



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

NARJARA DO CARMO OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS
ISOLADAS DE CAVIDADE ORAL DE PACIENTES
PORTADORES DE HIV**

Londrina
2006

NARJARA DO CARMO OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS
ISOLADAS DE CAVIDADE ORAL DE PACIENTES
PORTADORES DE HIV**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós Graduação do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof^a Dr^a Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina
2006

NARJARA DO CARMO OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS
ISOLADAS DE CAVIDADE ORAL DE PACIENTES
PORTADORES DE HIV**

BANCA EXAMINADORA:

Profª Drª Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina

Profª Drª Rosa Elisa Carvalho Linhares
Universidade Estadual de Londrina

Profª Drª Helena Keiko Toma
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Londrina, 21 de Fevereiro de 2006.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, que sempre esteve presente em todos os momentos;

E a todos aqueles que fizeram parte da minha luta durante estes dois anos...

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Sueli Fumie Yamada Ogatta, pelos ensinamentos, não somente durante o período do Mestrado, mas também durante a Graduação. Ensinamentos estes que não se limitaram ao profissionalismo no qual tenho certeza de que sempre vou me espelhar, mas também um exemplo de dedicação como mulher, mãe e amiga;

À Prof^a Dr^a Rosa Elisa Carvalho Linhares e Prof^a Dr^a Helena Keiko Toma, pela participação da Banca Examinadora e ajuda na correção deste trabalho;

Aos meus pais, Neuza do Carmo Oliveira e Luiz Cezar de Oliveira e minha irmã Larissa do Carmo Oliveira, por todo apoio, paciência e incentivo, e principalmente pelo amor compartilhado em cada dia;

Aos companheiros e amigos do laboratório: Angélica M. Batista, Erika Izumi, Fábio Hidalgo, Fernando C. Bizerra, Graziela Navarro, Janaína Ferro, Larissa Teotônio, Luciana Furlaneto, Natália S. Botelho, Paulo R. C. Correa, , Rita C. P. Rampazzo, Tatiana A. C. B. Souza, Vanessa Di Raimo, Viviane K. Graça e ao técnico Ediel. Agradeço todos aqueles que fizeram parte da execução deste trabalho, tanto os que ajudaram de forma direta nos experimentos, quanto os que só pela convivência amiga, sorrisos sinceros e “bom dias” já fizeram toda a diferença;

Aos colegas do Mestrado em Microbiologia, principalmente aos meus novos grandes amigos do Lado B: Fabrício Benatti, Jesiane Batista, Tatiana A. C. B. Souza, Sérgio P. D. Rocha, Lígia Faccin. Pelos momentos divididos, os quais se tornaram inesquecivelmente importantes na minha vida!

Aos amigos que, próximos ou distantes, sempre estiveram presentes incentivando a seguir em frente. Pelos sorrisos de aprovação ou pelas broncas, ambos nas horas certas, pelas risadas nos momentos de alegria e pelo ombro amigo nas horas difíceis, pelas discussões filosóficas e existenciais e pelas “briguinhas” bobas também, pelas “baladas” onde os problemas eram totalmente esquecidos e pelos momentos em que tudo parecia estar perdido, mas sempre tinha alguém que não deixava o outro afundar. Sem meus amigos nada teria tido sentido algum;

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelo aprendizado e experiências trocadas não somente durante as disciplinas do Mestrado, mas também durante a convivência diária entre corredores e laboratórios;

Ao Dr. Marcelo Carneiro, pelo fornecimento das amostras e dados clínicos dos pacientes que foram utilizados neste trabalho e colaboração na execução do mesmo, e pela amizade;

A todos que, mesmo que o nome não esteja presente aqui, sabem da sua importância em cada fase da minha vida durante essa longa e difícil caminhada...

... a todos o meu sincero MUITO OBRIGADO!

"De tudo ficam três coisas,
a certeza de que estamos começando,
a certeza que é preciso continuar.
E a certeza de que podemos ser
interrompidos antes de terminar.
Fazer da interrupção um novo caminho,
da queda um passo de dança,
do medo uma escola, do sonho uma ponte,
da procura um encontro.
E assim terá valido a pena."

Fernando Pessoa

OLIVEIRA, N.C. **Identificação e Caracterização de leveduras isoladas de cavidade oral de pacientes portadores de HIV**. 2006. 91f. Dissertação de Mestrado do curso de Pós Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

RESUMO

A candidíase orofaríngea é considerada a infecção oportunista de maior prevalência em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Esta patologia pode ocorrer em mais de 50% dos indivíduos infectados com HIV, e em mais de 80% dos que adquiriram a síndrome da imunodeficiência humana (AIDS), pelo menos uma vez durante o curso da doença. Neste trabalho, foram isoladas leveduras da cavidade oral de pacientes infectados por HIV atendidos no Centro Integrado de Doenças Infecciosas em Londrina, Paraná. Todos os isolados foram identificados e sua atividade proteolítica testada. Adicionalmente foi avaliado o padrão de susceptibilidade *in vitro* dos isolados ao fluconazol. A espécie *Candida albicans* (71,4%) foi o isolado mais prevalente da população estudada. Espécies Não-*albicans* foram isoladas de 8 pacientes (28,6%), e estas foram identificadas como *C. krusei* (3), *C. tropicalis* (2) e três isolados não puderam ser identificados. Somente um isolado de *C. krusei* foi resistente ao fluconazol (CIM = 64 µg/ml), e três foram considerados susceptíveis dose dependente (CIM= 32µg/ml). Com exceção de um, os outros isolados apresentaram atividade proteolítica secretada à caseína do leite. Não foram observadas diferenças na atividade proteolítica entre as amostras de *Candida* de pacientes em *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART) e com o grupo que não se encontrava neste tratamento.

Palavras-chave: *Candida*. Fluconazol. Protease. HIV.

ABSTRACT

Oropharyngeal candidiasis (OPC) is the most prevalent opportunistic infection in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. It may occur in up to 50% of the HIV-infected individuals and in up to 80% of those with acquired immunodeficiency disease syndrome (AIDS), at least once, during the course of their disease. We isolated yeasts from the oral cavity of HIV-infected individuals attended at Centro Integrado de Doenças Infecciosas in Londrina, Paraná. All isolates were identified and tested for secreted proteinase activity. In addition, we evaluated the *in vitro* susceptibility pattern of the isolates against fluconazole. *Candida albicans* (71.4%) was the most prevalent species isolated in the population studied. Non-*albicans* species were isolated from 8 patients (28.6%), and they were identified as *C. krusei* (3), *C. tropicalis* (2) and three isolates could not be identified. Only one isolate of *C. krusei* was resistant to fluconazole (MIC=64 µg/ml) and three were susceptible dose dependent yeasts (MIC=32 µg/ml). Except one, the other isolates showed the presence of secreted proteinase activity on the skimmed milk. No differences in proteinase activity were observed among *Candida* strains isolated from patients on *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART) or the group not receiving this treatment.

Keywords: *Candida*. Fluconazole. Proteinase. HIV.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da morfogênese de *C. albicans*15
- Figura 2:** Clamidósporos. A: Microscopia óptica; B: Microscopia Eletrônica de Varredura 16
- Figura 3:** Localização de Sap *in vitro*. Linhagens de *C. albicans* SAP⁺ e SAP⁻ foram crescidas em meio contendo BSA (meio de indução) e preparadas para microscopia eletrônica de transmissão. A presença de Sap foi detectada através da ligação com anticorpo monoclonal anti-Sap marcado com ouro coloidal. A. *C. albicans* SAP⁻. B. *C. albicans* SAP⁺. As setas mostram as partículas de ouro, indicando sua localização na região da parede celular próxima a membrana citoplasmática 18
- Figura 4:** Localização de Sap *in vivo*. Linhagens de *C. albicans* SAP⁺ e SAP⁻ foram inoculadas intravaginalmente em ratas Wistar ovarioectomizadas. Amostras dos microrganismos foram coletadas de tempos vaiados e preparadas para microscopia eletrônica de transmissão. Em A,B,C as proteínas foram detectadas após ligação com anticorpo monoclonal anti-Sap. A. Célula controle (sem incubação com anticorpo). B. Leveduras após 24 horas de infecção. C. Leveduras após 5 dias de infecção. Não há marcação de partículas de ouro. D. Detecção de Sap através de anticorpo policlonal anti-Sap 18
- Figura 5:** Dendrograma da família SAP de *C. albicans* baseado na seqüência de aminoácidos. Saps 1-3 e Saps 4-6 apresentam 67% e 89% de homologia entre elas. Saps 9 e 10 apresentam seqüência consenso na extremidade C-terminal de proteínas ancoradas a membrana. Sap 7 apresenta cerca de 20 a 27% de homologia entre os demais componentes 19
- Figura 6:** Representação esquemática dos principais domínios de Sap20
- Figura 7:** Crescimento de diferentes espécies de *Candida* em meio CHROMagar. A-B: Colônias de *C. albicans* são lisas e verde-claras. C-D: *C. krusei* cresce formando colônias grandes, rugosas e de coloração rosa. E-F: Colônias azuis apresentando um halo de pigmentação púrpura ao seu redor são características de *C. tropicalis*. G-H: *C. glabrata* formam colônias pequenas, lisas e rosas ..23

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 8: | Candidíase de cavidade oral. A: Candidíase Eritematosa, caracterizada por edema e eritema da mucosa do palato; B: Candidíase Pseudomembranosa, com presença de placas pseudomembranosas confluentes..... | 28 |
| Figura 9: | Identificação Molecular dos isolados. A: Produtos de amplificação do 1° seminested PCR, utilizando os oligonucleotídeos CTSF e CTSR. M: 1Kb Ladder; <i>lanes</i> 1: <i>C.albicans</i> ; 2: <i>C. glabrata</i> ; 3: <i>C. tropicalis</i> . B: Produtos da 2° reação do seminested PCR, utilizando os oligonucleotídeos CTSR e o correspondente espécie-específico: CADET para <i>C. albicans</i> (1), CGDET para <i>C. glabrata</i> (2) e CTDET para <i>C. tropicalis</i> (3); M: 1Kb Ladder. C: Produto de amplificação do (<i>chs 1</i> – PCR) utilizando os oligonucleotídeos KRUS1 e KRUS 2 (<i>lanes</i> 1,2 e 3); M: 1Kb Ladder. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL. | 44 |
| Figura 10: | Atividade proteolítica em placa de amostras clínicas de <i>Candida</i> . A e D – altas produtoras, B – baixa atividade de proteases, C – não produtora..... | 48 |
| Figura 11: | Porcentagem de amostras clínicas de <i>Candida</i> isoladas de cavidade oral de pacientes portadores de HIV de acordo com a produção de proteases..... | 49 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Características fenotípicas diferenciais entre <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> | 22 |
| Tabela 2: Técnicas moleculares empregadas para identificação de <i>Candida</i> sp ... | 24 |
| Tabela 3: Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores para reações de amplificação em cadeia pela polimerase..... | 38 |
| Tabela 4: Classificação da atividade proteolítica segundo valores de Pz | 42 |
| Tabela 5: Dados obtidos através da análise dos isolados de cavidade oral de pacientes portadores de HIV | 50 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 CANDIDA SP | 14 |
| 1.2 PROTEASES..... | 16 |
| 1.3 IDENTIFICAÇÃO | 21 |
| 1.4 CANDIDÍASE | 26 |
| 1.4.1 Candidíase e pacientes HIV positivos | 31 |
| 2 OBJETIVOS | 35 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 36 |
| 3.1 ISOLADOS CLÍNICOS | 36 |
| 3.2 IDENTIFICAÇÃO EM CHROMÁGAR CÂNDIDA | 36 |
| 3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR | 36 |
| 3.3.1 Extração de DNA..... | 36 |
| 3.3.2 Reação em cadeia da polimerase | 37 |
| 3.3.2.1 Oligonucleotídios iniciadores | 37 |
| 3.3.3 Amplificação do DNA..... | 38 |
| 3.3.4 Eletroforese em gel de agarose | 39 |
| 3.4 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS | 40 |
| 3.4.1 Estoque dos antifúngicos | 40 |
| 3.4.2 Teste de sensibilidade..... | 4 |
| 3.5 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR | 41 |
| 3.5.1 Cultura de Indução | 41 |
| 3.5.2 Preparo do Inoculo | 41 |
| 3.5.3 Atividade Proteolítica em Placa..... | 42 |
| 3.5.4 Determinação de Pz..... | 42 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 43 |
| 4.1 PACIENTES..... | 43 |
| 4.2 MEIO CHROMÁGAR CÂNDIDA | 43 |
| 4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR | 44 |
| 4.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS..... | 46 |
| 4.5 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR | 47 |

| | |
|---|----|
| REFERÊNCIAS | 51 |
| ANEXO | 66 |
| ARTIGO 1: <i>CANDIDA</i> SP: IDENTIFICAÇÃO ATRAVÉS DE MEIO CROMOGÊNICO E TÉCNICA DE SEMI-NESTED PCR..... | 67 |
| ARTIGO 2: IDENTIFICATION AND SECRETED PROTEINASE ACTIVITY OF <i>CANDIDA</i> ISOLATES FROM ORAL MUCOSAS OF HIV-INFECTED PATIENTS | 78 |

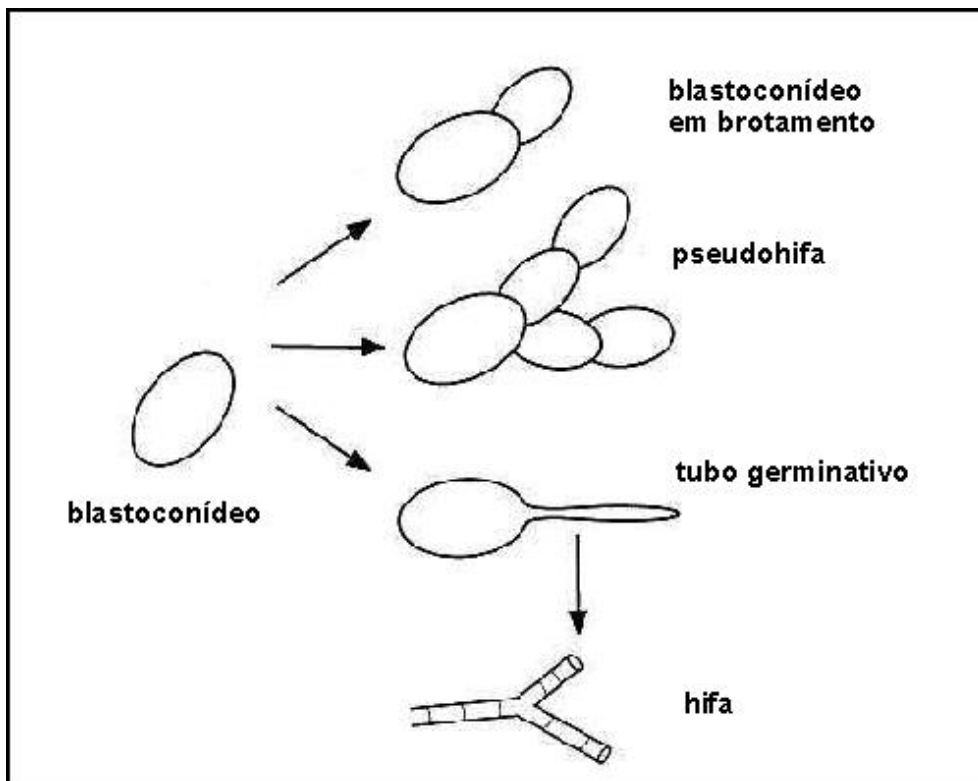
1 INTRODUÇÃO

1.1 CANDIDA SP

O gênero *Candida* compreende espécies comensais de leveduras que são comumente isoladas da vagina e também do trato gastrointestinal, onde vivem em equilíbrio com a microbiota e com o sistema imune do hospedeiro.

Algumas espécies como *C. albicans* são pleomórficas, ou seja, apresentam morfologia variada frente a diferentes condições ambientais, tais formas incluem blastosporos, pseudo-hifas, hifas verdadeiras e clamidosporos (MOLERO e cols., 1998).

Os blastosporos são formas unicelulares ovóides que se dividem assexuadamente por brotamento. Esse processo envolve o crescimento de uma nova célula a partir de um ponto específico na superfície do blastosporos, usualmente no polo distal da cicatriz de um ciclo reprodutivo anterior. O brotamento também pode ocorrer, com menos frequência, de forma bipolar. Posteriormente ocorre a divisão nuclear e um septo é formado entre as células parental e filha. Quando as células-filhas não se desprendem, formam-se as pseudohifas. Na transição levedura-hifa, ocorre inicialmente a formação do tubo germinativo que cresce longitudinalmente através do polo distal. Ocorre a divisão mitótica dentro do tubo e os septos são formados, dando origem às hifas (Figura 1).



Fonte: Medical Microbiology, Samuel Baron, 4th ed. 1996.

Figura 1: Representação esquemática da morfogênese de *C. albicans*.

Os clamidosporos são estruturas de resistência, a semelhança dos esporos bacterianos, formados pela diferenciação das hifas em condições adversas. *In vitro*, os clamidosporos podem ser formados após incubação do fungo em meio contendo extrato de arroz e Tween 80. Apresentam parede espessa, citoplasma concentrado e podem localizar-se no meio ou no final das hifas (Figura 2).

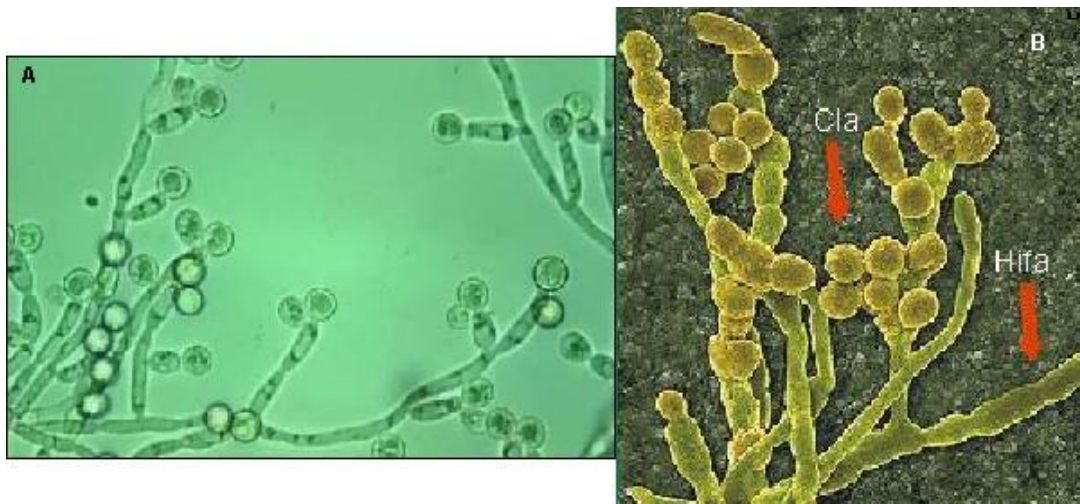


Figura 2: Clamidosporos. **A:** Microscopia óptica; **B:** Microscopia Eletrônica de Varredura.

Diferentes espécies de *Candida* são patógenos oportunistas humanos que vivem como comensais, em um ou mais locais do corpo, na maioria de indivíduos saudáveis podendo, inclusive, atingir altas densidades celulares sem sintomas de doença (SOLL, 2002). Porém, podem causar infecções mucosas, cutâneas e sistêmicas (ROGERS & BARKER, 2002; BARKER e cols., 2004). Embora a maioria das infecções por *Candida* ocorra em resposta a alterações fisiológicas, que afetam principalmente os sistemas de defesa do hospedeiro (FIDEL & SOBEL, 1996), o microrganismo possui algumas características e alguns fatores de virulência que contribuem para promoção da infecção: a) reprodução relativamente rápida; b) alteração morfológica; c) produção de enzimas hidrolíticas, como proteases, lipases e fosfolipases; d) capacidade de adesão ao epitélio do hospedeiro e materiais médicos implantados; e) mudança fenotípica (*switching* fenotípico); e f) variação de superfície e hidrofobicidade (STAIB e cols., 2000; HAYNES, 2001).

1.2 PROTEASES

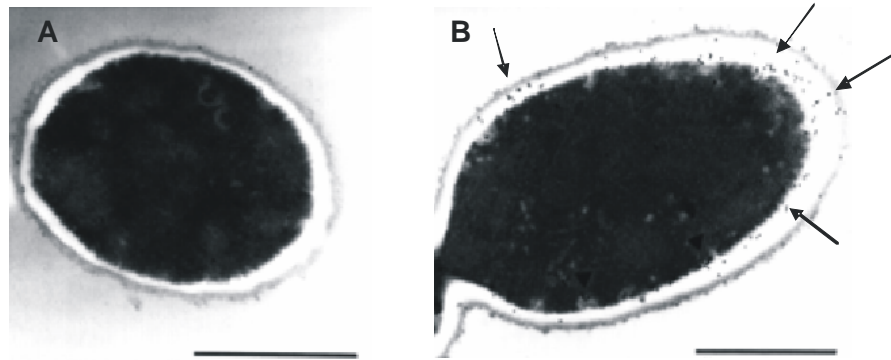
As aspartil proteases são enzimas proteolíticas da família pepsina. Os componentes dessa família caracterizam-se pela presença de dois domínios

contendo o motivo Asp-Thr/Ser-Gly (ácido aspártico-treonina/serina-glicina) no qual, os resíduos de ácido aspártico participam da atividade catalítica. Geralmente apresentam melhor atividade em pH ácido e são especificamente inibidas por pepstanina A (DUNN, 2002).

As aspartil proteases secretadas (“Sap: secreted aspartyl proteinase”) são as principais responsáveis pela atividade proteolítica extracelular de *C. albicans*. Homólogos dessas enzimas também foram detectados em outras espécies de *Candida*, tais como *C. guilhermondii* (MONOD e cols, 1994), *C. tropicalis* (MACDONALD, 1984; TOGNI e cols, 1991; MONOD e cols, 1994; ZAUGG e cols, 2001) *C. parapsilosis* (MACDONALD, 1984; MONOD e cols, 1994), *C. dubliniensis* (GILFILLAN e cols, 1998).

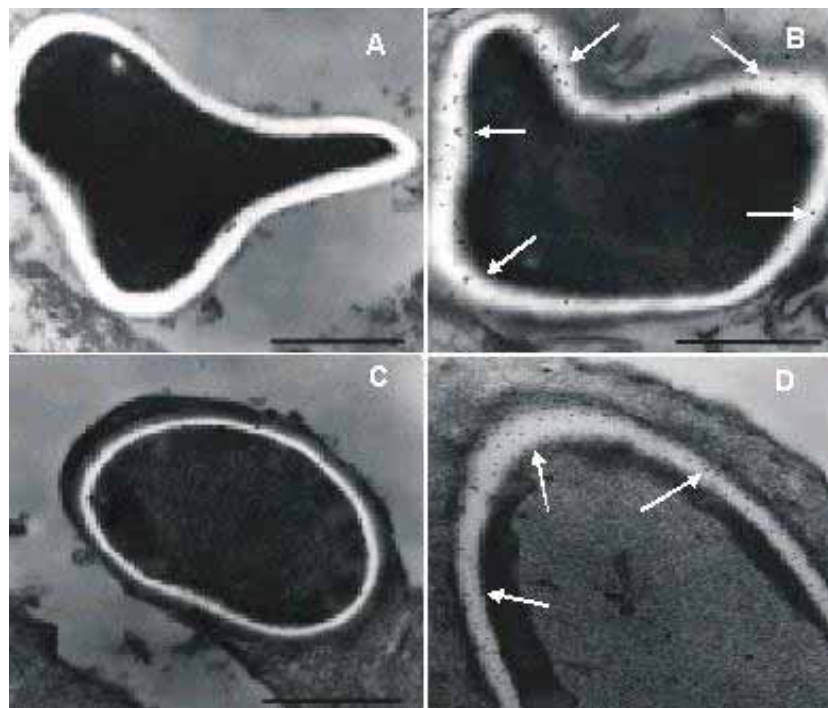
A atividade dessas enzimas pode ser facilmente detectada *in vitro* em culturas de células crescendo em meio contendo uma fonte de nitrogênio exógena, tais como albumina bovina sérica (MACDONALD, 1984; HOMMA e cols., 1993; KURIYAMA e cols., 2003), colágeno e polímeros de L e D-glutamato (LERNER & GOLDMAN, 1993), mucina (COLINA e cols., 1996) e hemoglobina (DOSTÁL e cols., 2003). Além disso, a presença de Saps durante o processo infeccioso também tem sido detectada (DE BERNARDIS e cols., 1999; SCHALLER e cols., 1999b; STAIB e cols., 2000).

A expressão de Sap em meio de cultura inicia no meio da fase de crescimento exponencial, atingindo níveis elevados durante o final da fase log e início da fase estacionária. A atividade proteolítica pode ser detectada no sobrenadante da cultura até 5 dias de crescimento (WHITE e cols., 1993). Stringaro e cols., (1997) utilizando linhagens de *C. albicans* produtora (Sap⁺) e não produtora (Sap⁻) de Saps mostraram que essas proteases localizam-se na parede celular em proximidade da membrana citoplasmática, tanto *in vitro* (Figura 3) como *in vivo* (Figura 4).



Fonte: Strigaro e cols., 1997. Barra: 1µm.

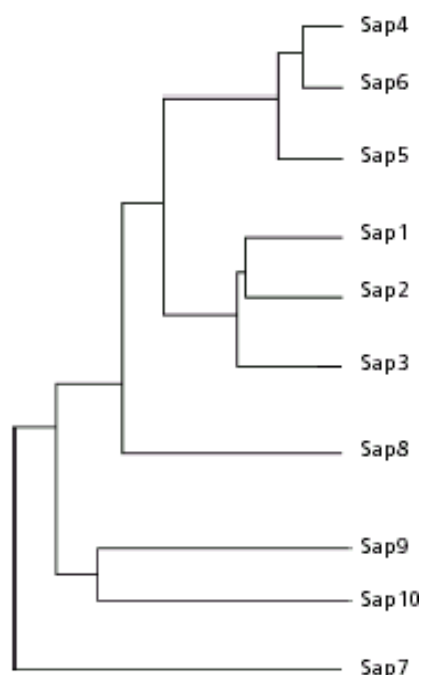
Figura 3: Localização de Sap *in vitro*. Linhagens de *C. albicans* SAP^+ e SAP^- foram crescidas em meio contendo BSA (meio de indução) e preparadas para microscopia eletrônica de transmissão. A presença de Sap foi detectada através da ligação com anticorpo monoclonal anti-Sap marcado com ouro coloidal. **A.** *C. albicans* SAP^- . **B.** *C. albicans* SAP^+ . As setas mostram as partículas de ouro, indicando sua localização na região da parede celular próxima a membrana citoplasmática.



Fonte: Strigaro e cols., 1997. Barra: 1µm.

Figura 4: Localização de Sap *in vivo*. Linhagens de *C. albicans* SAP^+ e SAP^- foram inoculadas intravaginalmente em ratas Wistar ovariectomizadas. Amostras dos microrganismos foram coletadas de tempos variados e preparadas para microscopia eletrônica de transmissão. Em A,B,C as proteínas foram detectadas após ligação com anticorpo monoclonal anti-Sap. **A.** Célula controle (sem incubação com anticorpo). **B.** Leveduras após 24 horas de infecção. **C.** Leveduras após 5 dias de infecção. Não há marcação de partículas de ouro. **D.** Detecção de Sap através de anticorpo policlonal anti-Sap.

As Saps de *C. albicans* compõem uma família de pelo menos 10 genes (*SAP* 1-10), cuja ativação e expressão, ainda não foram totalmente elucidadas. Análises de seqüência de aminoácidos mostram que Saps 1-3 e Saps 4-6 apresentam cerca de 67% e 89% de homologia entre elas. As Saps 9 e 10 apresentam uma seqüência consenso típica de proteínas que ficam ancoradas na membrana celular através de uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Por outro lado, Sap 7 apresenta somente cerca de 20 a 27% de homologia com os demais componentes (STEHR e cols., 2000) (Figura 5).



Fonte: Stehr e cols., 2000.

Figura 5: Dendrograma da família SAP de *C. albicans* baseado na seqüência de aminoácidos. Saps 1-3 e Saps 4-6 apresentam 67% e 89% de homologia entre elas. Saps 9 e 10 apresentam seqüência consenso na extremidade C-terminal de proteínas ancoradas a membrana. Sap 7 apresenta cerca de 20 a 27% de homologia entre os demais componentes.

As Saps são traduzidas como preproenzimas no retículo endoplasmático rugoso (Figura 6). O peptídeo sinal (aproximadamente 60 a 200 resíduos de aminoácidos) é clivado por uma peptidase sinal nesse mesmo compartimento (HUBE & NAGLIK, 2001). A protease Kex2 remove o propeptídeo

Lys-Arg (lisina-arginina) no complexo de Golgi, ativando as Saps que são posteriormente transportadas no interior de vesículas para a superfície celular e são secretadas (NEWPORT & AGABIAN, 1997).



Fonte: Chen e cols., 2002.

Figura 6: Representação esquemática dos principais domínios de Sap.

A participação de Saps durante o estado comensal ou patogênico pode ser evidenciada através de ensaios *in vitro* ou em modelos animais utilizando inibidores enzimáticos específicos (FALLON e cols., 1997; BORG-VON ZEPELIN e cols., 1999; SCHALLER e cols., 2000; SCHALLER e cols., 2003) ou mutantes nulos para esses genes (HUBE e cols., 1997; SANGLARD e cols., 1997; BORG-VON ZEPELIN e cols., 1998; WATTS e cols., 1998; SCHALLER e cols., 1999a; SCHALLER e cols., 2003). E ainda através de ensaios de transformação de *S. cerevisiae* ou *C. albicans* (DUBOIS e cols., 1998; STAIB e cols., 2000).

Vários estudos mostram que as Saps podem contribuir para a adesão ao tecido hospedeiro (WATTS e cols, 1998) e invasão pela degradação ou por causar distúrbios na integridade celular e substâncias intercelulares (MORSCHHÄUSER e cols, 1997), ou ainda, destruindo células e moléculas do sistema imune para evitar ou resistir a seus ataques (KAMINISHI e cols, 1995). Proteínas da matriz extracelular e de superfície tais como queratina, colágeno, laminina, fibronectina e mucina são eficientemente degradadas por essa enzima. Além disso, várias proteínas de defesa do hospedeiro, que são normalmente resistentes à maioria das proteases bacterianas, também podem ser hidrolisadas pela SAP2, como as imunoglobulinas A e G (RÜCHEL, 1986).

O papel das Saps como fator de virulência pode ser reforçado pelo fato de que em pacientes portadores de HIV sob *HAART* associado a inibidores de proteases, a frequência de candidíase orofaríngea tem diminuído quando comparado com pacientes não tratados ou tratados com outras substâncias (De

BERNARDIS e cols., 1996). Esse quadro pode estar associado a menor atividade de Saps dos isolados de leveduras desses pacientes (De BERNARDIS e cols, 2004).

Isolados de leveduras tratados com inibidores de protease (saquinavir e indinavir) mostraram-se menos virulentos *in vitro* (KORTING e cols., 1999). Por outro lado, isolados altamente produtores de proteases mostraram-se mais patogênicos para camundongos quando inoculados por via endovenosa (De BERNARDIS e cols., 1996). E finalmente, Isolados de *C. albicans* de pacientes portadores do vírus HIV apresentaram maior atividade de Saps (OLLERT e cols., 1995; De BERNARDIS e cols., 1996).

1.3 IDENTIFICAÇÃO

A identificação das diferentes espécies de *Candida* por métodos convencionais é trabalhosa e requer longo período de tempo. Estes métodos são baseados na micromorfologia celular e das colônias, assimilação de açúcares e testes de fermentação (KURTZMAN & FELL, 1998). A formação de tubo germinativo em presença de soro *in vitro* e a produção de clamidoconídeos são utilizados em laboratório clínico como critérios preliminares para diferenciar *C. albicans* de espécies Não-*albicans*. Entretanto, *C. dubliniensis* é uma nova espécie (SULLIVAN e cols., 1995), que produz clamidoconídeos e tubo germinativo, e durante muito tempo foi classificada como *C. albicans* atípica devido a outras características fenotípicas diferentes. A Tabela 1 mostra algumas características distintas entre essas duas espécies.

C. dubliniensis é reconhecida como um significativo patógeno humano e está primariamente associada com infecções orais e orofaríngeas em pacientes infectados com vírus HIV. Raramente é encontrada na microbiota normal de indivíduos saudáveis e normalmente encontrada em processos infecciosos em combinação com outras espécies de levedura, especialmente *C. albicans* (SULLIVAN e cols, 2004).

Tabela 1: Características fenotípicas diferenciais entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*

| Características | <i>C. albicans</i> | <i>C. dubliniensis</i> |
|--|---------------------------|-------------------------------|
| Produção de tubo germinativo | ++ | + |
| Produção de clamidoconídeos | + | ++ |
| Crescimento a 37 °C | ++ | ++ |
| Crescimento a 42 °C | + | - |
| Crescimento a 45 °C | + | - |
| Crescimento em caldo com 6,5% NaCl | + | - |
| Utilização de xilose | + | - |
| Utilização de lactato | + | - |
| Utilização de α -metil-D-glucosídeo | + | - |
| Utilização de trealose | + | ± |
| Crescimento em CHROMagar Candida | Azul esverdeada | Verde escura |
| Crescimento em meio Pal | Colônia lisa | Colônia rugosa |

++ Alto; + Médio; - Negativo; ± Intermediário. Fonte: Sullivan e cols., (2004), com modificações.

Vários meios seletivos diferenciais cromogênicos para identificação presuntiva das amostras de *Candida* foram desenvolvidos (ODDS & BERNAERTS, 1994; COOKE e cols., 2002; HORVATH e cols., 2003). Esses meios contêm substratos que reagem com enzimas secretadas pelos fungos produzindo colônias com várias pigmentações. Essas enzimas são espécies-específicas, permitindo identificar os microrganismos através da cor e características da colônia (Figura 7).

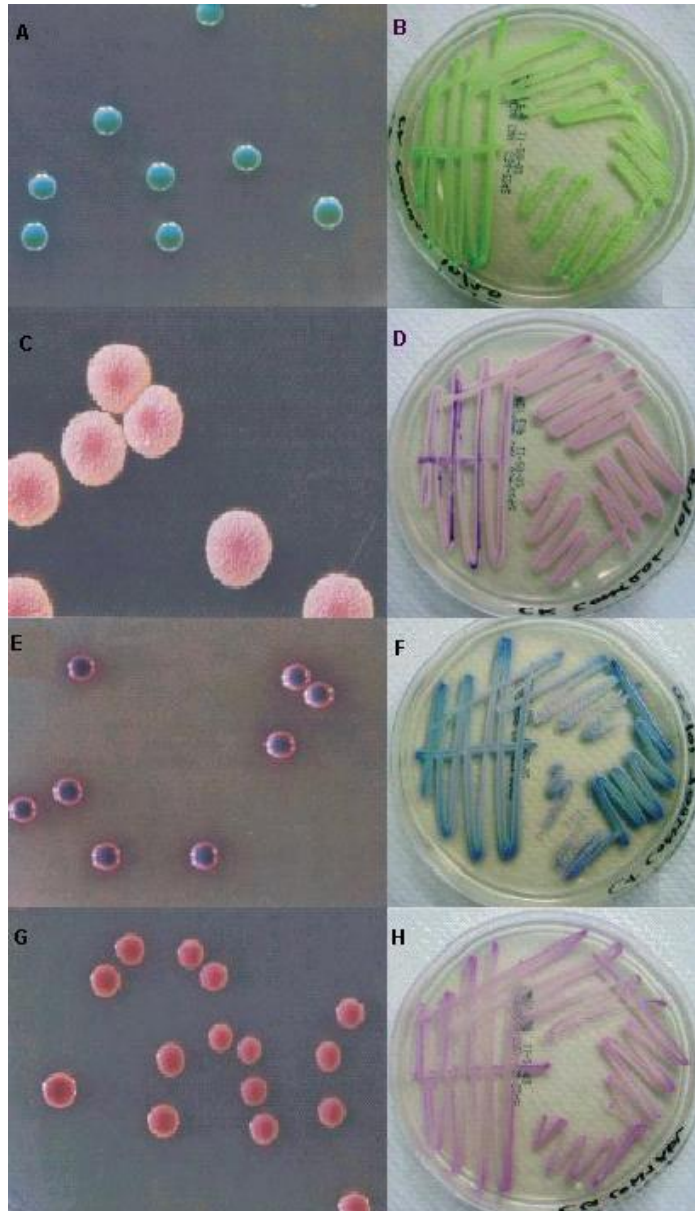


Figura 7: Crescimento de diferentes espécies de *Candida* em meio CHROMagar. **A-B:** Colônias de *C. albicans* são lisas e verde-claras. **C-D:** *C. krusei* cresce formando colônias grandes, rugosas e de coloração rosa. **E-F:** Colônias azuis apresentando um halo de pigmentação púrpura ao seu redor são características de *C. tropicalis*. **G-H:** *C. glabrata* formam colônias pequenas, lisas e rosas. Fonte: A,C,E,G – Odds & Bernaerts, (1994), com modificações. B, D, F, H – Horvath e cols., (2003), com modificações.

As características fenotípicas utilizadas para identificação são influenciadas pelas condições da cultura e, portanto, podem sofrer variação entre as mesmas espécies. Conseqüentemente os métodos moleculares podem ser empregados como ferramenta importante, auxiliando os testes bioquímicos e

morfológicos na identificação de *Candida* sp. Frequentemente esses métodos baseiam-se na técnica de amplificação em cadeia pela polimerase, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos ou randômicos (Tabela 2) (ERJAVEC & VERWEIJ, 2002).

Tabela 2: Técnicas moleculares empregadas para identificação de *Candida* sp.

| Técnica | Descrição | Referência |
|-------------------|---|------------------------|
| PCR em tempo real | Detecção de ITS2 (seqüência espaçadora) dos genes rDNA de amostras cultivadas <i>in vitro</i> . | Park e cols., 2000 |
| | Detecção do domínio D1/D2 da subunidade maior do gene rDNA (LSU rDNA) de amostras ressuspensas em água. | Brinkman e cols., 2003 |
| | Detecção da seqüência de rDNA 18 S de amostras cultivadas <i>in vitro</i> e a partir de sangue de pacientes. | White e cols., 2003. |
| | Detecção de ITS 2 entre a os genes 5.8 S e 28 S de mostras cultivadas <i>in vitro</i> e a partir de sangue. | Maaroufi e cols., 2003 |
| | Detecção de regiões do RNAr de espécies de <i>Candida</i> por PCR em tempo real e <i>pyrosequencing</i> . | Trama e cols., 2005. |
| Multiplex PCR | Amplificação de seqüência complementar ao gene <i>CHS1</i> (quitina sintetase) de amostras isoladas de tartaruga e cultivadas <i>in vitro</i> . | Milde e cols., 2000 |
| | Amplificação de ITS1 e ITS2 de amostras cultivadas <i>in vitro</i> e a partir de sangue de pacientes. | Chang e cols., 2001 |
| PCR | RFLP: amplificação de seqüências complementares a ITS1 e ITS4 seguida de digestão enzimática com as endonucleases de restrição <i>Hae</i> III, <i>Dde</i> I e <i>Bfa</i> I. Amostras obtidas a partir de cultura <i>in vitro</i> . | Williams e cols., 1995 |
| | RFLP: amplificação de uma região do gene <i>L1A1</i> (lanosterol 14- α demetilase) seguida da digestão enzimática com <i>Hinc</i> II, <i>Nsi</i> I e <i>Sau</i> 3A. As amostras são provenientes de cultura <i>in vitro</i> e de diferentes sítios anatômicos. | Morace e cols., 1997 |

| | | |
|--|---|--|
| | Amplificação de seqüências complementares a região 18 S do rDNA Seguida de hibridação com seqüências espécie-específicas a partir de amostras cultivadas <i>in vitro</i> . | Loeffler e cols., 2000 |
| | Amplificação de seqüências complementares a região 28 S do rDNA seguida de análise de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) a partir de amostras cultivadas <i>in vitro</i> . | Hui e cols., 2000 |
| | Semi-nested PCR: amplificação de seqüências complementares a extremidade 3' do rDNA 5.8 S e 5' do rDNA 28 S. Amostras obtidas a partir de cultura <i>in vitro</i> e sangue de pacientes. | Ahmad e cols., 2002 |
| | AFLP: amplificação de fragmentos de DNA ligados previamente a adaptadores e análise em gel de agarose. Amostras obtidas a partir de cultura <i>in vitro</i> . | Borst e cols., 2003 |
| | RAPD: amplificação utilizando oligonucleotídeos randômicos a partir de cultura <i>in vitro</i> . | Bautista-Muñoz e cols., 2003 |
| | Amplificação do gene <i>CaMP65</i> para identificação em amostras biológicas, como sangue, soro e urina. | Arancia e cols., 2004. |
| | RFLP: Análise do padrão de restrição de regiões do RNAr a cinco diferentes enzimas de restrição. | Deak e cols., 2004. |
| | PCR-EIA: amplificação de fragmento correspondente região entre ITS3 e ITS4 seguida de ensaio imunoenzimático, utilizando os amplicons como "antígeno". | Coignard e cols., 2004 |
| | Amplificação de seqüências repetitivas (RPS) de <i>C. albicans</i> , com objetivo de diferenciar <i>C. albicans</i> de <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. stellatoidea</i> . | Kanbe e cols., 2005. |
| | Amplificação da região ITS1, sequenciamento e análise de SSCP (<i>single stranded conformation polymorphism</i>) | Kumar e cols., 2005. |
| NASBA: Nucleic Acid Sequence Based Amplification | Amplificação em cadeia pela polimerase a partir de RNA (reação de RT, RNase H, T7 RNA polimerase a 41 °C acopladas) correspondente a região 18 S do rDNA. Amostras obtidas a partir de cultura <i>in vitro</i> e sangue de pacientes. | Widjoatmodjo e cols., 1999 Loeffler e cols., 2003 |

| | | |
|----------------|---|---------------------------|
| Sequenciamento | Análise de seqüência de fragmento complementar a região 18 S do rDNA | Gharizadeh e cols., 2004 |
| | Análise da seqüência do domínio D1D2 do gene do RNAr 26S, região ITS1 do RNAr 5,8S e região ITS2. | Suezawa e cols., 2006. |
| DNA Microarray | Análise através de DNA Microarray através da variação de seqüência das regiões ITS do gene do RNAr. | Leinberger e cols., 2005. |

1.4 CANDIDÍASE

A freqüência de infecções fúngicas humanas vem crescendo constantemente nos últimos anos. Ainda que estas infecções em geral sejam menos comuns do que as infecções bacterianas, pelo menos três aspectos as tornam cada vez mais relevantes. Primeiro, infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos representam uma causa cada vez mais comum de morbidade e mortalidade. Muitos fatores têm contribuído para o aumento dessas infecções oportunistas: pacientes com infecção por HIV, quimioterapias prolongadas, imunossupressão depois de transplantes, aumento em procedimentos médicos invasivos e tratamentos com corticosteróides e antibióticos de largo espectro. Segundo, mesmo com a existência de muitos compostos antifúngicos, estes, freqüentemente, têm uso limitado devido a alta toxicidade e efeitos colaterais (De BACKER e cols., 2000). E terceiro, a ocorrência de isolados resistentes a agentes antifúngicos (CIRAK e cols., 2003).

Dentre as infecções por fungos oportunistas que emergiram, principalmente como uma causa importante de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos, destacam-se as espécies de *Candida* e *Aspergillus* (revisto por WALSH & GROLL, 1999; e RICHARDSON, 2005). As infecções causadas por esses fungos, juntamente com espécies de *Cryptococcus* e *Mucoraceae* são mais freqüentes em pacientes neutropênicos. E as espécies de *Histoplasma*, *Coccidioides* e *Blastomyces* acometem principalmente indivíduos que apresentam imunidade celular comprometida (revisto por RICHARDSON, 2005).

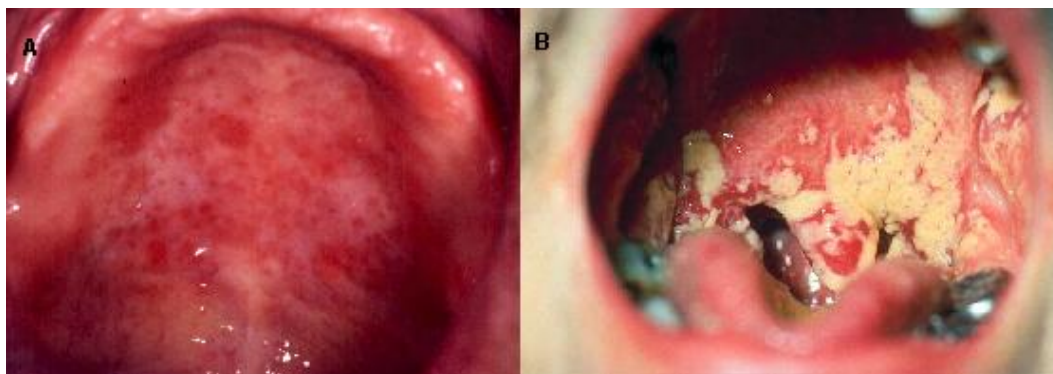
Outras espécies fúngicas menos freqüentes, mas clinicamente importantes, incluem *Fusarium* sp, *Acremonium* sp., *Paecilomyces* sp., *Trichoderma* sp., *Pseudallescheria* sp., *Bipolaris* sp., e *Cladophialophora* sp. As micoses causadas por esses agentes freqüentemente são refratárias à terapia convencional. Um número crescente de diferentes membros da classe *Zygomycetes* tem surgido como causa de importantes infecções letais, apesar da existência de medicamentos agressivos e intervenções cirúrgicas (revisto por WALSH & GROLL, 1999).

As infecções causadas por *Candida* sp. podem ser divididas em duas classes principais: infecção superficial e sistêmica. A candidíase superficial (mucosa ou cutânea) resulta de um desequilíbrio local, o que leva a um aumento no número de células fúngicas, causando danos ou invasão do epitélio local. As infecções de mucosa são mais freqüentes na cavidade oral (orofaringe - “sapinho” e esôfago – esofagite) e vaginal.

A candidíase de mucosas caracteriza pela presença de placas pseudomembranas pontuais ou confluentes (colônias visíveis do fungo), eritema (colônias não visíveis). Ainda podem ocorrer queilite angular (fissuras no “canto” da boca), e na vagina, prurido e corrimento (VAN BURIK & MAGEE, 2001).

A candidíase oral pode ser classificada em quatro tipos clínicos distintos (CANNON e cols., 1995):

- a. Candidíase pseudomembranosa: caracterizada pela presença de placas esbranquiçadas, facilmente removidas, na mucosa oral e língua (Figura 8B);
- b. Candidíase eritematosa crônica: normalmente está associada ao uso de próteses dentárias . Apresenta edema e eritema de mucosa do palato (Figura 8A);
- c. Candidíase hiperplástica crônica: apresenta lesões esbranquiçadas e quando submetidas à biópsia, são encontradas hiperplasia epitelial e formas filamentosas do fungo. Pode estar associada à presença de câncer na cavidade oral;
- d. Candidíase eritematosa aguda: a mucosa oral, particularmente a língua, apresenta-se avermelhada. Pode ocorrer após o uso de antimicrobianos de largo espectro ou esteróides.



Fonte: www.med.sc.edu85

Figura 8: Candidíase de cavidade oral. A: Candidíase Eritematosa, caracterizada por edema e eritema da mucosa do palato; B: Candidíase Pseudomembranosa, com presença de placas pseudomembranosas confluentes.

As infecções cutâneas geralmente são precedidas por traumas na pele ou em regiões úmidas e quentes do corpo, tais como axilas, virilha, “dobras” inframamárias e interglúteas (candidíase intertriginosa). Nas regiões interdigitais, a frequência de candidíase geralmente está associada a repetidas imersões em água, como ocorre com as lavadeiras e nadadores. A infecção de unhas (onicomicose) por *Candida*, em geral, é indolor e apresenta um inchaço ao redor das mesmas (MITCHELL, 1998).

Entre as infecções sistêmicas por *Candida sp.* vale salientar a infecção da corrente sangüínea e acometimento de órgãos como resultado da disseminação hematogênica das leveduras. Geralmente essas complicações são documentadas em pacientes que possuem fatores de riscos importantes, como longo período de internação, tratamento quimioterápico, imunodeficiência, antibioticoterapia e uso de catéter venoso central (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

O tratamento das infecções por *Candida* é geralmente efetivo e freqüentemente envolve o uso tópico ou sistêmico de antifúngicos tais como polienos, e derivados azólicos.

A anfotericina B, um derivado poliênico, ainda considerada a melhor escolha para o tratamento da maioria das micoses sistêmicas, foi descoberta somente no começo dos anos cinqüenta. No final dos anos 70, os derivados azólicos foram introduzidos na terapia antifúngica. Iniciou-se a utilização do miconazol via

intravenosa e cetoconazol por via oral, e a partir dos anos 80 as opções para tratamento sistêmico se expandiram com o desenvolvimento do fluconazol e itraconazol (GRAYBILL, 1996). Uma razão para este lento progresso em medicamentos disponíveis para terapia é que os fungos são eucarióticos como as células de mamíferos, e assim os agentes que inibem produção de proteína, RNA e síntese de DNA apresentam grande potencial para toxicidade.

Os derivados azólicos possuem atividade terapêutica contra diferentes espécies de *Candida*. Dentre eles, o fluconazol mostra eficiência e tolerância satisfatória. Entretanto, recentemente um aumento na resistência ao fluconazol tem sido relatado, e a resistência a agentes antifúngicos tem rapidamente se tornado um grande problema, principalmente em pacientes imunocomprometidos (CIRAK *e cols.*, 2003).

Os derivados azólicos, descobertos na década de 60, são totalmente sintéticos e pertencem ao grupo de antifúngicos que se expandiu mais rapidamente. Eles são classificados em imidazóis e triazóis, com base na quantidade e posição dos átomos nitrogênio no anel azólico. Eles têm atividade fungistática e de amplo espectro, que inclui a maioria das leveduras e fungos filamentosos e alguns patógenos emergentes (GEORGOPAPADAKOU, 1998).

Os derivados azólicos afetam a biossíntese do ergosterol, o esterol principal da membrana plasmática fúngica. Estes atuam na fase de demetilação do C-14, em uma reação oxidativa de três passos catalizada por uma enzima do sistema citocromo P-450, a esterol 14 α -demetilase. Esta enzima chave na via de biossíntese do ergosterol catalisa a remoção oxidativa do grupo 14 α -metil do lanosterol. Os antifúngicos se ligam ao grupo heme, no sítio ativo da 14 α -demetilase, dessa forma atuando por inibição competitiva (MORSCHHÄUSER, 2002). A depleção resultante de ergosterol e o acúmulo de lanosterol e de outros esteróis demetilados torna a estrutura da membrana plasmática mais vulnerável a danos, e altera a atividade de muitas enzimas ligadas à membrana (GEORGOPAPADAKOU, 1998).

O tratamento da candidíase foi bastante facilitado com a introdução dos derivados azólicos, principalmente o fluconazol, em meados dos anos 1990s. Porém o uso prolongado e repetido do fluconazol no tratamento de candidíase

resultou num aumento da freqüência de terapias falhas causadas pela emergência de cepas de *Candida* resistentes ao fluconazol (MORSCHHÄUSER, 2002).

Resistência aos agentes antimicrobianos pode ser considerada como uma manifestação complexa de fatores envolvendo hospedeiro e patógeno. Do ponto de vista clínico, resistência pode ser definida como persistência ou progressão da infecção mesmo em curso de terapia antimicrobiana. Fatores como, sensibilidade do patógeno ao antimicrobiano, estado geral do indivíduo, farmacocinética e interações da substância utilizada, bem como capacidade de produção de biofilme pelo agente etiológico, podem influenciar no tratamento da infecção (COWEN e cols., 2002).

Muitos mecanismos moleculares que contribuem para a resistência aos compostos azólicos de isolados de *Candida* têm sido identificados. Em *Candida albicans*, três mecanismos de resistência foram descritos: 1) alteração ou superexpressão do sítio de ligação da enzima (14α -esterol-demetilase, codificada pelo *ERG11*), 2) mutações com perda de função na via do ergosterol (Δ -5,6-desaturase codificada por *ERG3*), permitindo o acúmulo de menos esteróis tóxicos na presença dos antifúngicos, e 3) acúmulo intracelular, dos derivados azólicos, reduzido devido ao efluxo ativo (KONTOYIANNIS & LEWIS 2002).

Na presença do fluconazol, o gene *ERG11* de *C. albicans* tem expressão aumentada, presumivelmente como um mecanismo de *feedback* à depleção de ergosterol. Mesmo na ausência de fluconazol, alguns isolados resistentes expressam RNAm de *ERG11* em níveis mais altos do que alguns isolados susceptíveis em presença da droga (MORSCHHÄUSER, 2002).

Um importante mecanismo de resistência ao fluconazol é o nível intracelular reduzido da droga. Recentemente tornou-se evidente que o fluconazol é ativamente transportado para fora das células de uma forma dependente de energia, e que o aumento desse efluxo é causado pela superexpressão de genes que codificam proteínas transportadoras de membrana (MORSCHHÄUSER, 2002).

Três genes com um papel definido em efluxo têm sido descritos em *C. albicans*: *CDR1* e *CDR2*, que codificam membros da superfamília de transportadores ligados ao ATP (transportadores ABC), e o *MDR1*, pertence à superfamília dos facilitadores principais. Os MDRs utilizam o gradiente eletroquímico existente através da membrana como energia de transporte, enquanto os

transportadores ABC utilizam ATP como fonte de energia (KONTOYIANNIS & LEWIS 2002).

A família *CDR* em *C. albicans* compreende muitos outros genes, mas além de *CDR1* e *CDR2*, não há evidências do envolvimento de outros membros desta família na resistência ao fluconazol (MORSCHHÄUSER, 2002).

Na presença de fluconazol, *C. albicans* induz a expressão do gene *ERG11* acima do seu nível normal, presumivelmente em resposta à limitação de ergosterol. Em contraste, os genes que codificam bombas de efluxo, *MDR1*, *CDR1* e *CDR2*, não são ativados nas mesmas condições. Dessa forma, em muitos isolados clínicos de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, estes genes são constitutivamente expressos, indicando que devem ocorrer mutações nessas cepas que alteram a regulação desses genes (MORSCHHÄUSER, 2002).

O desenvolvimento de resistência a esses antifúngicos é mediado por múltiplos mecanismos, estes podem estar operantes em um mesmo isolado (PEREA e cols., 2001; GOLDMAN e cols., 2004).

1.4.1 Candidíase e pacientes HIV positivos

Desde que o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) foi descrito na década de 1980, a infecção por esse parasita alcançou proporções de pandemia. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003), mais de cinco milhões de pessoas adquiriram HIV no ano de 2003, resultando num total de 42 milhões de pessoas infectadas em todo mundo. Aproximadamente 70% destas pessoas vivem na África Sub-Sahara e Ásia. Estimativas indicam que mais de 3 milhões de pessoas não tratadas morrerão por ano de HIV/AIDS. Projeções para os próximos 10 anos sugerem que a situação se tornará ainda mais séria, com possivelmente 100 milhões de pessoas infectadas em todo mundo (PATTANAPANYASAT & THAKAR, 2005).

Estudos recentes sugerem que a patogênese da infecção por HIV resulta em duas fases seqüenciais distintas que envolvem mecanismos diferentes: a primeira fase (infecção viral aguda) é caracterizada por uma destruição rápida e massiva de células T CD4⁺ de memória, resultante da multiplicação do vírus. Isso

acontece preferencialmente nas mucosas dos tecidos, afetando toda a função do sistema imunológico. Ainda não está totalmente esclarecido o que determina, em poucas semanas, o final dessa fase primária. Entretanto possíveis explicações incluem a destruição das células-alvo disponíveis para replicação viral e a geração de uma resposta específica anti-HIV.

A segunda fase (infecção crônica), que pode se estender por vários anos, é caracterizada pela batalha do sistema imunológico em recuperar a injúria sofrida anteriormente. Contudo, a luta contra o HIV continua e como a barreira imunológica de mucosas contra patógenos invasores é quebrada com a destruição das células T CD4⁺, o organismo fica mais propenso às infecções pelos mesmos. Esse quadro resulta em um estado de ativação imunológica crônica que induz a mais depleção de células T CD4⁺, causando danos adicionais ao sistema imunológico. Os mecanismos associados a esse estado são complexos, entretanto a depleção das células pode ser decorrente de alguns fatores como: a ativação de células T CD4⁺ propicia novos substratos para multiplicação viral; a rápida renovação dessas células induz a diminuição dos estoques de células virgens e células T de memória; a ativação constante e proliferação dessas células podem afetar o controle do ciclo celular e aumentar a frequência de apoptose (revisado por DERDEYN & SILVESTRI, 2005).

Entre pacientes HIV positivos, a candidíase orofaríngea é a infecção oportunista mais freqüente e estima-se que 90% desses indivíduos desenvolvam essa patologia em algum período de sua vida (SAMARANAYAKE, 1992; HUNG e cols., 2005). E também, meningoencefalites devido a *Cryptococcus neoformans*, aparecem entre as infecções mais comuns (revisado por PAPPALARDO & MELHEM, 2003). A progressiva imunodeficiência celular, com contagens de linfócitos CD4⁺ menores que 200 células/mm³, é um fator de risco para colonização por espécies de *Candida* e desenvolvimento de candidíases (CROWE e cols., 1991; revisado por McCARTHY, 1992).

Durante a infecção crônica assintomática, tanto a candidíase eritematosa quanto a pseudomembranosa são consideradas preditivas de progressão da imunodeficiência e estabelecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), independentemente da contagem de células CD4⁺ (REPENTIGNY e cols., 2004).

A prevalência da forma pseudomembranosa da candidíase oral e esofágica aumenta significativamente quando a AIDS encontra-se em estágio bastante avançado (revisto por McCARTHY, 1992; PATTON, 2000; VARGAS & JOLY, 2002). Por sua vez, a candidíase eritematosa e queilite angular ocorrem em menor frequência durante a fase tardia da doença (ROBINSON e cols., 1997; PATTON, 2000).

As lesões orais causadas por *Candida* sp em indivíduos HIV positivos são crônicas e caracterizam-se pela severidade do quadro clínico. Além disso, muitos isolados apresentam resistência aos agentes antifúngicos de uso clínico (MELO e cols., 2004; MIGLIORATI e cols., 2004; HUNG e cols., 2005; SÁNCHEZ-VARGAS e cols., 2005).

A introdução da terapia antiretroviral – *HAART* (*highly active antiretroviral therapy*) em 1996, incluindo inibidores de protease, reduziu dramaticamente a prevalência de candidíase oral e esofágica, bem como no número de recidivas e colonização assintomática por *C. albicans* em pacientes HIV positivos. Considerada uma terapia muito eficiente, *HAART* diminui a carga viral e promove um aumento na contagem de linfócitos CD4⁺, resultando numa melhora da imunidade e diminuição da incidência de infecções oportunistas (YANG e cols., 2006; revisto por REPENTIGNY e cols., 2004).

Os inibidores de proteases virais também podem agir diretamente sobre a atividade das aspartil proteases secretadas (SAPs), um importante fator de virulência de *Candida* sp, tanto *in vitro* (CASSONE e cols., 1999; KORTING e cols., 1999; ASCENCIO e cols., 2005) quanto *in vivo* (CASSONE e cols., 2002; De BERNARDIS e cols., 2004; MIGLIORATI e cols., 2004). E em presença dessas substâncias, a adesão da levedura às células do hospedeiro é inibida (BORG-VON ZEPPELIN e cols., 1999; BEKTIC e cols., 2001). Como consequência, não ocorre invasão e injúria, uma vez que evento inicial na patogênese das doenças infecciosas é a adesão microbiana aos tecidos do hospedeiro.

Foram detectados episódios recorrentes de candidíase oral e esofágica em pacientes que apresentavam contagem baixa de células CD4⁺ apesar da *HAART*. Já em pacientes cuja contagem celular aumentou em resposta a *HAART*, estes apresentavam baixo risco de desenvolverem candidíase (ARRIBAS e cols., 2000; revisto por KAPLAN e cols., 2000). Esses dados estabelecem uma

correlação entre a reconstituição do número de células CD4⁺ e a diminuição da incidência de candidíase mucosa.

Diferentes espécies de *Candida* têm sido isoladas em amostras clínicas humanas. No geral, *C. albicans* é a espécie mais prevalente, inclusive entre aqueles portadores de HIV (VARGAS & JOLY, 2002; SCHMIDT-WESTHAUSEN e cols., 2004; HUNG e cols., 2005; SÁNCHEZ-VARGAS e cols., 2005).

No Brasil, *C. albicans* também é a espécie mais freqüentemente isolada de pacientes HIV positivos. Ribeiro e cols. (2004), mostraram que essa espécie foi a mais prevalente tanto em amostras orais e vaginais provenientes de pacientes HIV positivos e negativos.

Melo e cols. (2004) realizaram um trabalho pioneiro no Brasil utilizando somente pacientes HIV positivos em HAART. Cerca de 57,8% dos isolados foram identificados como *C. albicans* e 42,1% como não-*albicans*, entre elas *C. krusei* foi a mais freqüente. Em um trabalho anterior, 48 (37%) dentre os 130 pacientes com AIDS estavam sob HAART durante o momento da coleta. Nesse caso, *C. albicans* correspondeu a 91% dos isolados e somente 9% eram espécies não-*albicans*, sendo *C. glabrata* a mais freqüente (SANT'ANA e cols., 2002).

Migliorati e cols. (2004) também utilizaram pacientes HIV positivos sob HAART e, novamente, a espécie mais isolada foi *C. albicans* (68%), seguida de *C. famata* (14%). E finalmente, Portela e cols. (2004) mostraram que *C. albicans* foi a espécie mais isolada de amostras subgingivais de crianças HIV positivas, sem sintomas de candidíase, seguida de *C. dubliniensis*.

A colonização oral assintomática por *C. albicans* também foi relatada em pacientes HIV positivos e quando comparados com outros grupos de risco, esses indivíduos apresentavam maior concentração fúngica (FETTER e cols, 1993; VARGAS & JOLY, 2002; CAMPISI e cols., 2002).

2 OBJETIVOS

- Isolamento de leveduras da cavidade oral de pacientes portadores de HIV;
- Identificação dos isolados;
- Determinação da susceptibilidade ao fluconazol;
- Determinação da atividade proteolítica extracelular;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ISOLADOS CLÍNICOS

As amostras de cavidade oral de pacientes portadores de HIV atendidos no Centro Integrado de Doenças Infecciosas (CIDI), Londrina-PR, foram coletadas com o auxílio de “swabs” estéreis, da parede interna da bochecha, e logo após cultivadas por 3 horas em meio Sabouraud caldo com 50 µg/mL de cloranfenicol. A partir desta cultura foram obtidas colônias isoladas em meio Sabouraud ágar com 50 µg/mL de cloranfenicol, e estas estocadas para posterior identificação.

3.2 IDENTIFICAÇÃO EM CHROMÁGAR *CANDIDA*

As colônias isoladas foram submetidas a crescimento em meio CHROMágar *Candida*, a 37 °C por 24 a 48 horas. A identificação das leveduras foi realizada através da cor e morfologia colonial segundo os critérios estabelecidos em Horvath e cols., (2003) e Hospenthal e cols., (2006).

3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR:

3.3.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído pelo método descrito por Jain e cols. (2001) com algumas modificações. Resumidamente, os isolados clínicos foram cultivados em 3 mL de meio Sabouraud líquido a 37 °C sob agitação até a fase estacionária. As células foram centrifugadas a 13.000 rpm e lavadas com 1,5 mL de

água destilada esterilizada. O sedimento foi ressuspenso em 500 µL de tampão de lise TENTs (10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl 2% v/v Triton X-100, 1% SDS, e) e 2 pérolas de vidro (2 mm). Em seguida foram adicionados 400 µL de fenol saturado e a suspensão foi homogeneizada em vórtex por 3 minutos. A fase aquosa foi removida após centrifugação da mistura a 13.000 rpm por 5 minutos e transferida para novo tubo e desproteinizada com fenol-clorofórmio álcool isoamílico (25:24:1,v/v). O DNA presente na fase aquosa foi precipitado com etanol absoluto por 2 horas, lavado com etanol 70% (v/v), seco e ressuspenso com 50 µL de água deionizada estéril. O DNA foi tratado com 1µL RNase A (1 mg/mL) a 37°C por 1 hora e as concentrações foram estimadas por eletroforese em gel de agarose como descrito por Sambrook & Russel (2001).

3.3.2 Reação em cadeia da polimerase

A identificação molecular das leveduras foi realizada através da reação em cadeia pela polimerase (PCR).

3.3.2.1 Oligonucleotídios iniciadores

Seminested PCR (snPCR - Ahmad e cols, 2002)

Para a identificação dos isolados de *Candida* sp. foram utilizados os seguintes iniciadores: oligonucleotídeo direto universal, CTsF, oligonucleotídeo reverso CTsR, capazes de amplificar o final da extremidade 3' do DNA ribossomal (rDNA) 5.8 S e a extremidade 5' inicial do rDNA 28 S e a região espaçadora interna. Para realização do segundo ciclo de amplificação foram utilizados oligonucleotídeos espécie-específicos que derivam da região ITS2 de *C.albicans* (CADET), *C.parapsilosis* (CPDEP), *C.tropicalis* (CTDET) e *C.glabrata* (CGDET), (Tabela 1).

Gene CHS 1 (quitina sintetase) (CHS 1 – PCR)

Durante a realização da técnica de semi-nested PCR, as amostras identificadas em CHROMágar como *C. krusei* não puderam ser identificadas pelo

método anterior, descrita por Ahmad e *cols.*, (2002) . Para confirmar os resultados obtidos por CHROMágar, foi necessário utilizar outra metodologia de identificação.

Dessa forma, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores complementares a uma seqüência do gene que codifica quitina sintetase, denominados KRUS 1 e KRUS2 (Tabela 3) descrito por Milde e *cols.*, (2000).

Tabela 3: Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores para reações de amplificação em cadeia pela polimerase.

| Oligonucleotídeo | Seqüência 5' → 3' | Referências |
|------------------|----------------------------|-----------------------------|
| CTSF | TCGCATCGAT GAAGAACGCAGC | Ahmad e <i>cols.</i> , 2002 |
| CTSR | TCTTTTCCTCCGCTTAT TGATATGC | Ahmad e <i>cols.</i> , 2002 |
| CADET | ATTGCTTGCGGCGGTAACGTCC | Ahmad e <i>cols.</i> , 2002 |
| CPDET | TCTTTTCCTCCGCTTAT TGATATGC | Ahmad e <i>cols.</i> , 2002 |
| CGDET | TAGGTTTTACCAAC TCGGTGTT | Ahmad e <i>cols.</i> , 2002 |
| CTDET | ATTTTGCTAGTGGCC | Ahmad e <i>cols.</i> , 2002 |
| KRUS 1 | GGTTGACACTTCGCATAC | Milde e <i>cols.</i> , 2000 |
| KRUS 2 | CGTATGTGACCAGTGAC | Milde e <i>cols.</i> , 2000 |

3.3.3 Amplificação do DNA

A reação de amplificação de DNA do snPCR foi realizada em tubos de 0,2 mL, com volume total de 20 µL contendo 1X tampão para PCR (200 mM Tris HCl pH 8,4, 500 mM KCl, 2 mM MgCl), 1 U *Taq* DNA polimerase, 10 pmol dos iniciadores, 1 µL do DNA extraído da cultura (cerca de 10 ng) , 0,1 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato.

No primeiro ciclo de amplificação do snPCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores universais CTSF e CTSR nas seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 7 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e finalmente um ciclo a 72°C por 10 minutos.

Após o primeiro ciclo de amplificação 1 μ L do produto (cerca de 10 ng) foi utilizado como substrato para o segundo ciclo de amplificação utilizando a combinação do iniciador reverso universal (CTSR) e um oligonucleotídeo espécie-específico. A reação de amplificação foi realizada contendo 1X tampão para PCR, 1 U *Taq* DNA polimerase, 5 pmol de CTSR juntamente com 5pmol de CADET, CPDET, CGDET ou CTDET, 1 μ L do produto do primeiro PCR, 0,1 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato.

CHS-1-PCR foi realizada segundo Milde e cols (2000), na seguinte condição: 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, anelamento a 40°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos.

3.3.4 Eletroforese em gel de agarose

A migração eletroforética do DNA em géis de agarose foi realizada em sistema de gel submerso em tampão TBE (89 mM Tris base; 89 mM Ácido bórico; 2 mM EDTA; pH 8,3). O gel, em diferentes concentrações (0,8 a 2,5%) foi preparado em TBE. As amostras e um padrão de peso molecular (100 pb Ladder - Invitrogen) foram aplicados em tampão de amostra para DNA 1X (Ficoll 400 2,5%; Azul de bromofenol 0,025%; Xileno cianol FF 0,025%). O sistema foi submetido a uma diferença de potencial (70 a 100V) com amperagem constante.

As moléculas de DNA foram visualizadas após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) por 30 minutos e observação em comprimento de onda ultravioleta (260 nm).

3.4 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

3.4.1 Estoque do antifúngico

Fluconazol (Pfizer)

O pó liofilizado foi dissolvido em solução de dimetil sulfóxido (DMSO) a 20%, a uma concentração de 5 mg/mL. A solução foi mantida a 4 °C até 3 meses.

3.4.2 Teste de sensibilidade

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo, segundo normas preconizadas pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2005) Norma M27-A2.

Dessa forma foi utilizado o meio RPMI 1640 suplementado por 2% de glicose, pH 7, ajustado com 0,165 M tampão MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico), distribuídos em placas de poliestireno com 96 orifícios. O fluconazol foi acrescentado ao meio em concentrações de 0,125 a 64 µg/mL (diluição seriada razão 2) para um volume final de 200 µL em cada orifício. Os seguintes controles foram realizados: a) Meio em ausência de droga com inóculo celular: para avaliar a viabilidade da levedura; b) Meio em presença da droga sem inóculo celular: para avaliar provável crescimento de microrganismos contaminantes; e c) Determinação da CIM dos isolados de referência.

As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Antes de cada leitura, as placas foram gentilmente homogeneizadas e observadas visualmente. A leitura também foi realizada através da densidade ótica em (Universal Microplate Reader modelo ELx 800, Bio-Tek Instruments INC) no comprimento de onda 450 nm.

No teste de sensibilidade por diluição em caldo, a CIM para o fluconazol foi determinada avaliando a menor concentração do antifúngico capaz de inibir o crescimento em 50% (NCCLS, 2005).

3.5 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR

3.5.1 Cultura de Indução

O inóculo para detecção da atividade proteolítica foi inicialmente adaptado para a produção das Saps (indução). Dessa forma, uma colônia de cada isolado, juntamente com a amostra padrão *C. albicans* ATCC 10231, foi inoculada em 3 mL de meio mínimo complementado com caseína de leite, na concentração final de 0,6%. A cultura foi então incubada a 37 °C, sob agitação constante (160 rpm), por 24 horas. Nesta etapa foi utilizado ampicilina a 100 µg/mL, para evitar contaminação por bactérias e possível interferência de proteases produzidas por estas.

3.5.2 Preparo do Inóculo

Após 24 horas de incubação, o número de células foi avaliado através de contagem direta utilizando-se uma câmara hemocitométrica (*Improved Neubauer Chamber*).

O inóculo para determinação da atividade proteolítica em placa foi obtido a partir da cultura de indução. Alíquotas de 10 µL, com concentração celular ajustada a $1,0 \times 10^6$ células, foram transferidas para as placas de Petri contendo ágar meio mínimo pH 4,0 suplementado com caseína de leite 0,6%. O inóculo foi realizado em poços de aproximadamente 3 mm de diâmetro perfurados no ágar (inóculo de “ponto”).

3.5.3 Atividade Proteolítica em Placa

Para a observação do crescimento celular e atividade proteolítica extracelular, as placas foram inoculadas como descrito anteriormente e incubadas a 37°C por 72 horas. As amostras que apresentavam um halo branco ao redor da colônia, após o período incubado, foram consideradas positivas para a produção de proteases. Nenhum método de revelação se fez necessário.

3.5.4 Determinação de Pz

A atividade proteolítica em placa foi classificada de acordo com um índice (Pz) pré-estipulado, após 72 horas de incubação a 37 °C. O diâmetro da colônia (Dc) e o diâmetro do halo de precipitação da proteína (Dh), incluindo o diâmetro da colônia, foram medido em milímetros. Para obtermos o índice Pz, foi calculada a razão entre Dc e a soma entre Dh e Dc, e os valores encontrados foram utilizados para classificar as amostras de *Candida* quanto a sua atividade proteolítica extracelular (PRICE e cols., 1982) (Tabela 4). Os ensaios para detecção da atividade proteolítica foram realizados em triplicata.

Tabela 4: Classificação da atividade proteolítica segundo valores de Pz (PRICE e cols., 1982).

| Valores de Pz | Atividade Proteolítica |
|------------------|------------------------|
| Pz = 1 | Nula |
| Pz ≥ 0,64 | Baixa |
| 0,30 ≤ Pz < 0,64 | Média |
| Pz < 0,30 | Alta |

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PACIENTES

Dos 97 pacientes analisados, 28 (28,9%) estavam colonizados por leveduras em sua cavidade oral. Os pacientes positivos possuíam média de idade de 42,5 anos, sendo que 60,7% eram do sexo masculino. 60,7% adquiriram a infecção após o ano 2000, com tempo médio de diagnóstico de AIDS de 1,8 anos.

Os pacientes não apresentavam lesões características de candidíase no momento da coleta, e possuíam média de CD4⁺ de 386 células/mm³ (8 a 1074 cells/mm³), sendo que 44,4% apresentavam carga viral indetectável, e 14,8% apresentavam carga viral acima de 100.000 cópias.

4.2 MEIO CHROMÁGAR *CANDIDA*

CHROMágar *Candida* é um meio seletivo diferencial utilizado em laboratório de rotina para identificação presuntiva de espécies de leveduras do gênero *Candida*. O crescimento desses microrganismos pode ser visualizado como: colônias de *C. albicans* são lisas e verde-claras; *C. krusei* crescem formando colônias grandes, rugosas e de coloração rosa; colônias azuis apresentando um halo de pigmentação púrpura ao seu redor são características de *C. tropicalis*; *C. glabrata* formam colônias pequenas, lisas e rosas (ODDS & BERNAERTS, 1994; HORVATH e cols., 2003).

Todos os isolados foram cultivados nesse meio e 22 (78,6%) foram identificadas presuntivamente como *C. albicans*, 2 (7,1%) como *C. tropicalis*, 3 (10,7%) como *C. krusei*, e 1 (3,6%) amostra que apresentou coloração branca não pode ser identificada por este método.

4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Para a identificação molecular, foi utilizada a reação de seminested PCR, que é caracterizada pela presença de dois ciclos de amplificação utilizando combinações de oligonucleotídeos iniciadores diferentes em cada ciclo. Nesse trabalho, utilizamos a técnica realizada por Ahmad *et al.*, (2002) que baseia-se na amplificação de uma região localizada entre o final da extremidade 3' do DNA ribossomal (rDNA) 5.8 S e a extremidade 5' inicial do rDNA 28 S e a região espaçadora interna (ITS2). O primeiro ciclo de amplificação, utilizando oligonucleotídeos universais, gera um produto (amplicon) com 350 a 410 pb característico do gênero *Candida* (Figura 9A). A identificação das espécies é realizada com um oligonucleotídeo espécie-específico e o oligonucleotídeo universal reverso. Os amplicons gerados a partir desse segundo ciclo correspondem a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Figura 9B). A realização do *CHS-1*-PCR possibilitou a identificação de amostras de *C. krusei*, que não podem ser identificados através do snPCR (Figura 9C).

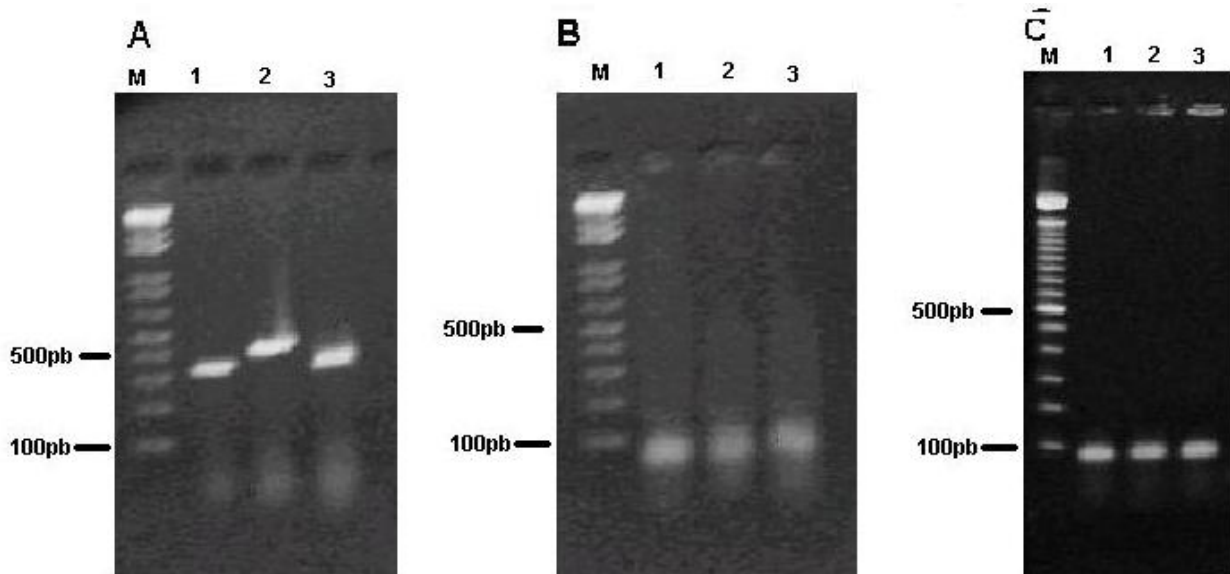


Figura 9: Identificação Molecular dos isolados. **A:** Produtos de amplificação do 1^o seminested PCR, utilizando os oligonucleotídeos CTSF e CTSR. M: 1Kb Ladder; lanes 1: *C. albicans*; 2: *C. glabrata*; 3: *C. tropicalis*. **B:** Produtos da 2^o reação do seminested PCR, utilizando os oligonucleotídeos CTSR e o correspondente espécie-específico: CADET para *C. albicans* (1), CGDET para *C. glabrata* (2) e CTDET para *C. tropicalis* (3); M: 1Kb Ladder. **C:** Produto de amplificação do (*chs 1* – PCR) utilizando os oligonucleotídeos KRUS1 e KRUS 2 (lanes 1,2 e 3); M: 1Kb Ladder. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

A partir dos ensaios de amplificação em cadeia pela polimerase, foi possível analisar as 28 amostras. Através do snPCR, 20 isolados puderam ser identificadas como *C. albicans*, 2 como *C. tropicalis* e 3 não puderam ser identificadas para espécie, sendo que apresentaram amplificação no snPCR para o gênero *Candida*, dessa forma sendo consideradas como *Candida sp.* A realização do *CHS-1-PCR* possibilitou a confirmação da identificação de 3 amostras de *C. krusei*. (Fig 9C).

Duas amostras identificadas como *C. albicans* através da metodologia do CHROMágar, não puderam ser identificadas para gênero através da metodologia do semi-nested PCR. Isto pode ser explicado pelo fato de que algumas espécies, como a *C. dubliniensis*, apresentam semelhança fenotípica com *C. albicans* (SULLIVAN e cols., 1995), dessa forma crescendo em CHROMágar como colônias verdes. Porém, apresentam diferenças genotípicas significantes, a ponto de não serem identificadas pelo método molecular.

Recentes relatos descrevem que o CHROMagar *Candida* pode ser útil na diferenciação de isolados de *C. dubliniensis*, cujas colônias apresentam coloração verde-escura, diferindo de *C. albicans* que são verde-claras (KIRKPATRICK e cols., 1998; JABRA-RIZK e cols., 2001).

Dentre os nossos isolados, nenhum apresentou coloração verde escura, que seria característico de *C. dubliniensis*. Entretanto, outras metodologias para diferenciação dessas amostras devem ser realizadas para confirmar as espécies isoladas, como crescimento em meio hipertônico (ALVES e cols., 2002) e em temperatura de 42 °C (PINJON e cols., 1998). *C. albicans* é capaz de crescer nessas duas condições, enquanto o crescimento de *C. dubliniensis* é inibido.

Koehler e cols. (1999), propõem a utilização de CHROMagar associado a produção de clamidosporos em ágar fubá suplementado com Tween 80 como esquema de identificação de leveduras em laboratórios clínicos. Além de ser simples, de baixo custo permite a identificação de várias espécies, entre elas *C. dubliniensis*.

Outras metodologias têm sido descrita para diagnóstico diferencial entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Dessa forma, Mosca e cols. (2003), descreveram um meio diferencial para distinguir as duas espécies através da produção de clamidosporos. Assim, no meio contendo somente caseína de leite a 5%, *C.*

dublinsiensis produz grande quantidade de clamidosporos, enquanto que a maioria dos isolados de *C. albicans* não são capazes de produzir.

Técnicas baseadas em análises de seqüências nucleotídicas também foram descritas para a diferenciação dessas duas espécies. Kurzai e cols., (1999) propuseram uma PCR para amplificação do gene *PHR1* especificamente de *C. albicans*. Outros autores utilizaram seqüências repetitivas como minisatélites e microsátélites para amplificar DNA genômico de *C. albicans* e *C. dubliniensiensis*. Os amplicons foram diferentes o suficiente para permitir a distinção entre essas duas espécies (MEYER e cols., 2001).

4.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para o fluconazol foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo, segundo normas preconizadas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2005), norma M27-A2. Alguns cuidados foram tomados com o objetivo de minimizar interferência nos resultados. Assim, como o fluconazol é ineficaz em testes *in vitro*, cujo meio de cultura apresente pH ácido, utilizamos RPMI 1640 (meio quimicamente definido) tamponado para evitar a inativação da atividade antifúngica do fluconazol. E além disso, os derivados azólicos complexam-se com peptonas presentes na composição de determinados meios de cultura. A leitura foi realizada visualmente e através de densidade ótica, após agitação branda. E os ensaios foram realizados em duplicata.

A classificação das amostras em relação à atividade do fluconazol foi baseada na definição do NCCLS, ou seja amostras com $CIM \leq 8 \mu\text{g/mL}$ são sensíveis, $8 < CIM < 64 \mu\text{g/mL}$, são sensíveis dose dependente e $CIM \geq 64 \mu\text{g/mL}$ são resistentes. Dessa forma, dos 28 isolados de *Candida* de pacientes portadores de HIV, somente um isolado de *C. krusei* foi considerado resistente ao fluconazol ($CIM \geq 64 \mu\text{g/mL}$). Três isolados (*C. albicans*, *C. krusei* e *Candida* sp.) apresentaram MIC igual a $32 \mu\text{g/mL}$, portanto foram classificados como suscetível dose

dependente. As demais amostras foram consideradas sensíveis ao antifúngico, com MIC variando de 0,25 a 8 µg/mL.

Muitos fatores podem ser responsáveis pela emergência de isolados resistentes de *Candida*, incluindo o aumento no uso dos agentes antifúngicos. Além disso, colonização com isolados resistentes aos derivados azólicos após tratamento com fluconazol tem sido relatado (WINGARD e cols., 1991; JOHNSON e cols., 1995; SOBEL e cols., 2001). Entre nossos pacientes, 3 estiverem em uso de antifúngicos azólicos em um período de até 6 meses antes da coleta. Em dois destes, foi isolado *C. albicans* susceptível ao fluconazol (CIM=0,25 e 0,5 µg/ml). Em outro paciente, foi encontrado um isolado de *C. krusei* considerado susceptível dose dependente (CIM = 32µg/ml). Interessantemente, essa amostra foi isolada de um paciente com histórico de exposição prévia ao cetoconazol, sugerindo a emergência de resistência cruzada entre dois antifúngicos azólicos. Porém, mais investigações são necessárias para demonstrar esse fenômeno.

4.5 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR

As aspartil proteases podem ser encontradas em uma grande variedade de organismos, desde vírus (MILLER e cols, 1989), bactérias (HILL & PHYLIP, 1997), fungos (AGUILAR e cols, 1997), protozoários (COOMBS e cols, 2001), plantas (SIMÕES & FARO, 2004) e animais vertebrados, inclusive o homem (MEIJERINK e cols, 1993).

Em *C. albicans*, as aspartil proteases são as principais enzimas proteolíticas e estão envolvidas em diversos processos fisiológicos. Geralmente, essas enzimas são secretadas no meio ambiente, onde desempenham sua atividade. Um papel bastante relevante dessas enzimas é a participação como fator de virulência em processos infecciosos.

A atividade proteolítica de *C. albicans* têm sido avaliada *in vitro* utilizando diferentes substratos, tais como BSA (DE BERNARDIS e cols, 1999), hemoglobina (DOSTÁL e cols, 2003), gelatina (COSTA e cols, 2003) e mucina (COLINA e cols, 1996). Nesse trabalho foi utilizado a caseína do leite como

substrato para proteases secretadas pelas amostras de *Candida* isoladas de cavidade oral de pacientes portadores de HIV. Dessa forma, as amostras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio mínimo (PONTECORVO e cols, 1953) suplementado com 0,6% de caseína do leite. Após 72 horas de incubação a 37°C, as amostras foram analisadas quanto à formação de halo de precipitação ao redor da colônia (Fig. 10).

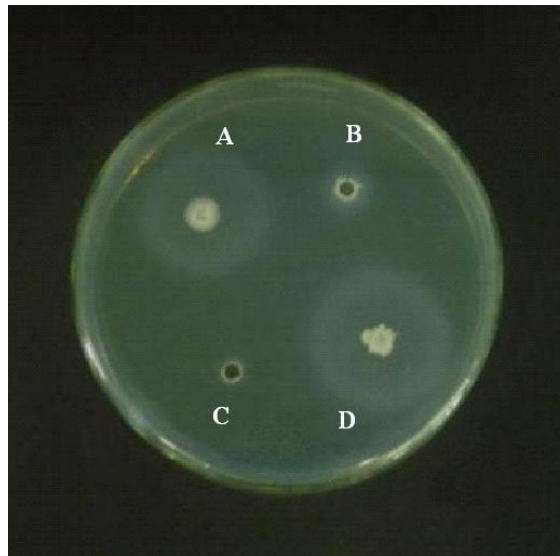


Figura 10: Atividade proteolítica em placa de amostras clínicas de *Candida*. **A** e **D** – altas produtoras, **B** – baixa atividade de proteases, **C** – não produtora.

Nas condições utilizadas nesse trabalho, todos os isolados de *C. albicans* e *C. krusei* apresentaram alta atividade proteolítica extracelular, enquanto o isolado de *C. tropicalis* foi classificado com atividade intermediária. Dos três isolados de *Candida* sp., dois apresentaram alta atividade proteolítica, enquanto um apresentou atividade nula (Figura 11).

Após esta análise preliminar, foi feita uma segunda classificação de acordo com um índice Pz, que determina a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais o halo de hidrólise. Os resultados foram classificados de acordo com Price e cols., (1982) (Tabela 4) que classifica as amostras em não produtoras, baixa, média e alta produtoras de proteases. Os resultados obtidos indicam que nenhuma amostra foi classificada como baixa produtora de proteases ($Pz \geq 0,64$). Dois isolados de *C. tropicalis* foram classificados como médio

produtores de proteases ($0,30 \leq Pz < 0,64$). Alta atividade proteolítica ($Pz < 0,30$) foi detectada nas demais amostras. A amostra de *C. albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle positivo.

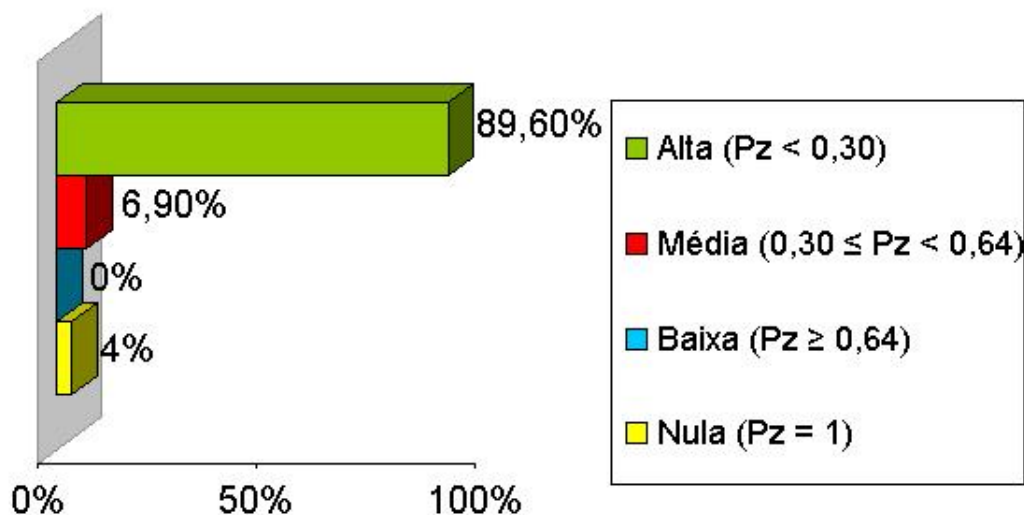


Figura 11: Porcentagem de amostras clínicas de *Candida* isoladas de cavidade oral de pacientes portadores de HIV de acordo com a produção de proteases.

Não foi encontrada correlação entre a alta atividade proteolítica dos isolados e a contagem de linfócitos T CD4⁺. Resultados semelhantes foram encontrados por Ollert e cols., (1995), onde sugerem que o aumento na atividade proteolítica é independente do estado imunológico do paciente.

Não foram observadas diferenças significativas na atividade proteolítica entre os isolados de *Candida* de pacientes em HAART, comparado com o grupo que não se encontrava recebendo este tratamento. O paciente de onde foi isolado a *Candida* sp. que apresentou atividade proteolítica nula estava em HAART, porém não é possível saber sobre a atividade proteolítica desse isolado antes do início do tratamento.

A Tabela 5 mostra a compilação dos resultados obtidos nesse trabalho.

Tabela 5: Dados obtidos através da análise dos isolados de cavidade oral de pacientes portadores de HIV.

| Isolado | Identificação ^a | CD4 ^{+b} | Fluconazol ^c | Antifúngico ^d | Antiretroviral ^e | PZ ^f | Protease ^g |
|---------|----------------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------|
| 2 | <i>C. krusei</i> | 381 | 32 | - | ATC, ATZ | 0,28 | Alta |
| 4 | <i>C. albicans</i> | 420 | 32 | - | D4T, 3TC, EFV | 0,13 | Alta |
| 9 | <i>C. albicans</i> | 1074 | 0,5 | - | AZT, DDI, ATZ | 0,16 | Alta |
| 11 | <i>C. albicans</i> | 8 | 0,5 | - | - | 0,15 | Alta |
| 12 | <i>C. albicans</i> | 451 | 0,25 | - | ATC, NFV | 0,20 | Alta |
| 13 | <i>C. albicans</i> | 964 | 0,25 | Fluconazol | D4T, 3TC, ATZ | 0,14 | Alta |
| 14 | <i>C. tropicalis</i> | 146 | 2 | - | - | 0,30 | Média |
| 15 | <i>C. albicans</i> | 431 | 0,5 | - | D4T, 3TC, IDV | 0,19 | Alta |
| 16 | <i>C. albicans</i> | 54 | 0,5 | Fluconazol | AZT, EFV | 0,15 | Alta |
| 18 | <i>C. albicans</i> | 239 | 2 | - | - | 0,15 | Alta |
| 20 | <i>C. albicans</i> | 26 | 0,25 | - | AZT, EFV | 0,14 | Alta |
| 21 | <i>C. albicans</i> | 480 | 0,5 | - | D4T, DDI, NFV | 0,13 | Alta |
| 32 | <i>C. albicans</i> | 324 | 0,25 | - | ATC, NFV | 0,23 | Alta |
| 34 | <i>C. krusei</i> | 351 | 8 | - | D4T, 3TC, AZT | 0,26 | Alta |
| 36 | <i>C. albicans</i> | 108 | 0,25 | - | D4T, DDI, EFV, ATZ | 0,16 | Alta |
| 38 | <i>C. albicans</i> | 667 | 0,25 | - | ATC, NFV | 0,20 | Alta |
| 42 | <i>Candida sp</i> | 393 | 1 | - | - | 0,18 | Alta |
| 43 | <i>C. albicans</i> | 276 | 0,5 | - | 3TC, DDI, IDV, EFV, LOP | 0,17 | Alta |
| 53 | <i>C. albicans</i> | 125 | 0,25 | - | D4T, 3TC, NVP, LOP | 0,20 | Alta |
| 56 | <i>C. krusei</i> | 544 | 64 | - | D4T, 3TC, EFV | 0,22 | Alta |
| 57 | <i>C. albicans</i> | 333 | 0,5 | - | D4T, 3TC, AZT | 0,18 | Alta |
| 66 | <i>C. albicans</i> | 367 | 0,25 | - | ATC, ATZ | 0,18 | Alta |
| 67 | <i>C. albicans</i> | 520 | 0,5 | - | ATC, EFV | 0,16 | Alta |
| 72 | <i>Candida sp.</i> | 727 | 0,5 | - | AZT, NVP | 0,13 | Alta |
| 87 | <i>C. albicans</i> | 219 | 0,5 | - | Biovir, NVP | 0,13 | Alta |
| 91 | <i>C. albicans</i> | 574 | 0,5 | - | - | 0,16 | Alta |
| 95 | <i>C. tropicalis</i> | 411 | 4 | - | D4T, 3TC | 0,33 | Média |
| 96 | <i>Candida sp.</i> | 496 | 32 | Cetoconazol | ATC, ATZ | 1 | Nula |

^a. Não houve discrepância entre os resultados obtidos pelo crescimento em meio CHROMagar Candida e os testes moleculares. ^b. Contagem de linfócitos T CD4⁺ através de citometria de fluxo. ^c. MIC em µg/mL. ^d Antifúngico utilizado nos últimos 6 meses. ^e ATC: lamivudina mais zidovudina, ATZ: atazanavir, AZT: zidovudina, DDI: didanosina, D4T: estavudina, EFV: efavirenz, IDV: indinavir, LOP: lopinavir, NFV: nelfinavir, NVP: nevirapina, 3TC: lamuvudina. ^f Índice PZ: a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais o halo de hidrólise. ^g Classificação dos isolados quanto a atividade proteolítica segundo Price e cols., (1992)

REFERÊNCIAS

AGUILAR, C.F.; CRONIN, N.B.; BADASSO, M.; DREYER, T.; NEWMAN, M.P.; COOPER, J.B.; HOOVER, D.J.; WOOD, S.P.; JOHNSON, M.S.; BLUNDELL, T.L. (1997). "The three dimensional structure at 2.4 Å resolution of glycosylated proteinase A from the lysosome-like vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*". J. Mol. Biol., 267 (4): 899-915.

AHMAD, S.; KHAN, Z.; MUSTAFA, S.A.; KHAN, U.Z. (2002). "Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection and biochemical methods for species identification". J. Clin. Microbiol., 40: 2483-2489.

ALVES, H. S.; MILAN, E. P.; LAET SANTANA, L.O.O.P.; SANTURIO, J. M.; COLOMBO, L. A. (2002). "Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening". Diag. Microbiol and Infect. Dis. 43: 85–86.

ARANCIA, S.; SANDINI, S.; CASSONE, A.; DE BERNARDIS, F.; LA VALLE, R. (2004). "Construction and use of PCR primers from a 65 kDa mannoprotein gene for identification of *C. albicans*". Mol Cell Probes.: 18(3):171-5.

ARRIBAS, J.R.; HERNANDEZ-ALBUJAR, S.; GONZALEZ-GARCIA, J.J.; PENA, J.M.; GONZALEZ, A.; CANEDO, T.; MADERO, R.; VAZQUEZ, J.J.; POWDERLY, W.G. (2000). "Impact of protease inhibitor therapy on HIV-related oropharyngeal candidiasis". AIDS, 14(8):979-985.

ASCENCIO, M.A., GARDUNO, E., PEREZ-GIRALDO, C., BLANCO, M.T., HURTADO, C., GOMEZ-GARCIA, A.C. (2005). "Exposure to therapeutic concentrations of ritonavir, but not saquinavir, reduces secreted aspartyl proteinase of *Candida parapsilosis*". Chemotherapy, 51(5):252-5.

BARKER, K.S.; CRISP, S.; WIEDERHOLD, N.; LEWIS, R.E.; BAREITHER, B.; ECKSTEIN, J.; BARBUCH, R.; BARD, M.; ROGERS, D. (2004). "Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 54: 376-385.

BAUTISTA-MUÑOZ, C.; BOLDO, M.X.; VILLA-TANACA, L.; HERNANDEZ-RODRÍGUEZ, C. (2003). "Identification of *Candida* spp. by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Direct PCR Methods". J. Clin. Microbiol, 41(1): 1414–420.

BEKTIC, J.; LELL, C.P.; FUCHS, A.; STOIBER, H.; SPETH, C.; LASS-FLORL, C.; BORG-VON-ZEPELIN, M.; DIERICH, M.P.; WURZNER, R. (2001). "HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells *in vitro*". FEMS Immunol. Med. Microbiol., 31(1):65-71.

BORG-VON ZEPELIN, M.; BEGGAH, S.; BOGGIAN, K.; SANGLARD, D. & MONOD, M. (1998). "The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages". Mol. Microbiol., 28(3): 543-554.

BORG-VON ZEPELIN, M.; MEYER, I.; THOMSEN, R.; WÜRZNER, R.; SANGLARD, D.; TELENTI, A. & MONOD, M. (1999). "HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases". J. Invest. Dermatol., 113: 747-751.

BORST, A.; THEELEN, B.; REINDERS, E.; BOEKHOUT, T.; FLUIT, C. A.; SAVELKOUL, M. H. P. (2003). "Use of Amplified Fragment Length Polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., Including *C. dubliniensis*". J. Clin. Microbiol. 41 (4): 1357–1362.

BRINKMAN, E. N.; HAUGLAND, R. A.; WYMER, L.J.; BYAPPANAHALLI, M.; WHITMAN, L. R.; VESPER, J.S. (2003). "Evaluation of a rapid, quantitative Real-Time PCR method for enumeration of pathogenic *Candida* cells in water". Appl Environ Microbiol., 69 93): 1775–1782.

CAMPISI, G.; PIZZO, G.; MILICI, M.E.; MANCUSO, S.; MARGIOTTA, V. (2002). "Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects". Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology, 93(3): 281-286.

CANNON, R.D.; HOLMES, A.R.; MASON, A.B. & MONK, B.C. (1995). "Oral *Candida*: clearance, colonization or candidiasis?" J. Dent. Res., 74(5): 1152-1161.

CASSONE, A.; De BERNARDIS, F.; TOROSANTUCCI, A.; TACCONELLI, A.; TUMBARELLO, M.; CAUDA, R. (1999). "In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors". J. Infect. Dis., 180(2):448-453.

CASSONE, A.; TACCONELLI, E.; De BERNARDIS, F.; TUMBARELLO, M.; TOROSANTUCCI, A.; CHIANI, P.; CAUDA, R. (2002). "Antiretroviral therapy with protease inhibitors has an early, immune reconstitution-independent beneficial effect on *Candida* virulence and oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected subjects". J. Infect. Dis., 185(2):188-195.

CHANG, C. H.; LEAW, N.S.M; HUANG, H. A.; WU, L.T.; CHANG, C. T. (2001). "Rapid Identification of Yeasts in Positive Blood Cultures by a multiplex PCR Method". J. Clin. Microbiol.,39 (10): 3466-3471.

CIRAK, M.Y.; KALKANCI, A.; KUSTIMUR, S. (2003). "Use of Molecular Methods in Identification of *Candida* Species and Evaluation of Fluconazole Resistance." Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 98(8): 1027-1032.

COIGNARD, C.; HURST, F.S.; BENJAMIN, E. L.; BRANDT, E.M.; WARNOCK, W. D.; MORRISON, J. C. (2004). "Resolution of discrepant results for *Candida* species identification by using DNA probes". J. Clin.Microbiol., 42 (2):858-861.

COLINA, A. R.; AUMONT, F.; DESLAURIERS, N.; BELHUMEUR, P.; DE REPENTIGNY, L. (1996). "Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase". Infection and Immunity, 64(11): 4514-4519.

COLOMBO, A.L. & GUIMARÃES, T. (2003). "Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp.". Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 36(5): 599-607.

COOKE M. V., MILES J R. PRICE G R., MIDGLEY G., KHAMRI W., RICHARDSON C A. (2002). "New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp." J. Appl. Microbiol., 68 (7): 3622–3627.

COOMBS, G.H.; GOLDBERG, D.E.; KLEMBA, M.; BERRY, C.; KAY, J.; MOTTRAM, J.C. (2001). "Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets". Trends Parasitology, 17 (11): 532-537.

COSTA, E. M. B.; SANTOS, A. L. S.; CARDOSO, A. S.; PORTELA, M. B.; ABREU, C. M.; ALVIANO, C. S.; HAGLER, A. N.; SOARES, R. M. A. (2003). "Heterogeneity of metallo and serine extracellular proteinases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil". Immunology and Medical Microbiology, 1567: 1-8.

COWEN, L.E.; NANTEL, A.; WHITEWAY, M.S.; THOMAS, D.Y.; TESSIER, D.C.; KOHN, L.M. (2002). "Population genomics of drug resistance in *Candida albicans*." PNAS, 99(14): 9284-9289.

CROWE, S.M., CARLIN, J.B., STEWART, K.I., LUCAS, C.R., HOY, J.F. (1991). "Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons." J. Acquir. Immune.Defic.Syindr., 4(8):770-776.

De BACKER, M.D.; MAGEE, P.T.; PLA, J. (2000). "Recent Developments in Molecular Genetics of *Candida albicans*." Annu. Rev. Microbiol., 54: 463-98.

DE BERNARDIS, F.; CHIARI, P.; CICCOCCHI, M.; PELLEGRINI, G.; CEDDIA, T.; D'OFFIZI, G.; QUINTI, I.; SULLIVAN, P.A.; CASSONE, A. (1996). "Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus". Infect Immun., 64(2):466-471.

DE BERNARDIS, F.; TACCONELLI, E.; MONDELLO, F. CATALDO, A.; ARANCIA, S.; CAUDA, R.; CASSONE, A. (1999). "High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women". J. Clin. Microbiol., 5 (37): 1376-1380.

DE BERNARDIS, F.; TACCONELLI, E.; MONDELLO, F.; CATALDO, A.; ARANCIA, S.; CAUDA, R.; CASSONE, A. (2004). "Anti-retroviral therapy with protease inhibitors decreases virulence enzyme expression in vivo by *Candida albicans* without selection of avirulent fungus strains or decreasing their anti-mycotic susceptibility". FEMS Immunol. Med. Microbiol., 41(1): 27-34.

DEAK, R.; BODAI, L.; AARTS, H.J.; MARAZ, A. (2004). "Development of a novel, simple and rapid molecular identification system for clinical *Candida* species. Med Mycol.: Aug;42(4):311-8.

DERDEYN, C.A. & SILVESTRI, G. (2005). "Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection". Current Opinion in Immunology, 17: 366-373.

DOSTÁL, J.; HAMAL, P.; PAVLICKOVA, L.; SOUCEK, M.; RUMIL, T.; PICHOVA, I.; HRUSKOVA-HEIDINGSFELDOVA, O. (2003). "Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment". J. Clin. Microbiol.; 41(2): 712-716.

DUBOIS, N.; COLINA, A.R.; AUMONT, F.; BELHUMEUR, P. & REPENTIGNY, L. (1998). "Overexpression of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase 2 and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* do not augment virulence in mice". Microbiol., 144: 2299-2310.

- DUNN, B.M. (2002). "Structure and mechanism of the pepsine-like family of aspartic peptidases". Chemical Reviews, 102 (12): 4431-4458.
- ERJAVEC, Z. & VERWEIJ, P.E. (2002). "Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host". Drug Res. Updates, 5: 3-10.
- FALLON, K.; BAUSCH, K.; NOONAN, J.; HUGUENEL, E. & TAMBURINI, P. (1997). "Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice". Infect. Immun., 65(2): 551-556.
- FETTER, A.; PARTISANI, M.; KOENIG, H.; KREMER, M.; LANG, J.M. (1993). "Asymptomatic oral *Candida albicans* carriage in HIV infection: frequency and predisposing factors". J. Oral Pathol. Med., 22:57-59.
- FIDEL Jr, P.L & SOBEL, J.D. (1996). "Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis". Clin. Microbiol. Rev., 9 (3): 335-348.
- GEORGOPAPADAKOU, N.H. (1998). "Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs." Curr. Opin. Microbiol., 1: 547-557.
- GHARIZADEH, B.; NORBERG, E.; LOFFLER, J.; JALAL, S.; TOLLEMAR, J.; EINSELE, H.; KLINGSPOR, L.; NYREN, P. (2004). "Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology". Mycoses, 47:29-33.
- GILFILLAN, G.D.; SULLIVAN, D.J.; HAYNES, K. PARKINSON, T. COLEMAN, D.C.; GOW, N.A. (1998). "*Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors". Microbiology, 144: 829-838.
- GOLDMAN, G.H.; DA SILVA FERREIRA, M.E.; DOS REIS MARQUES, E.; SAVOLDI, M.; PERLIN, D.; PARK, S.; GODOY MARTINEZ, P.C.; GOLDMAN, M.H.; COLOMBO, A.L. (2004). "Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil". Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 50(1):25-32.
- GRAYBILL J.R. (1996). "The future of antifungal therapy". Clin. Infect. Dis. 22 (Suppl. 2):S 166-78.
- HAYNES, K. (2001). "Virulence in *Candida* species". TRENDS in Microbiology, 9 (12): 591-596.

HILL, J. & PHYLIP, L.H. (1997). "Bacterial aspartic proteinases". FEBS, 409: 357-360.

HOMMA, M.; CHIBANA, H. & TANAKA, K. (1993). "Induction of extracellular proteinase in *Candida albicans*". J. Gen. Microbiol., 139: 1187-1193.

HORVATH L. L.; HOSPENTHAL D. R.; MURRAY C. K.; DOOLEY D. P. (2003). "Direct Isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic Medium CHROMagar *Candida*". J. Clin. Microbiol., 41: 2629–2632 .

HOSPENTHAL, D.R.; BECKIUS, M.L.; FLOYD, K.L.; HORVATH, L.L.; MURRAY, C.K. (2006). " Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*". Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob., 3:5-1.

HUBE, B.; NAGLIK, J. (2001). "*Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family". Microbiology, 147: 1997-2005.

HUBE, B.; SANGLARD, D.; ODDS, F.C.; HESS, D.A.; MONOD, M.; SCHAFFER, W.; BROWN, A.J.P. ; GOW, N.A.R. (1997). "Disruption of each of the secreted aspartylproteinase genes *SAP1*, *SAP2* and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence". Infect. Immun., 65(9): 3529-3538.

HUI, M.; IP, M.; CHAN, K.S.P.; LING, C. M.; CHENG, A.F.B. (2000). "Rapid identification of medically important *Candida* to species level by polymerase chain reaction and single-strand conformational polymorphism". Diag. Microbiol. Infec. Dis., 38: 95–99.

HUNG, C.C.; YANG, Y.L.; LAUDERDALE, T.L.; McDONALD, L.C.; HSIAO, C.F.; CHENG, H.H.; HO, Y.A.; LO, H.J. (2005) "Colonization of Human Immunodeficiency Virus-Infected Outpatients in Taiwan with *Candida* Species". Journal of Clinical Microbiology, 43(4): 1600-1603.

JABRA-RIZK, A.M.; BRENNER, M.T.; ROMAGNOLI, M.; BAQUI, A.A.M.A.; MERZ, G.W.; FALKLER JR, A.W.; MEILLER, F.T. (2001). "Evaluation of a Reformulated CHROMagar *Candida*". J. Clin. Microbiol., 39(5): 2015-2016.

JAIN, P.; KHAN, Z. K.; BHATTACHARYA, E.; RANADE S. A. (2001). "Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and -sensitive strains of *Candida albicans*". Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 41: 113–119

JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W.; LUKER, J.; PORTER, S.R.; SCULLY, C. (1995). "Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis". J Antimicrob Chemother., 35(1):103-14.

KAMINISHI, H. MIYAGUCHI, H.; TAMAKI, T.; SUENAGA, N.; HISAMATSU, M.; MIHASHI, I.; MATSUMOTO, H.; MAEDA, H.; HAGIHARA, Y. (1995). "Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase". Infection and Immunity, 63(3): 984-988.

KANBE, T.; KURIMOTO, K.; HATTORI, H.; IWATA, T.; KIKUCHI, A. (2005). "Rapid identification of *Candida albicans* and its related species *Candida stellatoidea* and *Candida dubliniensis* by a single PCR amplification using primers specific for the repetitive sequence (RPS) of *Candida albicans*". J Dermatol Sci.: 40(1):43-50.

KAPLAN, J.E.; HANSON, D.; DWORKIN, M.S.; FREDERICK, T.; BERTOLLI, J.; LINDEGREN, M.L.; HOLMBERG, S., JONES, J.L. (2000). "Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy". Clin. Infect. Dis., 30(1):S5-14.

KIRKPATRICK, R.W.; REVANKAR, G.S.; McATEE, K.R.; LOPEZ-RIBOT, L. J.; FOTHERGILL, W.A.; McCARTHY, I.D.; SANCHE, E.S.; CANTU, A.R.; RINALDI, G.M.; PATHERSON F.T. (1998). "Detection of *Candida dubliniensis* in Oropharyngeal Samples from Human Immunodeficiency Virus-infected Patients in North America by Primary CHROMagar *Candida* Screening and Susceptibility testing of Isolates". J. Clin. Microbiol., 36 (10): 3007-3012.

KOEHLER, A. P.; CHU, K.; HOUANG, E. T. S.; CHENG, A. F. B. (1999). "Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory". J. Clin. Microbiol., 37: 422-426.

KONTOYIANNIS, D.P.& LEWIS, R.E. (2002). "Antifungal drug resistance of pathogenic fungi." The Lancet, 359:1135-44.

KORTING, H.C.; SCHALLER, M.; EDER, G.; HAMM, G.; BOHMER, U.; HUBE, B. (1999). "Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients". Antimicrob. Agents Chemother., 43(8):2038-2042.

- KUMAR, M.; MISHRA, N.K.; SHUKLA, P.K. (2005). "Sensitive and rapid polymerase chain reaction based diagnosis of mycotic keratitis through single stranded conformation polymorphism". Am J Ophthalmol.: 140(5): 851-857.
- KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D.W. & LEWIS, M.A.O. (2003). "*In vitro* secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities". Oral Microbiol. Immun., 18: 405-407.
- KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W. ed. (1998). In: The yeasts, a taxonomic study. 4th ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- KURZAI, O.; HEINZ, J.W.; SULLIVAN, J.D.; COLEMAN, C.D.; FROSCHE, M.; MUHLSCHLEGEL, A.F. (1999). : Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH-regulated *PHR1* and *PHR2* genes of *C. albicans*". J. Clin. Microbiol., 37 (5): 1587-1590.
- LEINBERGER, D.M.; SCHUMACHER, U.; AUTENRIETH, I.B.; BACHMANN, T.T. (2005). "Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses". J Clin Microbiol.: 43(10):4943-53.
- LERNER, C.G. & GOLDMAN, R.C. (1993). "Stimuli that induce production of *Candida albicans* extracellular aspartyl proteinase". J. Gen. Microbiol., 139: 1643-1651.
- LOEFFLER, J.; DORN, C.; HEBART, H.; COX, P.; MAGGA, S. (2003). "Development and evaluation of the Nuclisens Basic Kit NASBA for the detection of RNA from *Candida* species frequently resistant to antifungal drugs". Diag. Microbiol. Infect. Dis., 45: 217-220.
- LOEFFLER, J.; HEBART, H.; MAGGA, S.; SCHMIDT, D.; KLINGSPORB, L. (2000). "Identification of rare *Candida* species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization." Diag. Microbiol Infect. Dis., 38: 207-212.
- MAAROUI, Y.; HEYMANS, C.; DE BRUYNE, J.M.; DUCHATEAU, V.; RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H.; AOUN, M.; CROKAERT, F. (2003). "Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay". J. Clin. Microbiol., 41(7): 3293-3298.
- MACDONALD, F. (1984). "Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species". Sabouraudia, 22 (1): 79-82.

- McCARTHY, G.M. (1992). "Host factors associated with HIV-related oral candidiasis. A review". Oral Surg. Oral Med. Oral. Pathol., 73(2): 181-186.
- MEIJERINK, P.H.; BEBELMAN, J.P.; OLDENBURG, A.M.; DEFIZE, J.; PLANTA, R.P.; ER, A.W.; PALS, G.; MAGER, W.H. (1993). "Gastric chief cell-specific transcription of the pepsinogen A gene". Eur. J. Biochem., 213 (3): 1283-1296.
- MELO, N.R.; TAGUCHI, H.; JORGE, J.; PEDRO, R.J.; ALMEIDA, O.P.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. (2004). "Oral *Candida* flora from Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era". Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 99(4):425-431.
- MEYER, W.; MASZEWSKA, K.; SORRELL, T.C. (2001). "PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*". Med. Mycol., 39: 185-193.
- MIGLIORATI, C.A.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E. (2004). "Oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients under treatment with protease inhibitors". Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology.
- MILDE K.; KOSTKAA V.; KALETAA E.F.; WILLEMS H.; C. JAGER C. (2000). "Multiplex-PCR-based differentiation and characterization of *Candida*-isolates derived from tortoises (Testudinidae)". Vet. Microbiol., 76: 395-402.
- MILLER, M.; JASKOLSKI, M.; RAO, J.K.; LEIS, J.; WLODAWER, A. (1989). "Crystal structure of retroviral protease proves relationship aspartic protease family". Nature, 337(6207): 576-579.
- MITCHELL, T.G. (1998). Medical mycology. In: Jawetz, Melnick E Adelberg's Medical Microbiology. Brooks, G.F.; Butel, J.S. & Morse, S.A. ed., 21st ed. Appleton & Lange, Connecticut, USA.
- MOLERO, G.; DÍEZ-OREJAS, R.; NAVARRO-GARCÍA, F.; MONTEOLIVA, L.; PLA, J.; GIL, C.; SÁNCHEZ-PÉREZ, M.; NOMBELA, C. (1998). "*Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity". Int. Microbiol., 1: 95–106.
- MONOD, M.; TOGNI, G.; HUBE, B.; SANGLERD, D. (1994). "Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species". Molecular Microbiology, 13 (2): 357-368.

MORACE, G.; SANGUINETTI, M.; POSTERAPO, B.; LO CASCIO, G.; FADDA, G. (1997). "Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-Restriction Enzyme Analysis". J. Clin. Microbiol. 35: 667–672

MORSCHHÄUSER, J. (2002). "The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*". Biochim. Biophys. Acta, 1587: 240-248.

MORSCHHÄUSER, J.; VIRKOLA, R.; KORHONEN, T.K.; HACKER, J. (1997). "Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*". FEMS Microbiology Letters, 153 (2): 349-355.

MOSCA, C O.; MORAGUES, D.M.; LLOVO, J.; AL MOSAID, A.; COLEMAN, C.D.; JOSE, P. (2003). "Casein Agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*". J. Clin. Microbiol., 41 (3): 1259–1262.

NCCLS - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras. Norma Aprovada - Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2005.

NEWPORT, G. & AGABIAN, N. (1997). "*KEX2* influences *Candida albicans* proteinase secretion and hyphal formation". J. Biol. Chem., 272(46): 28954-28961.

ODDS, F. C.; R. BERNAERTS. (1994). "CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species". J. Clin. Microbiol., 32: 1923–1929.

OLLERT, M.W.; WENDE, C.; GORLICH, M.; MCMULLAN-VOGEL, C.G.; BORG-VON ZEPELIN, M.; VOGEL, C.W.; KORTING, H.C. (1995). "Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. J. Clin. Microbiol., 33(10):2543-2549.

PAPPALARDO, M.C.; MELHEM, M.S. (2003). "Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease". Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 45(6):299-305.

PARK, S.; WOMG, M.; MARRAS, A.E.S.; CROSS, W.E.; KIEHN, E.T.; CHATURVEDI, V.; TYAGI, S.; PERLIN, S.D. (2000). "Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon". J. Clin. Microbiol., 38(8): 2829-2836.

PATTANAPANYASAT, K. & THAKAR, M.R. (2005). "CD4+ T cell count as a tool to monitor HIV progression & anti-retroviral therapy". Indian Journal of Medical Research, 121: 539-549.

PATTON, L.L. (2000). "Sensitivity, specificity, and positive predictive value of oral opportunistic infections in adults with HIV/AIDS as markers of immune suppression and viral burden." Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod., 90(2): 183-188.

PEREA, S.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; KIRKPATRICK, W.R.; MCATEE, R.K.; SANTILLAN, R.A.; MARTÍNEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; PATTERSON, T.F. (2001). "Prevalence of Molecular Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Strains Displaying High-Level Fluconazole Resistance Isolated from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients". Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(10): 2676-2684.

PINJON, E.; SULLIVAN, D.; SALKIN, I.; SHANLEY, D.; COLEMAN, D. (1998). "Simple, Inexpensive, Reliable Method for Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*". J. Clin. Microbiol. 36: 2093–2095.

PONTECORVO G., ROPER J.A., HEMMONS L.M., McDONALD K.D., BUFTON, W.F.C. (1953). "The genetics of *Aspergillus nidulans*". Adv. Genet., 5: 141-238.

PORTELA, M.B.; SOUZA, I.P.; COSTA, E.M.; HAGLER, A.N.; SOARES, R.M.; SANTOS, A.L. (2004). "Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in human immunodeficiency virus-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil". J. Clin. Microbiol., 42(12):5925-5927.

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.A.; GENTRY, L.O. (1982). "Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*". Saundersia, 20: 7-14.

REPENTIGNY, L.; LEWANDOWSKI, D.; JOLICOUER, P. (2004). "Immunopathogenesis of Oropharyngeal Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus Infection". Clinical Microbiology Reviews, 17 (4): 729-759.

RIBEIRO, M.A.; MIRANDA, A.E.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. (2004). "Prevalence and exoenzyme secretion by *Candida albicans* isolates from oral and vaginal mucosae of HIV-infected women". Mycopathologia, 157(3):255-61.

RICHARDSON, M.D. (2005). "Changing patterns and trends in systemic fungal infections". J. Antimicrob. Chemother., 56 (1):i5-i11.

ROBINSON, P.G.; CHALLACOMBE, S.J.; SHEIHAM, A.; ZAKRZEWSKA, J.M. (1997). "Is erythematous candidiasis associated with advanced HIV disease?". Oral Dis., 3(1): S116-118.

ROGERS, P.D. & BARKER, K.S. (2002). "Evaluation of Differential Gene Expression in Fluconazole-Susceptible and -Resistant Isolates of *Candida albicans* by cDNA Microarray Analysis." Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46 (11): 3412-3417.

RÜCHEL, R. (1986). "Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*". Microbiology Science, 3: 316-319.

SAMARANAYAKE, L.P., (1992). "Oral mycoses in HIV infection". Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 73(2):171-180.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W., (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 3rd ed.

SANCHEZ-VARGAS, L.O.; ORTIZ-LOPEZ, N.G.; VILLAR, M.; MORAGUES, M.D.; AGUIRRE, J.M.; CASHAT-CRUZ, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; GAITAN-CEPEDA, L.A.; QUINDOS, G. (2005). "Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico". J. Clin. Microbiol., 43(8):4159-4162.

SANGLARD, D.; HUBE, B.; MONOD, M.; ODDS, F.C. & GOW, N.A.R. (1997). "A triple deletion of the secreted aspartyl proteinases genes *SAP4*, *SAP5* and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence". Infect. Immun., 65(9): 3539-3546.

SANT'ANA, P.L.; MILAN, E.P.; MARTINEZ, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; FERREIRA, M.S.; ALCÂNTARA, A.P.; CARVALHO, M.T. COLOMBO, A.L. (2002). "Multicenter Brazilian Study of Oral *Candida* Species Isolated from Aids Patients". Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 97(2):253-257.

SCHALLER, M.; BEIN, M.; KORTING, H.C.; BAUR, S.; HAMM, G.; MONOD, M.; BEINHAEUER, S. & HUBE, B. (2003). "The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium". Infect. Immun., 71(6): 3227-3234.

SCHALLER, M.; HUBE, B.; OLLERT M.W.; SCHÄFER, W.; BORG-VON ZEPELIN, M.; THOMA-GREBER, E. & KORTING, H.C. (1999b). "*In vivo* expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients". J. Invest. Dermatol., 112: 383-386.

SCHALLER, M.; KORTING, H.C.; SCHÄFER, W.; BASTERT, J.; CHEN, W.C. & HUBE, B. (1999a). "Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis". Mol. Microbiol., 34(1): 169-180.

SCHALLER, M.; SCHACKERT, C.; KORTING, H.C.; JANUSCHKE, E. & HUBE, B. (2000). "Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis". J. Invest. Dermatol., 114: 712-717.

SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.M.; BENDICK, C.; REICHART, P.A.; SAMARANAYAKE, L.P. (2004). "Oral candidosis and associated *Candida* species in HIV-infected Cambodians exposed to antimycotics". Mycoses, 47(9-10):435-41.

SIMÕES, I.; FARO, C. (2004). "Structure and function of plant aspartic proteinases". Eur. J. Biochem., 271: 2067-2075.

SOBEL, J.D.; OHMIT, S.E.; SCHUMAN, P.; KLEIN, R.S.; MAYER, K.; DUERR, A.; VAZQUEZ, J.A.; RAMPALO, A. (2001). HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group. "The evolution of *Candida* species and fluconazole susceptibility among oral and vaginal isolates recovered from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women". J Infect Dis., 15;183(2):286-93.

SOLL, D.R. (2002). "*Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity." Acta Tropica, 81:101-110.

STAIB, P.; KRETSCHMAR, M.; NICHTERLEIN, T.; HOF, H. & MORSCHHÄUSER, J. (2000). "Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(11): 6102-6107.

STEHR, F.; FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; SCHALLER, M.; SCHAFER, W.; HUBE, B. (2000) "Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections". Mycoses, 43(2):17-21.

STRINGARO, A.; CRATERI, P.; PELLEGRINI, G.; ARANCIA, G.; CASSONE, A.; DE BERNARDIS, F. (1997). "Ultrastructural localization of the secretory aspartyl proteinase in *Candida albicans* cell wall *in vitro* and in experimentally infected rat vagina". Mycopathologia, 137(2): 95-105.

- SUEZAWA, Y.; KIMURA, I.; INOUE, M.; GOHDA, N.; SUZUKI, M. (2006). "Identification and Typing of Miso and Soy Sauce Fermentation Yeasts, *Candida etchellsii* and *C. versatilis*, Based on Sequence Analyses of the D1D2 Domain of the 26S Ribosomal RNA Gene, and the Region of Internal Transcribed Spacer 1, 5.8S Ribosomal RNA Gene and Internal Transcribed Spacer 2. Biosci Biotechnol Biochem.:70(2):348-54.
- SULLIVAN, D. J.; MORAN, G.; PINJON, E.; AL-MOSAID, A.; STOKES, C.; VAUGHAN, C.; COLEMAN, D. C. (2004). "Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*". FEMS Yeast Research, 4: 369-376.
- SULLIVAN, D. J.; WESTERNENG, T. J.; HAYNES, K. A.; BENNETT, D. E.; COLEMAN, D.C. (1995). "*Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals". Microbiol., 141, 1507-1521.
- TOGNI, G.; SANGLARD, D.; FALCHETTO, R. MONOD. M. (1991). "Isolation and nucleotide sequence of the extracellular acid protease gene (ACP) from the yeast *Candida tropicalis*". FEBS, 286 (1-2): 181-185.
- TRAMA, J.P.; MORDECHAI, E.; ADELSON, M.E. (2005). "Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing. Mol Cell Probes.: 19(2):145-52.
- VAN BURIK, J-A. H. & MAGEE, P.T. (2001). "Aspects of fungal pathogenesis in humans". Ann. Rev. Microbiol., 55: 743-772.
- VARGAS, K.G. & JOLY, S. (2002). "Carriage frequency, intensity of carriage and strains of oral yeast species vary in the progression of oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals". J. Clin. Microbiol., 44: 341-350.
- WALSH, T.J. & GROLL, A.H. (1999). "Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century" Transplant Infect. Dis., 1: 247-261.
- WATTS, H.J.; CHEAH, F.S.; HUBE, B. SANGLARD, D. GOW, N.A.R. (1998) "Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes". FEMS Microbiol. Letters, 159: 129-135.

WHITE, L.P.; SHETTY, A.; BARNES, A.R. (2003). "Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system". J. Med. Microbiol., 52: 229-238.

WHITE, T.C.; MIYASAKI, S.H.; AGABIAN, N. (1993). "Three distinct aspartyl proteinases in *Candida albicans*". J. Bacteriol., v. 175, n. 19, p. 6126-6133.

WIDJOJOATMODJO, M.N.; BORST, A.; SCHUKKINK, R.A.; BOX, A.T.; TACKEN, N.M.; GEMEN, B.; VERHOEF, J.; TOP, B.; FLUIT, A.C. (1999). "Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) detection medically important *Candida* species". J. Microbiol. Meth., 3 (1-2): 81-90.

WILLIAMS, W.D.; WILSON, J.M.; LEWIS, A. O. M.; POTIS C.A.J. (1995). "Identification of *Candida* Species by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of Intergenic Spacer regions of Ribosomal DNA". J. Clin. Microbiol., 33 (9): 2476-2479.

WINGARD, J.R.; MERZ, W.G.; RINALDI, M.G.; JOHNSON, T.R.; KARP, J.E.; SARAL, R. (1991). "Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole". N Engl J Med., 325(18):1274-7.

World Health Organization: AIDS Epidemic Update (2003).
http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/epiupdate2003_I_en.pdf

YANG, Y.L.; LO, H.J.; HUNG, C.C.; LI, Y. (2006). "Effect of prolonged HAART on oral colonization with *Candida* and candidiasis". BMC Intec. Dis., 6(8): 1-4

ZAUGG, C.; BORG-VON ZEPELIN, M.; REICHARD, U.; SANGLARD, D.; MONOD, M. (2001). "Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*". Infection and Immunity., v. 69, n. 1, p. 405-412.

ANEXOS

Candida* sp: identificação através de meio cromogênico e técnica de semi-nested PCR**Candida* sp: identification by chromogenic médium and semi-nested PCR-based assay**

Narjara do Carmo Oliveira¹; Rita de Cássia Pontello Rampazzo¹; Mariana Caldas Minari¹; Paulo Roberto Ceridório Corrêa¹; Fernando César Bizerra¹; Marcelo Carneiro^{1,2}; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski³; Luciana Furlaneto Maia⁴; Sueli Fumie Yamada-Ogatta⁴.

Resumo

Nesse trabalho duas metodologias foram utilizadas para identificar 52 isolados clínicos de *Candida* sp. CHROMagar *Candida* é um meio cromogênico seletivo que permite a diferenciação através da morfologia e coloração das colônias de leveduras. Através desse meio 39 (75%) amostras de leveduras foram identificadas presuntivamente como *C. albicans* (n = 22), *C. glabrata* (n = 9), *C. tropicalis* (n = 5) e *C. krusei* (n = 3). Treze isolados produziram colônias brancas nesse meio, portanto não puderam ser identificados. A identificação molecular foi realizada através da técnica do sn-PCR que baseia na amplificação de uma região do cluster gênico do RNA ribossomal (5.8S – 28S). Quarenta e três (83%) amostras foram identificadas como *C. albicans* (n = 24), *C. glabrata* (n = 11), *C. tropicalis* (n = 5), *C. parapsilosis* (n = 3) e nove isolados não foram identificados em nível de espécie. Os resultados positivos do sn-PCR foram concordantes com aqueles obtidos no meio cromogênico para 34 das 52 amostras (65,4%). Seis amostras (11,5%) não puderam ser identificadas por nenhuma das metodologias empregadas e 12 amostras (23,1%) apresentaram resultados discrepantes. Embora apresentem limitações, as duas metodologias podem ser empregadas para identificação de algumas espécies de *Candida*.

Palavras-chave: *Candida* sp; identificação; meio CHROMagar; semi-nested-PCR.

Abstract

In this study, two methods were used in order to identify 52 clinical isolates of *Candida* sp. CHROMagar Candida is a selective chromogenic medium that has been shown to allow differentiation of the yeasts by colony morphology and color. By using this medium, 39 (75%) yeasts samples were presumptively identified as *C. albicans* (n = 22), *C. glabrata* (n = 9), *C. tropicalis* (n = 5) and *C. krusei* (n = 3). Thirteen isolates produced white colony on this medium, so they were not distinguishable to the species level. The molecular identification was performed through seminested-PCR assay (sn-PCR), that is based on the ribosomal RNA genes (5.8S - 28S) cluster amplification. Forty three (83%) samples were identified as *C. albicans* (n = 24), *C. glabrata* (n = 11), *C. tropicalis* (n = 5), *C. parapsilosis* (n = 3) and nine isolates could not be identified to the species level. The positive results of sn-PCR were concordant with those of the chromogenic medium for 34 of 52 samples (65.4%). Six samples (11.5%) could not be identified to the species levels by both methods and 12 samples (23.1%) showed discrepancy results. Although the methods are limited, both can be used for identification of some *Candida* species.

Key words: *Candida* sp; identification; CHROMagar medium; seminested-PCR.

¹Alunos do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia (Nível: Mestrado). Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina – Paraná.

²Serviço de Infectologia do Hospital Santa Cruz, Santa Cruz do Sul – Rio Grande do Sul.

³Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná.

⁴Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina – Paraná.

Introdução

Espécies do gênero *Candida* fazem parte da microbiota normal de superfícies mucosas do trato gastrointestinal e genital de animais, inclusive o homem. Entretanto, podem ser responsáveis por uma variedade de quadros clínicos, desde infecções superficiais de mucosa, como candidíase vulvovaginal e orofaríngea, até infecções sistêmicas principalmente quando fatores de risco estão presentes nos hospedeiros humanos. Esses fatores geralmente incluem: uso prolongado e indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro, uso de esteróides ou outras substâncias imunossupressoras, *diabetes mellitus*, AIDS e funções fagocitárias alteradas (WEIG; GROB; MUHLSCHLEGEL, 1998).

Como microrganismo oportunista, essas leveduras podem expressar vários fatores de virulência que contribuem para a patogênese da infecção. Entre esses fatores encontram-se adesão às células e tecidos dos hospedeiros, secreção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e lipases), alteração fenotípica da morfologia celular e da colônia (*switching* fenotípico) e dimorfismo (CALDERONE; FONZI, 2001). Diferenças na expressão desses fatores têm sido descritas durante infecções em sítios anatômicos distintos (HUBE, 2004), bem como entre espécies diferentes (HAYNES, 2001).

As candidíases são usualmente tratadas com derivados poliênicos (anfotericina B) e imidazólicos (fluconazol, cetoconazol, itraconazol). Entretanto, relatos de isolados resistentes a essas substâncias surgiram rapidamente na literatura (PRICE; LaROCCO; GENTRY., 1994; MATHEMA *et al.*, 2001; SANT'ANA *et al.*, 2002; CANTÓN *et al.*, 2003; SANCHEZ-VARGAS *et al.*, 2005). Além disso, as espécies de *Candida* apresentam sensibilidade variada aos novos antifúngicos em desenvolvimento (PFALLER *et al.*, 1999).

A incidência de infecções causadas por *Candida* sp tem aumentado nas últimas décadas, particularmente entre pacientes hospitalizados e imunocomprometidos. Embora *C. albicans* seja a mais frequentemente isolada de amostras clínicas, as espécies não-*albicans* estão significativamente emergindo, entre elas *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (HAZEN, 1995; HAYNES, 2001). A razão para o aumento de casos de candidíase causada por espécies não-*albicans* ainda é obscura. Contudo, a menor sensibilidade dessas espécies aos agentes antifúngicos de uso clínico (COLLIN; CLANCY; NGUYEN, 1999) parece ser parcialmente responsável por esse quadro. Devido a esse fato, a identificação do agente é importante para o planejamento terapêutico e estudos epidemiológicos.

A identificação por métodos convencionais é trabalhosa e requer longo período de tempo. Esses métodos são baseados na micromorfologia das colônias, assimilação de açúcares e testes de fermentação (KURTZMAN; FELL, 1998). Para minimizar o tempo desses procedimentos, vários sistemas comerciais baseados em testes bioquímicos estão disponíveis para identificação presuntiva das diferentes espécies de *Candida*. Esses métodos evidenciam características fenotípicas, e estas podem sofrer variação entre amostras da mesma espécie.

Vários meios seletivos diferenciais cromogênicos para identificação presuntiva das amostras de *Candida* foram desenvolvidos (ODDS; BERNAERTS, 1994; COOKE *et al.*, 2002; HORVATH *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2004). Esses meios contêm substratos que reagem com enzimas secretadas pelos fungos produzindo colônias com várias pigmentações. Essas enzimas são espécies-específicas, permitindo identificar os microrganismos através da cor e características da colônia.

Com os avanços da biologia molecular, vários métodos moleculares têm sido empregados como ferramenta importante na identificação de *Candida* sp. Frequentemente esses métodos baseiam-se na técnica de amplificação em cadeia pela polimerase, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos ou randômicos (ERJAVEC; VERWEIJ, 2002).

O objetivo desse estudo foi comparar a utilização do meio cromogênico CHROMagar *Candida*TM e a reação de semi-nested PCR (AHMAD *et al.*, 2002) para identificação das espécies de *Candida*.

Material e métodos

Isolados de *Candida* sp

Trinta e dois isolados vaginais e vinte isolados de cavidade oral foram utilizados nesse estudo. As amostras vaginais foram isoladas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá em 2003. Os isolados de cavidade oral foram isolados no Centro Integrado de Doenças Infecciosas de Londrina, em 2005. As amostras estavam armazenadas em água destilada a -20 °C (MCGINNIS; PADHYE; AJELLO, 1974).

As amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud (HIMEDIA, Índia) a 37 °C durante 24 - 48 horas para análises posteriores. Uma colônia de cada isolado foi inoculada simultaneamente em meio CHROMagar *Candida*TM (Probac, Brasil) e caldo Sabouraud e as culturas foram incubadas nas mesmas condições anteriores. As células em meio líquido foram utilizadas para extração de DNA.

As amostras de referência incluídas nesse estudo foram fornecidas pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ): *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, e *C. tropicalis* ATCC 28707.

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído pelo método descrito em Ausubel *et al.*, (1999) com algumas modificações. Resumidamente, os isolados clínicos foram cultivados em 3 mL de meio Sabouraud líquido a 37 °C sob agitação durante 24 horas. As células foram centrifugadas a 13.000 rpm e lavadas com água destilada esterilizada. O sedimento foi ressuspensão em tampão de lise TENTS (10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl; 2% Triton X-100, 1% SDS), 2 pérolas de vidro (2 mm) e fenol saturado. A suspensão foi homogeneizada em vórtex três vezes durante 1 minuto cada. O lisado foi desproteínizado com uma mistura contendo fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1,v/v). O DNA presente na fase aquosa foi precipitado com etanol absoluto por 2 horas, lavado com etanol 70% (v/v), seco e ressuspensão com 50 µL de água deionizada estéril. O DNA foi tratado com 1 µL RNase A (1 mg/mL) a 37 °C por 1 hora e as concentrações foram estimadas por eletroforese em gel de agarose como descrito em Sambrook; Russel (2001).

Reação de amplificação

A identificação molecular das amostras foi realizada através da técnica de semi-nested PCR (sn-PCR) descrita por Ahmad *et al.*, (2002). Assim, as reações de amplificação de DNA foram realizadas no termociclador Primus 96 Plus (MWGAG Biotech) em volume final de 20 µL. Para o primeiro ciclo de amplificação foram utilizados 20 mM Tris HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 U *Taq* DNA polimerase, 10 pmoles dos iniciadores universais CTSF e CTSR, 1 µL do DNA extraído da cultura (cerca de 20 ng), 0,1 mM dNTPs. Posteriormente, o produto dessa reação (cerca de 20 ng) foi submetido a um segundo ciclo de amplificação, nas mesmas condições exceto o iniciador CTSF que foi substituído por iniciadores espécies-específicos (CADET, CPDET, CGDET, CTDET). As condições de amplificação consistiram de 1 ciclo de desnaturação a 94 °C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e finalmente um ciclo a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% como descrito em Sambrook; Russel, (2001). Os reagentes utilizados nessa reação foram adquiridos junto a Invitrogen-Gibco (Grand Island, N.Y, USA).

Resultados

Nesse trabalho, a utilização do meio cromogênico permitiu a identificação presuntiva de 39 amostras de leveduras (75%), enquanto a técnica molecular identificou 43 amostras (83%), em nível de espécie.

As amostras clínicas semeadas no meio cromogênico foram identificadas presuntivamente como *C. albicans* (n = 22), *C. glabrata* (n = 9), *C. tropicalis* (n = 5) e *C. krusei* (n = 3). Treze isolados produziram colônias brancas nesse meio, portanto não puderam ser identificados. E através do sn-PCR as amostras foram identificadas como *C. albicans* (n = 24), *C. glabrata* (n = 11), *C. tropicalis* (n = 5), *C. parapsilosis* (n = 3) e nove amostras não puderam ser identificadas. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos através das duas metodologias.

Os resultados positivos do sn-PCR foram concordantes com aqueles obtidos no meio cromogênico para 34 das 52 amostras (65,4%). Seis amostras (11,5%) não puderam ser identificadas por nenhuma das metodologias empregadas e 12 amostras (23,1%) apresentaram resultados discrepantes (Tabela 2). A identificação das amostras de referência foi confirmada pelas duas metodologias.

Discussão

O meio CHROMagar Candida tem sido utilizado para diferenciar, de forma rápida, algumas espécies de *Candida* a partir de amostras clínicas (ODDS; BERNAERTS, 1994; PFALLER; HOUSTON; COFFMANN, 1996; HORVATH *et al.*, 2003). O crescimento de amostras de *C. albicans* é caracterizado por colônias lisas e esverdeadas, enquanto *C. tropicalis* apresenta coloração azul e um pigmento púrpura ao redor da colônia. A coloração rosa pode indicar a presença de *C. krusei*, cujas colônias são grandes e apresentam aspecto rugoso. *C. glabrata* também produz colônias rosas, entretanto são pequenas e lisas. Outras espécies crescem como colônias brancas, não permitindo a sua identificação. Além disso uma variação das tonalidades das cores também pode conduzir a uma identificação errônea.

Cardenes *et al.*, (2004) avaliaram quatro meios cromogênicos comerciais utilizados para identificação de espécies do gênero *Candida*, entre eles o CHROMagar Candida. Seus resultados mostraram especificidade e sensibilidade maior que 92% para identificação de *C. albicans*. Entretanto, esses autores conseguiram identificar apenas 6 dos 108 isolados de *C. não-albicans* (5,6%) nesse meio de cultura, diferindo dos nossos resultados onde dezessete amostras (32,7%) foram identificadas como espécies *C. não-albicans*.

Dois isolados vaginais foram classificados como espécies diferentes nas duas metodologias. As amostras 98V e 103V foram identificadas como *C. albicans* e *C. glabrata* pelo meio cromogênico e através do sn-PCR como *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, respectivamente. Além disso, três isolados de *C. albicans* e dois de *C. glabrata* não apresentaram perfil característico dessas espécies no meio CHROMagar Candida.

Cooke *et al.*, (2002) compararam vários meios cromogênicos, inclusive o CHROMagar Candida e obtiveram variações nas colorações das colônias entre isolados da mesma espécie. Outros resultados discrepantes entre sistemas comerciais que evidenciam características fenotípicas têm sido descritos na literatura (KOEHLER *et al.*, 1999; MICHEL-NGUYEN *et al.*, 2000; AHMAD *et al.*, 2002). Embora variação fenotípica intraespécies possam ocorrer, a razão exata para esses resultados ainda é obscura. A identificação presuntiva de *C. glabrata* nesse meio permanece controversa. Alguns autores consideram o uso de CHROMagar apropriado para sua detecção (PFALLER; HOUSTON; COFFMANN, 1996; HOSPENTHAL *et al.*, 2002) enquanto outros não o recomendam (ODDS; BERNAERTS, 1994; KOEHLER *et al.*, 1999; ODDS; DAVIDSON, 2000).

Várias metodologias moleculares para identificação de leveduras do gênero *Candida* têm sido descritas e muitas utilizam o cluster gênico do RNA ribossomal como alvo (WILLIAMS *et al.*, 1995; PARK *et al.*, 2000; LOEFFLER *et al.*, 2000; FUJITA *et al.*, 2001; GHARIZADEH *et al.*, 2004). Como o gene está presente como múltiplas cópias no genoma dessas leveduras (JONES *et al.*, 2004) as técnicas se tornam altamente sensíveis. Além disso, o tamanho das regiões intergênicas (ITS: *intergenic region*) varia entre as diferentes espécies, o que permite a diferenciação das mesmas.

Na técnica de semi-nested PCR descrita por Ahmad *et al.*, (2002), os oligonucleotídeos iniciadores universais são capazes de amplificar o final da extremidade 3' do DNA ribossomal (rDNA) 5.8S e a extremidade 5' inicial do rDNA 28S e a região espaçadora interna. No segundo ciclo de amplificação, iniciadores espécie-específicos complementares a região ITS2 revelam a identidade das espécies. E diferente de muitos métodos, essa técnica não requer manipulação posterior do produto de amplificação. Contudo, a limitação dessa técnica reside no fato de que somente quatro espécies de *Candida* são identificadas, dessa forma os isolados de *C. krusei* não puderam ser confirmados através da mesma.

Assim como o meio cromogênico, a reação de sn-PCR pode ser utilizada diretamente em amostras clínicas, tornando mais rápido o processo de identificação das espécies de leveduras (AHMAD *et al.*, 2002).

Os nossos resultados mostram que as duas metodologias podem ser utilizadas para identificação das espécies mais frequentes de *Candida*, em laboratórios clínicos. Contudo, novas metodologias capazes de identificar todas as espécies clinicamente importantes devem ser desenvolvidas. A correta identidade das espécies pode contribuir para o estabelecimento de uma terapia mais adequada nos casos de candidíase e conseqüentemente diminuir a freqüência de isolados resistentes aos antifúngicos.

Referências

- AHMAD, S.; KHAN, Z.; MUSTAFA, A.S.; KHAN, Z.U. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection and biochemical methods for species identification. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.7, p.2483-2489, 2002.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. *In*: Short protocols in molecular biology (4th ed.). New York, John Wiley and Sons, 1999.
- CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, v.9, n.7, p.327-335, 2001.
- CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; VIUDES, A.; QUINDÓS, G.; GOBERNADO, M.; ESPINEL-INGROFF, A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.45, p.203-206, 2003.
- CÁRDENES, C.D.; CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; ARIAS, A.; RODRIGUEZ-ALVARES, C.; TORRES-LANA, A.; SIERRA, A.; ARÉVALO, M.P. Comparative evaluation of four commercial tests for presumptive identification of *Candida albicans*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 59, p.293-297, 2004.
- COLLIN, B.; CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. Antifungal resistance in non-albicans *Candida*. *Drug Resistance Updates*, v.2, p.9-14, 1999.
- COOKE, V.M.; MILES, R.J.; PRICE, R.G.; MIDGLEY, G.; KHAMRI, W.; RICHARDSON, A.C. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.7, p.3622-3627, 2002.
- ERJAVEC, Z.; VERWEIJ, P.E. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resistance Updates*, v.5, p.3-10, 2002.
- FUJITA, S.I.; SENDA, Y.; NAKAGUCHI, S.; HASHIMOTO, T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeasts strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.10, p.3617-3622, 2001.
- GHARIZADEH, B.; NORBERG, E.; LOFFLER, J.; JALAL, S.; TOLLEMAR, J.; EINSELE, H.; KLINGSPOR, L.; NYREN P. Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing™ technology. *Mycoses*, v.47, p.29-33, 2004.
- HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. *Trends in Microbiology*, v.9, n.12, 591-596, 2001.

- HAZEN, K.C. New and emerging yeast pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, v.8, n.4, p.462-478, 1995.
- HORVATH, L.L.; HOSPENTHAL, D.R.; MURRAY, C.K.; DOOLEY, D.P. Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar Candida. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.6, p.2629–2632, 2003.
- HOSPENTHAL, D.R.; MURRAY, C.K.; BECKIUS, M.L.; GREEN, J.A.; DOOLEY, D.P. Persistence of pigment production by yeast isolates grown on CHROMagar Candida medium. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.12, p.4768–4770, 2002.
- HUBE, B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, v.7, p.336-341, 2004.
- JONES, T.; FEDERSPIEL, N.A.; CHIBANA, H.; DUNGAN, J.; KALMAN, S.; MAGEE, B.B.; NEWPORT, G.; THORSTENSON, Y.R.; AGABIAN, N.; MAGEE, P.T.; DAVIS, R.W.; SCHERER, S. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academic of Sciences of USA*, v.101, n.19, p.7329-7334, 2004.
- KHAN, Z.U.; AHMAD, S.; MOKADDAS, E.; CHANDY, R. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.10, p.4796-4798, 2004.
- KOEHLER, A.P.; CHU, K.C.; HOUANG, E.T.S.; CHENG, A.F.B. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.2, p.422–426, 1999.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. ed. (1998). *In*: The yeasts, a taxonomic study. 4th ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- LOEFFLER, J.; HEBART, H.; MAGGA, S.; SCHMIDT, D.; KLINGSPOR, L.; TOLLEMAR, J.; SCHUMACHER, U.; EINSELE, H. Identification of rare *Candida* species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.38, p.207–212, 2000.
- McGINNIS, M.R.; PADHYE, A.A.; AJELLO, L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic Actinomycetes in sterile distilled water. *Applied Microbiology*, v.28, n.2, p.218-222, 1974.
- MATHEMA, B., CROSS, E., DUN, E., PARK, S., BEDELL J., SLADE B., WILLIAMS, M., RILEY, L.; CHATURVEDI, V.; PERLIN, D.S. Prevalence of vaginal colonization by drug-resistant *Candida* species in college-age women with previous exposure to over-the-counter azole antifungals. *Clinical Infectious Diseases*, v.33, p.E23-E27, 2001.
- MICHEL-NGUYEN, A.; FAVEL, A.; CHASTIN, C.; SELVA, M.; REGLI, P. Comparative evaluation of a commercial identification of *Candida lusitanae*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v.19, p. 393-395, 2000.
- ODDS, F.C.; BERNAERTS, R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.8, p.1923–1929, 1994.
- ODDS, F.C.; DAVIDSON, A. “Room temperature” use of CHROMagar Candida™. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.38, n.3, p.147-150, 2000.
- PARK, S.; WONG, M.; MARRAS, S.A.E.; CROSS, E.W.; KIEHN, T.E.; CHATURVEDI, V.; TYAGI, S.; PERLIN, D.S. Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.8, p.2829-2836, 2000.

- PFALLER, M.A.; HOUSTON, A.; COFFMANN, S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.1, p.58-61, 1996.
- PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOERN, G.V.; FLUIT, A.C.; VERHOEF, J.; SADER, H.S.; MESSER, S.A.; HOUSTON, A.; COFFMAN, S.; HOLLIS, R.J. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.35, p.19-35, 1999.
- PRICE, M.F.; LaROCCO, M.T.; GENTRY, L.O. Fluconazole susceptibilities of *Candida* species and distribution of species recovered from blood over a 5-year period. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.38, n.6, p.1422-1424, 1994.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. In: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 3rd ed, 2001.
- SANCHEZ-VARGAS, L.O.; ORTIZ-LOPEZ, N.G.; VILLAR, M.; MORAGUES, M.D., AGUIRRE, J.M.; CASHAT-CRUZ, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; GAITAN-CEPEDA, L.A.; QUINDOS, G. Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.8, p.4159-4162, 2005.
- SANT'ANA, P. de L.; MILAN, E.P.; MARTINEZ, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; FERREIRA, M.S.; ALCANTARA, A.P.; CARVALHO, M.T. COLOMBO, A.L. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, n.2, p.253-257, 2002.
- WEIG, M.; GROB, U.; MUHLSCHLEGEL, F. Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection. *Trends in Microbiology*, v.6, n.12, p. 468-470, 1998.
- WILLIAMS, D.W.; WILSON, M.J.; LEWIS, M.A.O.; POTTS, A.J.C. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.9, p.2476-2479, 1995.

Tabela 1: Identificação dos isolados clínicos através do meio cromogênico e sn-PCR.

| Espécies | Número de isolados identificados por: | | % de concordância entre os dois métodos |
|------------------------|---------------------------------------|--------|---|
| | CHROMagar | sn-PCR | |
| <i>C. albicans</i> | 22 | 24 | 91,7 |
| <i>C. glabrata</i> | 09 | 11 | 81,8 |
| <i>C. tropicalis</i> | 05 | 05 | 100 |
| <i>C. krusei</i> | 03 | NI | - |
| <i>C. parapsilosis</i> | NI | 03 | - |
| <i>Candida</i> sp | 13 | 09 | - |

NI: não identificado

Tabela 2: Resultados não concordantes obtidos no meio cromogênico e sn-PCR.

| Isolados clínicos | CHROMagar | sn-PCR |
|-------------------|--------------------|------------------------|
| FV7, FV21, FV25 | NI | <i>C. albicans</i> |
| FV98 | <i>C. albicans</i> | <i>C. glabrata</i> |
| FV53, FV108 | NI | <i>C. glabrata</i> |
| FV27, FV48 | NI | <i>C. parapsilosis</i> |
| FV103 | <i>C. glabrata</i> | <i>C. parapsilosis</i> |
| CO2, CO34, CO56 | <i>C. krusei</i> | NI |

FV: amostra isolada de fluidos vaginais; CO: amostra isolada de cavidade oral; NI: não identificado

Identification and secreted proteinase activity of *Candida* isolates from oral mucosas of HIV-infected patients

Narjara do Carmo Oliveira^a, Fernando César Bizerra^a, Paulo Roberto Ceridóreo Correa; Luciana Furlaneto ^a, Marcelo Carneiro^b and Sueli Fumie Yamada-Ogatta ^{a,*}.

^a Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

^b Serviço de Infectologia do Hospital Santa Cruz, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

* Corresponding author. Tel: +55-43-3371-4297; fax: +55-43-3371-4192.

E-mail address: ogatta@uel.br (S.F. Yamada-Ogatta)

Abstract

Oropharyngeal candidiasis (OPC) is the most prevalent opportunistic infection in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. It may occur in up to 50% of the HIV-infected individuals and in up to 80% of those with acquired immunodeficiency disease syndrome (AIDS), at least once, during the course of their disease. We isolated yeasts from oral cavity of HIV-infected individuals attended at Centro Integrado de Doenças Infecciosas in Londrina, Paraná. All isolates were identified by PCR-based method and tested for secreted proteinase, phospholipase and hemolysin activity *in vitro*. In addition, we evaluated the susceptibility pattern of the isolates against fluconazole by broth microdilution assays according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A standard and the capacity to form biofilm in polystyrene microtitration plates. *C. albicans* (71.4%) was the most prevalent species isolated in the population studied. Non-*albicans* species were isolated from 8 patients (28.6%), and they were identified as *C. krusei* (3), *C. tropicalis* (2) and three isolates can not be identified. Only one isolate of *C. krusei* was resistant to fluconazole (MIC=64 µg/ml) and three were susceptible dose dependent yeasts (MIC=32 µg/ml). Except one, the others isolates showed the presence of secreted proteinase activity on the skim milk and hemolytic activity on sheep blood agar. Extracellular phospholipase activity on egg yolk agar was found in twenty two isolates. Only both isolates of *C. tropicalis* and one isolate of *C. krusei* produced biofilm *in vitro*.

Key words: HIV-infected patients, *Candida* sp, proteinase, phospholipase, hemolysin, biofilm.

Introduction

Candida albicans and related species are harmless colonizer of the gastrointestinal and reproductive tracts in healthy individuals. However as opportunistic pathogens, they can cause diseases ranging from mucosal candidiasis to life-threatening disseminated infections, mainly in immunocompromised hosts (44). Oropharyngeal candidiasis (OPC) is the most prevalent opportunistic infection in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients (38). The severity and chronicity of oral lesions due to *Candida* species in these patients have been attributed to progressive HIV-induced cell-immunodeficiency. In particular, CD4⁺ lymphocytes counts less than 200 cells/mm³ is an elevated risk for colonization with these yeasts and development of OPC (11).

Antifungals agents, such as polyenes (amphoterecin B) and azoles (fluconazole) are often used to treat mucosal candidiasis. However, in HIV-infected patients, OPC is difficult to eradicate even with appropriate antifungal treatments, so in these individuals recurrent episodes are frequent. In addition, antifungal-resistant *Candida* species have been reported (18, 25, 27, 28, 39).

Different traits of *C. albicans* have been considered as putative factors of virulence and infection development: adherence to host tissues, yeast-hyphal reversible transition (morphogenesis) and phenotypic switching (5). In addition, this microorganism secretes proteinases (17), phospholipases (16) and that contribute to fungal pathogenicity.

In *C. albicans*, the secreted aspartyl proteinases (Saps) are encoded by a multigene family with 10 members presenting slightly different characteristics. Distinct members of this family are expressed under a variety of laboratory conditions and during experimental infections (17).

The role of Saps activity in the pathogenesis of *C. albicans* has been studied extensively. These enzymes have the potential to degrade a large numbers of host proteins (9, 21, 30). Inhibition of Saps with aspartyl proteinases inhibitors prevented *C. albicans* invading and causing tissue damaging in experimental model infections (12, 41). Besides, HIV aspartyl proteinase inhibitors also act on *C. albicans* (7, 22) and *C. parapsilosis* (2) Saps activity *in vitro*. Then, Saps inhibitions mediated by these substances reduce cell adherence of *C. albicans*, important in the establishment of infections (3, 4).

Few studies concerning the production of phospholipase and hemolytic activity by oral isolates of HIV-infected patients

In the study described here, we isolated yeasts from oral cavity of HIV-infected individuals with no clinical evidence of candidiasis. All isolates were identified and tested for secreted proteinase activity. In addition, we evaluated the *in vitro* susceptibility pattern of the isolates against fluconazole.

Patients, Materials and Methods

Study population

Ninety seven HIV-infected patients attended to at the Centro Integrado de Doenças Infecciosas at Londrina city, state of Paraná, Brazil were evaluated. All of them signed an informed consent in order to participate of this study. During the specimen collection, neither was taking antifungal agents and presenting clinical evidence of oral candidiasis. The most recent CD4⁺ T lymphocyte count and the antiretroviral therapy prescribed were obtained.

Isolates identification

Samples of the patients were obtained by scraping the buccal wall with a sterile cotton swab. Immediately after sampling, each swab was placed in Sabouraud broth medium (Cultilab, São Paulo, Brazil) supplemented with 50 µg/ml of chloramphenicol. The tubes were transported within 1 h to the laboratory, then they were incubated at 35 °C for 3 h. 100 µl sample were spread on Sabouraud agar medium supplemented with 50 µg/ml of chloramphenicol. The cultures were incubated at 35 °C for 24-96 h under aerobic conditions. All isolates were also cultured on CHROMagar Candida® medium (Probac, São Paulo, Brasil) for differential growth analysis. Two PCR-based methods for species identification were performed using specific primers directed against the 3' end of 5.8S and 5' end of 28S rDNA regions (1) and *chs1* (chitin synthetase 1 gene) (29). Genomic DNA extraction was performed according to Jain and colleagues (19).

Antifungal susceptibility testing

The minimum inhibitory concentrations of fluconazole (Pfizer Central Research, United Kingdom) for all isolates were determined by broth microdilution assays for yeasts according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A2 standard (33). Quality control *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) was included in each experiment. Two wells of each plate served as growth and sterility controls. The following breakpoints definitions for fluconazole were used according to NCCLS guidelines, considering isolates with MICs ≥ 64 µg/ml, resistant, isolates between 16-32 µg/ml, susceptible dose dependent and isolates with MICs ≤ 8 µg/ml, susceptible.

Determination of extracellular protease activity

All isolates were tested for their ability to grow and produce a hydrolysis zone on agar plate containing skim milk as protease substrate. The yeast isolates were cultured in minimal medium (MM) broth (35) supplemented with 0.6% skim milk pH 4.0 to induce the secretion of protease. Cells were counted and a 10- μ l suspension of 10^6 yeasts was placed on the surface of the medium, and the cultures were incubated at 37 °C for 96 h, after which the diameter of the degradation zone around the colony was determined. The enzymatic activity was determined by calculating the ratio between colony diameter and colony diameter plus hydrolysis halo. The isolates were classified according to Price and colleagues (37). Each isolate was tested in triplicate, and the experiment was carried out on three different occasions.

Results and Discussion

Oropharyngeal candidiasis is one of the oral lesions indicators of HIV infection. It may occur in up to 50% of the HIV-infected individuals and in up to 80% of those with acquired immunodeficiency disease syndrome (AIDS), at least once, during the course of their disease (10). *C. albicans* is the most frequently causative agent of candidal infection in humans, including HIV/AIDS patients (27, 30, 35, 39, 42). However, non-*albicans* species have become a significant cause of infection in human (8).

The first case of AIDS notified in Londrina city occurred in 1984 and until 2003, 1,361 adults, including 19 pregnant women, and 52 children were diagnosed as HIV-infected individuals. However, the cases number can be under-estimated, mainly in early phase of the epidemic. Most of the patients are men (20 to 49 years old) and the sexual transmission is the most prevalent pathway of contamination. They are regularly evaluated by experienced infectious disease physicians at the Centro Integrado de Doenças Infecciosas, a major referral center for the management of HIV-related infections in the north of the Parana State. And, they receive all currently available medications to treat HIV infection.

A total of 97 HIV-infected patients were enrolled in this study. Of these patients 28 (28.9 %) were colonized by yeasts. The age of the positive patients ranged from 26 to 70 years (median 42.5 years old) and the majority of them were men (60.7%). The values of CD4⁺ lymphocytes counts ranged from 8 to 1,074 cells/mm³, with a median count of 386 cells/mm³. Only three patients reported previous use of azole antifungals (ketoconazole and fluconazole) in 6 months before sampling. Thirteen patients (46.4%) were on highly active antiretroviral therapy (HAART) associated to a viral protease inhibitor (atazanavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir) (Tables 1 and 2).

We found a high prevalence of *C. albicans* (71.4%) isolates in the population studied. Non-*albicans* species were isolated from 8 patients (28.6%), three isolates were identified as *C. krusei* and two, as *C. tropicalis*. We cannot identify three isolates with the methodology used in this study. The Table 3 resumes all results obtained in this study and which will be discussed.

Fluconazole is established as a first-line antifungal for the treatment of oral candidiasis. Overall, *C. albicans* isolates from HIV-infected patients have been found to be susceptible to this substance. However, azole-resistant *C. albicans* and non-*albicans*, mainly *C. krusei* and *C. glabrata*, have been reported (27, 28, 39, 40). In addition, the azole cross-resistance has been found among *Candida* isolates (6, 23, 31).

In this study, only one isolate of *C. krusei* was resistant to fluconazole (MIC=64 µg/ml) and three patients harbored susceptible dose dependent yeasts (MIC=32 µg/ml, one isolate each of *C. albicans*, *C. krusei* and *Candida* sp).

Several factors might be responsible for the emergence of *Candida* resistant isolates, including the increased use of antifungal agents. Indeed, colonization with azole-resistant yeast after treatment with fluconazole has been reported (20, 43, 45). Among our patients, as mentioned, three had used azole antifungal in a period of 6 months before sampling. In two of them, we isolated fluconazole susceptible *C. albicans* (MIC=0.25 and 0.5 µg/ml). In another, we found one isolate of *C. krusei* susceptible dose dependent. Interestingly, this yeast was recovered from a patient with previous exposure to cetoconazol, suggesting the emergence of cross resistance between two azoles antifungals. However, more investigations are needed to demonstrate this phenomenon.

The higher secretory proteinase activity in *Candida* strains isolated from HIV infected individuals has been demonstrated (13, 34). The introduction of HAART that includes HIV proteinase inhibitors has dramatically reduced the incidence of opportunistic infections in these patients. The HAART treatment results in a significant improvement in the immune status of HIV-infected patients correlated with an increase in the number of CD4⁺ lymphocyte (32). In addition, these inhibitors exert a direct inhibitory effect on *C. albicans* secretory proteinase activity *in vitro* and *in vivo* (7, 14, 22). In view of these results, many efforts have been undertaken to investigate the role of secreted proteinase activity of *Candida* isolates during the course of HIV infection (3, 4, 13, 14, 22, 34).

Secretory proteinase activity of *Candida* sp can be detected with the agar plate method using different substrates (9, 15, 24, 26). We used a fungal minimal medium (35) supplemented with skim milk for assaying secreted proteinase activity. The activity was determined by visual measurement of the hydrolysis zone around the colony without any revelation step. Additionally, as MM is a chemically defined medium it is possible to determine the real role of specific substrate in enzyme activity.

The isolates of this study, except one *Candida* sp strain, showed the presence of secreted proteinase activity on the skim milk and all *C. albicans* and *C. krusei* isolates presented high proteinase activity. The enzymatic activity of two isolates of *C. tropicalis* was classified as intermediate, and one *Candida* sp was negative for this activity. No correlation was found with high proteinase activity of the isolates and CD4⁺ lymphocytes counts. Similar results were obtained by Ollert and colleagues (34), and they suggested that increased proteinase activity is independent of the patient's immune status. In addition, those investigators found that the higher level of secretory activity proteinase in the culture supernatants of *C. albicans* isolates correlated with the increased level of proteinase expression on the cells surface and higher levels of protein secretion.

Surprisingly, no significant differences in proteinase activity were observed among *Candida* strains isolated from patients on HAART or the group not receiving this treatment. The patient harbored the isolate of *Candida* sp which presented no proteinase activity was on HAART, but we do not know about the proteinase activity of this yeast before the treatment.

Further studies are warranted to investigate the expression of *Candida* sp virulence factors in the HIV-infected populations and such investigations are currently underway in our laboratory.

Acknowledgement

We thank Dr. Sueli Galhardi from Centro Integrado de Doenças Infecciosas for permitting the samples collection. We also thank Dr. Albert Leyva for reading this manuscript.

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação (PROPPG) of Universidade Estadual de Londrina (UEL). This work is part of N.C.O. M.Sc. manuscript.

References

- (1) Ahmad S, Khan Z, Mustafa SA, Khan UZ. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 2483-9.
- (2) Ascencio MA, Garduno E, Perez-Giraldo C, Blanco MT, Hurtado C, Gomez-Garcia AC. Exposure to therapeutic concentrations of ritonavir, but not saquinavir, reduces secreted aspartyl proteinase of *Candida parapsilosis*. *Chemotherapy* 2005; 51(5):252-5.
- (3) Bektic J, Lell CP, Fuchs A, Stoiber H, Speth C, Lass-Florl C, Borg-von Zepelin M, Dierich MP, Wurzner R. HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells *in vitro*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001; 31(1):65-71.
- (4) Borg-Von Zepelin M, Meyer I, Thomssen R, Würzner R, Sanglard D, Telenti A, Monod M. HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *J Invest Dermatol.* 1999, 113: 747-751.
- (5) Calderone R A, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001, 9(7): 327-335.
- (6) Cartledge JD, Midgley J, Gazzard BG. Clinically significant azole cross-resistance in *Candida* isolates from HIV-positive patients with oral candidosis. *AIDS* 1997, 11(15):1839-44.
- (7) Cassone A, De Bernardis F, Torosantucci A, Tacconelli E, Tumbarello M, Cauda R. *In vitro* and *in vivo* anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *J Infect Dis.* 1999, 180(2):448-53.
- (8) Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, Li A, Sullivan DJ. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol.* 1998, 36(1):156-65.
- (9) Colina A R, Aumont F, Deslauriers N, Belhumeur P, De Repentigny L. Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infection and Immunity* 1996, 64(11): 4514-4519.
- (10) Coogan MM, Greenspan J, Challacombe SJ. Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. *Bull World Health Organ.* 2005, 83(9):700-6.
- (11) [Crowe SM](#), [Carlin JB](#), [Stewart KI](#), [Lucas CR](#), [Hoy JF](#). Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV infected persons. *J Acquire Immune Defic Syndr.* 1991, 4(8): 770-776.

- (12) [De Bernardis F, Boccanera M, Adriani D, Spreghini E, Santoni G, Cassone A](#). Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect Immun*. 1997, 65(8):3399-405.
- (13) [De Bernardis F, Chiani P, Ciccozzi M, Pellegrini G, Ceddia T, D'offizzi G, Quinti I, Sullivan PA, Cassone A](#). Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun*. 1996, 64(2):466-471.
- (14) De Bernardis F, Tacconelli E, Mondello F, Cataldo A, Arancia S, Cauda R, Cassone A. Anti-retroviral therapy with protease inhibitors decreases virulence enzyme expression in vivo by *Candida albicans* without selection of avirulent fungus strains or decreasing their anti-mycotic susceptibility. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004, 41(1): 27-34.
- (15) Dostál J, Hamal P, Pavlickova L, Soucek M, Ruml T, Pichova I, Hruskova-Heidingsfeldova O. Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. *J Clin Microbiol*. 2003, 41(2): 712-716.
- (16) [Ghannoum MA](#). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2000, 13(1):122-43.
- (17) Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 2001, 147: 1997-2005.
- (18) Hung CC, Yang YL, Lauderdale TL, McDonald LC, Hsiao CF, Cheng HH, Ho YA, Lo HJ. Colonization of Human Immunodeficiency Virus-Infected Outpatients in Taiwan with *Candida* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43(4): 1600-1603.
- (19) Jain P, Khan Z K, Bhattacharya E, Ranade S A. Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and -sensitive strains of *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2001,41:113–119.
- (20) Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrob Chemother*. 1995; 35(1):103-14.
- (21) Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, Matsumoto H, Maeda H, Hagihara Y. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infection and Immunity* 1995, 63(3): 984-988.
- (22) Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Bohmer U, Hube B. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999, 43(8):2038-2042.

- (23) [Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA](#). In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol*. 2005, 20(6):349-53.
- (24) Kuriyama T, Williams DW, Lewis MAO. *In vitro* secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral Microbiol Immun*. 2003, 18: 405-407.
- (25) Le Guennec R, Reynes J, Mallie M, Pujol C, Janbon F, Bastide JM. Fluconazole- and itraconazole-resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients: multilocus enzyme electrophoresis analysis and antifungal susceptibilities. *J Clin Microbiol*. 1995, 33(10):2732-7.
- (26) Lerner CG, Goldman RC. Stimuli that induce production of *Candida albicans* extracellular aspartyl proteinase. *J Gen Microbiol*. 1993, 139: 1643-1651.
- (27) [Melo NR, Taguchi H, Jorge J, Pedro RJ, Almeida OP, Fukushima K, Nishimura K, Miyaji M](#). Oral *Candida* flora from Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, 99(4):425-431.
- (28) Migliorati CA, Birman EG, Cury AE. Oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients under treatment with protease inhibitors. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology* 2004, 98(3): 301-310.
- (29) Milde K, Kostkaa V, Kaletaa EF, Willems H, Jager C. Multiplex-PCR-based differentiation and characterization of *Candida*-isolates derived from tortoises (Testudinidae). *Vet Microbiol*. 2000, 76: 395-402.
- (30) Morschhäuser J, Virkola R, Korhonen TK, Hacker J. Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters* 1997, 153 (2): 349-355.
- (31) Muller FM, Weig M, Peter J, Walsh TJ. Azole cross-resistance to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole in clinical *Candida albicans* isolates from HIV-infected children with oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother*. 2000, 46(2):338-40.
- (32) Munro, CA, Hube, B. Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. *Trends Microbiol*, 2002, 10(4): 173-177.
- (33) NCCLS - Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeast. Approved standard M27-A. 2nd ed. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2005.
- (34) [Ollert MW, Wende C, Gorlich M, McMullan-Vogel CG, Borg-Von Zepelin M, Vogel CW, Korting HC](#). Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(10):2543-2549.

- (35) Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, McDonald KD, Bufton WFC. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet*, 1953, 5: 141-238.
- (36) [Portela MB, Souza IP, Costa EM, Hagler NA, Soares RM, Santos AL](#). Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in human immunodeficiency virus-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(12):5925-5927.
- (37) Price MF, Wilkinson IA, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Saunders* 1982, 20: 7-14.
- (38) Samaranayake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1992, 73(2):171-180.
- (39) [Sanchez-Vargas LO, Ortiz-Lopez NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, Lopez-Ribot JL, Gaitan-Cepeda LA, Quindos G](#). Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(8):4159-4162.
- (40) Sant'ana, P.L.; Milan, E.P.; Martinez, R.; Queiroz-Telles, F.; Ferreira, M.S.; Alcântara, A.P.; Carvalho, M.T. Colombo, A.L. Multicenter Brazilian Study of Oral *Candida* Species Isolated from Aids Patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, 97(2): 253-257.
- (41) Schaller M, Schackert C, Korting HC, Januschke E, Hube B. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol*, 2000, 114: 712-717.
- (42) Schmidt-Westhausen AM, Bendick C, Reichart PA, Samaranayake LP Oral candidosis and associated *Candida* species in HIV-infected Cambodians exposed to antimycotics. *Mycoses*. 2004, 47(9-10):435-41.
- (43) Sobel JD, Ohmit SE, Schuman P, Klein RS, Mayer K, Duerr A, Vazquez JA, Rampalo A; HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group. The evolution of *Candida* species and fluconazole susceptibility among oral and vaginal isolates recovered from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women. *J Infect Dis*. 2001, 15;183(2):286-93.
- (44) Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica* 2002, 81:101-110.
- (45) [Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R](#). Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med*. 1991, 325(18):1274-7.

Table 1: Demographics of patients enrolled in this study

| Age | Man | Woman | Total | CD4 ⁺ (cells/mm ³) |
|-------------|------------|------------|------------|---|
| 26-36 | 3 (10.7%) | 2 (7.1%) | 5 (17.9%) | 446.4 |
| 37-47 | 12 (42.9%) | 5 (17.9%) | 17 (60.7%) | 333.7 |
| 48-58 | 2 (7.1%) | 3 (10.7%) | 5 (17.9%) | 629 |
| 59-70 | 0 | 1 (3.6%) | 1 (3.6%) | 393 |
| Tota | 17 (60.7%) | 11 (39.3%) | 28 (100%) | Median 386 |

1

Table 2: Demographics of the patients in use of HAART

| Isolate | Age | Antiretroviral ^a | CD4 ⁺ (cells/mm ³) |
|---------|-----|-----------------------------|---|
| 2 | 39 | ATC, ATZ | 381 |
| 9 | 34 | AZT, DDI, ATZ | 1074 |
| 12 | 27 | ATC, NFV | 451 |
| 13 | 48 | D4T, 3TC, ATZ | 964 |
| 15 | 45 | D4T, 3TC, IDV | 431 |
| 21 | 34 | D4T, DDI, NFV | 480 |
| 32 | 47 | ATC, NFV | 324 |
| 36 | 42 | D4T, DDI, EFV, ATZ | 108 |
| 38 | 52 | ATC, NFV | 667 |
| 43 | 38 | 3TC, DDI, IDV, EFV, LOP | 276 |
| 53 | 45 | D4T, 3TC, NVP, LOP | 125 |
| 66 | 39 | ATC, ATZ | 367 |
| 96 | 38 | ATC, ATZ | 496 |

^a: ATC: lamivudine plus zidovudine, ATZ: atazanavir, AZT: zidovudine, DDI: didanosine, D4T: stavudine, EFV: efavirenz, IDV: indinavir, LOP: lopinavir, NFV: nelfinavir, NVP: nevirapine, 3TC: lamivudine.

Table 3: MICs range for fluconazole and proteolytic activity of the *Candida* isolates from oral cavities of HIV-infected patients

| Isolates | Identification | Fluconazole^a | Proteolytic Activity^b |
|-----------------|-----------------------|--------------------------------|---|
| 20 (71.4%) | <i>C. albicans</i> | 0.25- 32 | 0.13-0.23 |
| 2 (7.1%) | <i>C. tropicalis</i> | 2-4 | 0.30-0.33 |
| 3 (10.1%) | <i>C. krusei</i> | 8-64 | 0.22-0,28 |
| 3 (10.1%) | <i>Candida sp.</i> | 0.5-32 | 0.13-1 |

^a The MICs ($\mu\text{g/ml}$) were determined according to the NCCLS M27-A2 standard (32).

^b Pz = 1, negative; $0.64 \leq \text{Pz} < 1$, low; $0.30 \leq \text{Pz} < 0.64$, intermediate; $\text{Pz} < 0.30$, highly positive. The Pz index was determined by calculating the ratio between colony diameter and colony diameter plus hydrolysis halo (36).