de uma mesma cepa colonizando indivíduos ao longo do tempo (BARTIE et al., 2001; JACOBSEN et al., 2007; McCREIGHT et al., 1982; ODDS et al., 2006; SCHMID et al., 1992), no presente estudo o RAPD permitiu identificar um caso de alteração de tipo molecular no período entre as coletas (isolado n^{o} 4). Os biotipos desse isolado de acordo com a enzimotipagem e morfotipagem, também foram alterados no referido intervalo de coleta. Os isolados dos demais indivíduos mostraram-se relacionados entre as duas coletas (tempos 0 e 180). Subclones de *C. albicans* com genótipos distintos, podem coexistir na cavidade bucal (SAMARANAYAKE et al., 2003b) e portanto não se pode determinar, com clareza, se a alteração de tipo molecular

apresentada pelo isolado do indivíduo 4, se trata de uma recolonização ou se os dois subclones já habitavam, simultaneamente a boca, por ocasião da primeira coleta. Kam e Xu (2002), analisando a diversidade de leveduras comensais da cavidade bucal e das unhas, num mesmo indivíduo e entre hospedeiros saudáveis, verificaram que múltiplas espécies ou múltiplos genótipos de uma mesma espécie em sítios anatômicos iguais ou diferentes, podem ser encontradas em um mesmo hospedeiro. Os autores observaram também que em coletas seriadas, com intervalos de 35-40 dias entre elas, podem ocorrer alterações de espécie ou de tipos moleculares de uma mesma espécie, num determinado sítio de um hospedeiro, inclusive com uma observação direta de transmissão de leveduras entre dois membros de uma mesma família. Estudos mostram que a presença de mais de um tipo molecular pode ter implicação terapêutica importante, particularmente no caso de pacientes infectados pelo HIV, uma vez que os subclones podem ter diferentes padrões de suscetibilidade (PFALLER et al., 1994; SAMARANAYAKE et al., 2001), e que pacientes imunocomprometidos, devem ser monitorados para a presença de múltiplas cepas de C. albicans durante o decorrer da infecção (SAMARANAYAKE et al., 2003b).

De acordo com os coeficientes de similaridade obtidos a partir dos produtos do RAPD das amostras, verificou-se que a estocagem da levedura *C. albicans* tanto em ASD como em água destilada esterilizada não altera significativamente o padrão de fragmentos de DNA observado. Embora a maioria não tenha apresentado tipo molecular idêntico (S_j=1,000), após o armazenamento, eles permaneceram com biotipos moleculares relacionados, sendo que a grande maioria apresentou S_j superior a 0,900. Apesar da diferença de coeficiente de similaridade entre os isolados armazenados em ASD e água não ser estatisticamente significativa, o armazenamento em água mostrou S_j médio ligeiramente maior, o que era esperado uma vez que os isolados mantidos por subcultivos sucessivos estão mais sujeitos a

alterações do que aqueles mantidos na fase de repouso, em água destilada esterilizada (FABRIZIO; LONGO, 2003).

Limitações da metodologia do RAPD podem promover alterações entre os padrões dos fragmentos dos produtos de reação entre os ensaios, fazendo com que isolados idênticos apresentem-se como relacionados. A reprodutibilidade baixa do RAPD, tanto inter como intralaboratorial, pode estar relacionada com o fato de que a metodologia é sujeita a alterações em função de concentração de DNA, mudança de fornecedor ou mesmo de lote de reagentes, alterações na concentração de magnésio na reação, capacidade do termociclador em aquecer ou esfriar o bloco de aquecimento com rapidez, entre outras (SOLL, 2000). Embora os reagentes e equipamentos utilizados, tenham sido os mesmos, alterações mínimas entre os ensaios podem ter ocorrido, interferindo principalmente em fragmentos ou bandas de menor intensidade, o que pode explicar o fato de ter havido pequenas diferenças nos perfis de RAPD obtidos na eletroforese em gel de agarose da maioria dos isolados após a estocagem, quando comparados ao tempo 0. De acordo com Pujol e colaboradores (1997), apesar do RAPD ser eficaz em relacionar geneticamente isolados de *C. albicans* em estudos epidemiológicos, não apresenta boa reprodutibilidade para bandas de baixa intensidade.

O uso concomitante do RAPD com um método de tipagem fenotípica, seja a enzimotipagem ou a morfotipagem, não promoveu alteração no poder discriminatório uma vez que os isolados que apresentaram o mesmo tipo molecular (isolados n°. 63 e 70), também apresentaram o mesmo enzimotipo e morfotipo, mantendo o n°. de tipos em 19 e portanto, o índice discriminatório em 0,995. A conjunção dessas metodologias para tipar isolados de *C. albicans* é desnecessária, uma vez que o RAPD quando utilizado separadamente já foi eficiente em tipar os isolados. Outro fato a considerar é que apesar de não terem sido observadas diferenças fenotípicas (enzimotipo e morfotipo) entre os isolados do indivíduo que apresentou alteração do tipo molecular de *C. albicans* entre as distintas ocasiões de coleta,

essa correlação entre os métodos parece ter sido aleatória, uma vez que 50 e 70% dos isolados tiveram, respectivamente, morfotipo e enzimotipo alterados entre tempos 0 e 180. Waltimo et al. (2001) tipando 37 isolados de *C. albicans* provenientes de canal dentário, por métodos fenotípicos (presença de 5 diferentes enzimas, assimilação de 11 carboidratos e sensibilidade ao ácido bórico) e por RAPD observaram que apenas 3 isolados apresentaram fenótipo e genótipo congruente, mostrando heterogeneidade entre as metodologias.

5.3 Poder discriminatório das metodologias

Além da baixa estabilidade na manutenção dos biotipos apresentados, a enzimotipagem apresentou baixo índice discriminatório, inabilitando-a como método de tipagem frente aos isolados analisados.

Os resultados obtidos nos levam a concluir que alterações nos morfotipos de *C. albicans* são passíveis de ocorrer, em diferentes momentos de coleta e após estocagem dos isolados. Apesar do poder discriminatório satisfatório da metodologia (ID=0,853), a utilização desse esquema para avaliar um microrganismo capaz de apresentar alterações morfológicas espontâneas e reversíveis ("switching"), deve ser vista de maneira criteriosa (GIAMMANCO et al., 2005; SLUTSKY; BUFFO; SOLL, 1985).

Quando a enzimotipagem e a morfotipagem foram utilizadas em conjunto, o poder discriminatório sofreu incremento significativo, conduzindo a um índice discriminatório adequado à uma metodologia de tipagem, isto é, ID >0,900 (HUNTER; GASTON, 1988). Portanto, a princípio, a conjunção das metodologias parece ser adequada para a tipagem de isolados de *C. albicans*, sobretudo em situações ou locais que não se disponha da tipagem molecular. Entretanto, devido a variabilidade na produção de exoenzimas e nos morfotipos apresentados por nossos isolados após estocagem e/ou em diferentes ocasiões de coleta, salientamos que a utilização das mesmas pode conduzir a resultados não fidedignos.

O uso do perfil de suscetibilidade frente a antifúngicos não é recomendado para tipar isolados comensais de *C. albicans*, uma vez que sensibilidade a todas as drogas é o padrão mais esperado, acarretando apenas 1 biotipo;

O fato das metodologias fenotípicas apresentarem índice discriminatório inferior ao desejado para uma metodologia de tipagem, pode ser atribuído ao tamanho da amostragem utilizada. Entretanto, ainda que a amostragem possa ser considerada pequena, a tipagem molecular pelo RAPD mostrou bom índice discriminatório, ratificando sua utilidade em diferenciar isolados de *Candida* dentro de uma mesma espécie.

Assim, embora alterações morfológicas e de virulência possam ocorrer nas colônias de *C. albicans* durante o período de armazenamento em ASD e água destilada esterilizada, os nossos resultados nos levam a concluir que essas mudanças não alteram significativamente o padrão dos fragmentos de DNA gerados na reação de RAPD e que, portanto a metodologia pode ser utilizada com confiabilidade para caracterização de isolados de *C. albicans*, sobretudo aquelas com propósitos epidemiológicos ou de pesquisa, onde a tipagem molecular é uma ferramenta valiosa na diferenciação de infecção endógena e exógena, ainda que a utilização de DNA obtido de isolados estocados no laboratório, seja faça necessária.

6. Conclusões

6 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 enzimotipo 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.

7. Referências Bibliográficas*

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas.

7 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 n 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.

BORIOLLO, 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 childrem. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.45, n.5, p.249-57, sep-oct.2003.

BORIOLLO, 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.; SAVELKOUL, 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.; NEPPELENBROEK, 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 fro 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.; ANAISSIE, 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.; NOUÉR, 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 Infections 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.; YUCESOY, 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 Commitee for Clinical Laboratory Standards. Publication of M27-A: Reference Method for Broth Dilution Antufungal Suscetibility Testing of Yeasts: approved standard. **NCCLS**, Wayne, v.17, p. 1-26, 1997.

NCCLS. National Commitee for Clinical Laboratory Standards. Publication of M27-A2: Reference Method for Broth Dilution Antufungal Suscetibility 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-MLLÁN, R.; TELLAETXE, M.; RIBACOBA, L.; PONTÓN, J. A new method of antibiotyping 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 vírus 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 immun odeficiency 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.; NANTEL, 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 og 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.

Apêndices

APÊNDICE A – Amostras de saliva analisadas quanto à presença de leveduras

Nº amostra	Tempo 0	Tempo 180
1	*C. albicans* e outras leveduras	*C. albicans*
2	Negativo	NR
3	Negativo	NR
4	*C. albicans*	*C. albicans*
5	Negativo	NR
6	Negativo	NR
7	Negativo	NR
8	Negativo	NR
9	outras leveduras	NR
10	outras leveduras	NR
11	Negativo	NR
12	*C. albicans*	NR
13	*C. albicans*	*C. albicans*
14	Negativo	NR
15	*C. albicans*	*C. albicans* e outras leveduras
16	Negativo	NR
17	Negativo	NR
18	Negativo	NR
19	Negativo	NR
20	Negativo	NR
21	*C. albicans*	NR
22	outras leveduras	NR

Continua...

Continuação...

Nº amostra	Tempo 0	Tempo 180
23	outras leveduras	NR
24	*C. albicans*	*C. albicans*
25	Negativo	NR
26	*C. albicans* e outras leveduras	NR
27	Negativo	NR
28	Negativo	NR
29	*C. albicans*	*C. albicans*
30	*C. albicans*	*C. albicans* e outras leveduras
31	Negativo	NR
32	Negativo	NR
33	*C. albicans*	Negativo
34	*C. albicans*	*C. albicans*
35	outras leveduras	NR
36	*C. albicans* e outras leveduras	NR
37	Negativo	NR
38	*C. albicans*	NR
39	Negativo	NR
40	*C. albicans*	*C. albicans*
41	*C. albicans*	*C. albicans*
42	*C. albicans*	*C. albicans*
43	Negativo	NR
44	Negativo	NR

Continua...

Continuação...

Nº amostra	Tempo 0	Tempo 180
45	*C. albicans*	*C. albicans*
46	Negativo	NR
47	Negativo	NR
48	Negativo	NR
49	outras leveduras	NR
50	Negativo	NR
51	Negativo	NR
52	Negativo	NR
53	*C. albicans*	*C. albicans*
54	Negativo	NR
55	Negativo	NR
56	Negativo	NR
57	Negativo	NR
58	Negativo	NR
59	*C. albicans*	Negativo
60	*C. albicans*	*C. albicans*
61	*C. albicans*	*C. albicans*
62	*C. albicans*	*C. albicans*
63	*C. albicans*	*C. albicans*
64	*C. albicans*	NR
65	Negativo	NR
66	Negativo	NR

Continua...

Continuação...

Nº amostra	Tempo 0	Tempo 180
67	Negativo	NR
68	Negativo	NR
69	Negativo	NR
70	*C. albicans*	*C. albicans*
71	*C. albicans*	*C. albicans*
72	Negativo	NR
73	*C. albicans*	*C. albicans*

tempo 0: primeira coleta; tempo 180: segunda coleta (180 dias após primeira); NR: coleta não realizada

APÊNDICE B – Valores da concentração inibitória mínima (CIM) de anfotericina B frente aos isolados de *C. albicans*

Isolado nº	Tempo 0		Tempo 180		Tempo 180 S		Tempo 180 A	
	CIM (µg/mL)	Código	CIM (µg/mL)	Código	CIM (µg/mL)	Código	CIM (µg/mL)	Código
1	0,25	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1
4	0,25	1	0,5	1	0,5	1	1,0	1
13	0,25	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1
15	0,25	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1
24	0,25	1	1,0	1	0,5	1	0,5	1
29	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1
30	0,25	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1
34	0,5	1	0,5	1	1,0	1	1,0	1
40	1,0	1	0,5	1	0,5	1	1,0	1
41	0,5	1	0,5	1	0,5	1	1,0	1
42	0,5	1	0,5	1	1,0	1	0,5	1
45	0,5	1	0,5	1	0,5	1	1,0	1
53	0,5	1	1,0	1	0,5	1	0,5	1
60	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1
61	0,5	1	0,5	1	0,25	1	0,5	1
62	0,5	1	1,0	1	0,25	1	0,5	1
63	0,5	1	0,5	1	0,5	1	1,0	1
70	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1
71	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1
73	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1

tempo 0: primeira coleta; tempo 180: segunda coleta; tempo 180S: 180 dias de armazenamento no ágar Sabouraud dextrose; tempo 180A: 180 dias de armazenamento na água; Código 1: sensível; 2: resistente; 3: S-DD.

APÊNDICE C – Valores da concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol frente aos isolados de *C. albicans*

Isolado nº	Tempo 0		Tempo 180		Tempo 180 S		Tempo 180 A	
	CIM (µg/mL)	Código	CIM (µg/mL)	Código	CIM (µg/mL)	código	CIM (µg/mL)	Código
1	0,25	1	0,125	1	0,25	1	0,25	1
4	0,25	1	0,25	1	0,125	1	0,25	1
13	0,25	1	0,125	1	0,125	1	0,125	1
15	0,25	1	0,25	1	0,25	1	0,125	1
24	0,25	1	0,25	1	0,25	1	0,25	1
29	0,25	1	0,25	1	0,25	1	0,25	1
30	0,25	1	0,25	1	0,25	1	0,25	1
34	0,125	1	0,125	1	0,25	1	0,25	1
40	0,25	1	0,25	1	0,25	1	0,25	1
41	0,5	1	0,25	1	0,5	1	0,25	1
42	0,25	1	0,25	1	0,25	1	0,25	1
45	0,25	1	0,25	1	0,5	1	0,5	1
53	0,25	1	0,25	1	0,25	1	0,25	1
60	0,25	1	0,25	1	0,25	1	0,25	1
61	0,5	1	1	1	0,5	1	1,0	1
62	0,25	1	1	1	2,0	1	0,5	1
63	0,125	1	1	1	1,0	1	0,25	1
70	0,25	1	0,5	1	0,25	1	0,5	1
71	0,125	1	0,25	1	0,25	1	0,125	1
73	0,25	1	2,0	1	4	1	4	1

tempo 0: primeira coleta; tempo 180: segunda coleta; tempo 180S: 180 dias de armazenamento no ágar Sabouraud dextrose; tempo 180A: 180 dias de armazenamento na água; código 1: sensível; 2: resistente; 3: S-DD.

APÊNDICE D – Valores da concentração inibitória mínima (CIM) de itraconazol frente aos isolados de *C. albicans*

Isolado nº	Tempo 0		Tempo 180		Tempo 180 S		Tempo 180 A	
	CIM (µg/mL)	Código	CIM (µg/mL)	Código	CIM (µg/mL)	código	CIM (µg/mL)	Código
1	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
4	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
13	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
15	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
24	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
29	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
30	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
34	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
40	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
41	0,125	1	0,03	1	0,06	1	0,03	1
42	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
45	0,06	1	0,03	1	0,25	3	0,03	1
53	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
60	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
61	0,03	1	0,06	1	0,03	1	0,06	1
62	0,03	1	0,06	1	0,03	1	0,03	1
63	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
70	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
71	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1
73	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03	1

tempo 0: primeira coleta; tempo 180: segunda coleta; tempo 180S: 180 dias de armazenamento no ágar Sabouraud dextrose; tempo 180A: 180 dias de armazenamento na água; código 1: sensível; 2: resistente; 3: S-DD.

APÊNDICE E - Biotipos de *C. albicans,* apresentados pelos isolados, quando as metodologias são analisadas em conjunto

Isolado nº	Enzimotipagem/ Morfotipagem	Enzimotipagem/ Genotipagem	Morfotipagem/ Genotipagem
1	32000-0	32 F10	000-0 F10
4	22334-0	22 F2	334-0 F2
13	22723-0	22 F8	723-0 F8
15	22733-0	22 E2	733-0 E2
24	32323-0	32 F7	323-0 F7
29	22734-0	22 B1	734-0 B1
30	22333-0	22 D4	333-0 D4
34	32333-0	32 F9	333-0 F9
40	22223-0	22 C1	223-0 C1
41	32733-0	32 D3	733-0 D3
42	32334-0	32 E1	334-0 E1
45	32223-0	32 D2	223-0 D2
53	32323-0	32 F6	323-0 F6
60	22000-0	22 F5	000-0 F5
61	22000-0	22 F1	000-0 F1
62	32000-0	32 A1	000-0 A1
63	22000-0	22 F4	000-0 F4
70	22000-0	22 F4	000-0 F4
71	22333-0	22 F3	333-0 F3
73	32000-0	32 D1	000-0 D1

APÊNDICE F – Meios de cultura

Ágar Sabouraud (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991)

Dextrose (Synth)	40 g
Peptona (Merck)	10 g
Ágar bacteriológico (Difco)	15 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver os componentes a quente em água destilada, distribuir em tubos 20x200 mm e autoclavar a 120ºC durante 20 minutos. Solidificar em posição inclinada. Conservar em geladeira.

Ágar Sabouraud com cloranfenicol (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991)

Dextrose (Synth)	20 g
Peptona (Merck)	10 g
Ágar bacteriológico (Difco)	15 g
Água destilada	1000 mL
Cloranfenicol	100 mg

Dissolver os componentes em água destilada, sob agitação, autoclavar a 120ºC durante 20 minutos e distribuir em placas de Petri esterilizadas 20 x 100 mm. Conservar em geladeira.

Caldo YPD (BORIOLLO, 2004)

Dextrose (Synth)	20 g
Peptona (Merck)	20 g
Extrato de levedura (Difco)	10 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver os componentes em água destilada, distribuir em tubos 20x200 mm e autoclavar a 120ºC durante 20 minutos. Conservar em geladeira.

Ágar fosfolipase (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982)

Peptona (Merck)	10 g
Glicose (Synth)	20 g
Cloreto de sódio (Reagen)	57,3 g
Cloreto de cálcio (Reagen)	0,55 g
Ágar bacteriológico (Difco)	20 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver os componentes em água destilada, autoclavar a 120ºC por 20 minutos, resfriar a 50ºC e adicionar 160 mL de emulsão de ovo a 50% (80 g de gema de ovo, homogeneizada com 80 mL de solução fisiológica esterilizada). Distribuir em placas de Petri esterilizadas 20x100 mm. Conservar em geladeira.

Ágar Proteinase (RÜCHEL; TEGELLER; TROST, 1982)

Yeast Carbon Base (Difco)	11,7 g
Albumina bovina fração V (Sigma)	2 g
Vita Gold (Tortuga).....	2,5 mL
Água destilada	100 mL

Dissolver os componentes em água destilada e esterilizar por filtração, utilizando membrana Millipore (0,22 μm).

Ágar bacteriológico (Difco)	18 g
Água destilada	900 mL

Dissolver os componentes em água destilada e autoclavar a 120°C durante 20 minutos. Após resfriamento à cerca de 50°C, misturar a solução anterior contendo os substratos e distribuir em placas de Petri esterilizadas 20x100 mm. Conservar em geladeira.

Meio RPMI 1640 tamponado com MOPS a 0,165 mol/L (NCCLS, 2002)

RPMI 1640 (Gibco BRL)	10,4 g
Tampão MOPS (USB)	34,5 g
Glicose (Synth)	18 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver o tampão MOPS (morfolino-propanossulfônico) em 900 mL de água destilada, para alcançar uma concentração de 0,165 mol/L e agitar até dissolução completa. Acrescentar o RPMI 1640, ajustar o pH a 7,0 ± 0,1, à temperatura ambiente, utilizando

hidróxido de sódio 1 mol/L e acrescentar água destilada para completar o volume de 1000 mL. Esterilizar por filtração. Conservar em geladeira.

CHROMagar® Candida (ODDS; BERNAERTS, 1994)

Cloranfenicol	0,5 g
Mistura cromogênica	22,0 g
Peptona	10,2 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver, a quente, 47,7 g da formulação em pó em 1000 mL de água destilada. Após a dissolução completa, ferver 1 minuto e distribuir em placas de Petri 90 x 90 mm. Conservar em geladeira.

Ágar fubá (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991)

Fubá (Carrefour)	40 g
Ágar bacteriológico (Difco).....	20 g
Tween 80 (Merck)	10 mL
Água destilada	1000 mL

Dissolver o ágar a quente em 500 mL de água. A parte, misturar o fubá em 500 mL de água destilada, ferver em banho-maria por aproximadamente 45 minutos, filtrar em papel, acrescentar o *tween* 80 e complementar o volume original. Misturar a essa solução o ágar dissolvido na água, distribuir aproximadamente 20 mL em tubos 20 X 200 mm e autoclavar a 120°C, durante 15 minutos. Conservar em geladeira.

Meio N -meio para assimilação de fontes de nitrogênio

(LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991)

Dextrose (Chemco)	20 g
Fosfato de potássio monobásico (Reagen)	1 g
Sulfato de magnésio heptaidratado (Merck)	0,5 g
Ágar bacteriológico (Difco)	15 g
Água destilada.....	1000 mL

Dissolver os componentes a quente na água destilada, distribuir aproximadamente 15 mL em tubos 20 x 200 mm e autoclavar a 120°C, durante 15 minutos. Conservar na geladeira.

Meio C - meio para assimilação de fontes de carbono

(LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991)

Sulfato de amônio (Ecibra)	5 g
Fosfato de potássio monobásico (Reagen)	1 g
Sulfato de magnésio heptaidratado (Merck)	0,5 g
Ágar bacteriológico (Difco)	15 g
Água destilada.....	1000 mL

Dissolver os componentes a quente na água destilada, distribuir aproximadamente 18 mL em tubos 20 x 200 mm e autoclavar a 120°C, durante 15 minutos. Conservar na geladeira.

Meio para fermentação dos carboidratos (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991)

Peptona (Merck)	2,5 g
Extrato de levedura (Oxoid)	2,5 g
Carboidrato.....	3,0 g
Água destilada.....	100 mL

Dissolver os componentes a quente na água destilada, distribuir aproximadamente 4 mL em tubos 13 x 100 mm contendo tubos de Durhan invertidos e autoclavar a 120°C, durante 15 minutos. Abrir a autoclave rapidamente e esfriar em banho de gelo. Conservar na geladeira.

Ágar extrato de malte (PHONGPAICHIT et al., 1987)

Ágar extrato de malte (Himedia)	30,0 g
Ágar bacteriológico (Difco).....	15,0 g
Água destilada.....	1000 mL

Dissolver os componentes na água, autoclavar 15 minutos a 120°C e distribuir aproximadamente 20 mL em placas de Petri 90 x 90 mm. Conservar na geladeira.

APÊNDICE G – Reagentes

Tampão de extração

Tris HCl pH 8,5 a 0,5 M (Invitrogen)	60 mL
Cloreto de sódio (Invitrogen)	2,2 g
EDTA pH 8 a 0,5 M (Invitrogen)	7,5 mL
Dodecil sulfato de sódio (Invitrogen)	0,75 g
Água destilada esterilizada (qsp)	150 mL

Dissolver o cloreto de sódio e o dodecil sulfato de sódio em 100 mL de água, sob agitação, em seguida acrescentar o tris HCl e o EDTA. Acertar o volume em balão volumétrico e autoclavar a 121°C por 20 minutos. Conservar na geladeira.

Tris HCl 0,5 M pH 8,5

Tris HCl (Invitrogen)	12,1 g
Água destilada esterilizada (qsp)	100 mL

Dissolver o Tris HCl em 80 mL de água destilada esterilizada e acertar o pH para 8,5 com NaOH 10 M (Merck). Completar o volume e autoclavar a 121°C por 20 minutos. Conservar na geladeira.

EDTA 0,5 M pH 8

EDTA (Invitrogen)	18,61 g
Água destilada esterilizada (qsp)	100 mL

Dissolver o EDTA em 80 mL de água destilada esterilizada e acertar o pH para 8,0 com NaOH 10 M (Merck). Completar o volume e autoclavar a 121°C por 15 minutos. Conservar na geladeira.

Tampão TBE (Tris – ácido bórico – EDTA, 5X concentrado)

Tris – base (Invitrogen)	54 g
EDTA (Invitrogen)	3,725 g
Ácido bórico (BioAgency)	27,83 g
Água destilada esterilizada (qsp)	1000 mL

Dissolver o tris-base em 500 mL de água, sob agitação, em seguida acrescentar o EDTA e o ácido bórico. Acertar o volume em balão volumétrico. Conservar a temperatura ambiente.

Tampão Loading

Glicerol (Reagen)	6,6 mL
TBE 0,5X	13,4 mL
Azul de bromofenol (Inlab)	0,01 g

Dissolver os componentes no TBE 0,5X. Conservar em geladeira.

Fenol-clorofórmio

Fenol (Invitrogen)	50 g
Clorofórmio (Merck)	48 mL
Álcool isoamílico (Merck)	2 mL
Tampão TE	10 mL

Dissolver o fenol no clorofórmio, sob agitação. Transferir a solução para um frasco escuro e adicionar o álcool isoamílico e o tampão TE.

Tampão TE – Tris-EDTA

Tris – base 1 M (Invitrogen)	10 mL
EDTA 0, 5M pH 8,0 (Invitrogen)	2 mL
Água destilada esterilizada (qsp)	1000 mL

Misturar o tris-base e o EDTA em 500 mL de água. Acertar o volume em balão volumétrico. Conservar em geladeira.

Tampão Tris-NaCl

Tris pH 8,0 (Invitrogen)	5 mL
Cloreto de sódio (Invitrogen)	29,2 g
Água destilada esterilizada (qsp)	500 mL

Dissolver o cloreto de sódio em 400 mL de água destilada esterilizada, sob agitação e, em seguida acrescentar o Tris pH 8,0. Acertar o volume em balão volumétrico. Conservar à temperatura ambiente.

Gel de agarose a 1%

Agarose (BioAgency)	1 g
Tampão TBE 0,5 X	100 mL

Dissolver a agarose no tampão TBE 0,5X a quente, no microondas por 2 minutos, esfriar a aproximadamente 45 °C e verter em cuba específica.

Anexo

ANEXO 1 – Parecer do comitê de ética em pesquisa – FCFRP/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa
Av. do Café, s/nº - Fone: (0xx16) 3602.4213 - Fax: (0xx16) 3602-4877
14040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
e-mail: cep@fcfrp.usp.br

Of. CEP 05/2006 - FCFRP/USP
kms

Ribeirão Preto, 19 de abril de 2006.

Prezada Pós-Graduanda,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "*Candida al*bicans isolada da saliva de estudantes universitários.", apresentado por V. Sa. a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº 70, foi analisado na 48ª reunião deste CEP, realizada no dia 05 de abril de 2006 e considerado **aprovado.**

Em atendimento à Resolução 196/96 deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim
Coordenadora do CEP
FCFRP – USP

Pós-Graduanda
KÁTIA LESTON BACELO
Orientadora: Profª. Drª. Regina Celia Candido
Depto. de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP - USP