

GISELA RAMOS TERÇARIOLI

**COMPARAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE
DIFERENTES ISOLADOS CLÍNICOS DE COLONIZAÇÃO
E CANDIDEMIA POR *Candida rugosa***

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, Departamento de Medicina-
Disciplina de Infectologia, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

**SÃO PAULO
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GISELA RAMOS TERÇARIOLI

**COMPARAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE
DIFERENTES ISOLADOS CLÍNICOS DE COLONIZAÇÃO
E CANDIDEMIA POR *Candida rugosa***

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, Departamento de Medicina - Disciplina de Infectologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

Co-orientador: Dr. Guilherme Maranhão Chaves

São Paulo
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Ângelo Amato Vincenzo de Paola

Vice-Chefe do Departamento: Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Especial de Micologia, da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, aprovado pelo Comitê de Ética (1938/07), contando com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

GISELA RAMOS TERÇARIOLI

COMPARAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE DIFERENTES ISOLADOS CLÍNICOS DE COLONIZAÇÃO E CANDIDEMIA POR *Candida rugosa*

Presidente da banca:

Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Bagagli

Dra. Analy Salles de Azevedo Mello

Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula

SUPLENTE

Prof. Dra. Eveline Pipolo Milan

Dedicatória

Aos meus pais e ao meu irmão:

Bernardete Ramos Terçarioli

José Maria Terçarioli

Caio Ramos Terçarioli

Acredito de verdade que tudo que sou e tudo que serei na vida nada mais são do que fruto de todo amor e da convivência maravilhosa que temos como família. Obrigada por me amarem incondicionalmente, me apoiarem em todos os momentos, por se orgulharem de mim e acreditarem no meu potencial.

Amo muito vocês.

Agradecimentos Especiais

Agradeço a Deus, por ter me dado minha preciosa vida e muita saúde.

À gangue

Daniel da Matta (Dan), pela gentileza e carinho, Fernanda (Ferzinha), pela casa, ajuda nos experimentos e conselhos preciosos, Ricardo (Rick), “você não vale nada, mas eu gosto de você”, Sabrina (SAB de sabouraud), pela paciência em me ouvir e por adivinhar meus pensamentos e Sarah (Siara), por me entender tão bem e ser tão amável.

Queridos amigos, obrigada pelo companheirismo e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos: congressos, cerveja, Ritorna, cerveja, baladas, cerveja, sala de “estudos”, cerveja, Argentina, cerveja, Campinas, cerveja, Recife, cerveja, Curitiba, cerveja, casa da Ferzinha e da Sarah, e, é claro, mais cerveja.

Amigos, foi um prazer conviver diariamente com vocês por mais de 2 anos da minha vida. Já sinto saudades de todos. Amo vocês.

Ao meu namorado Marcelo, que por nenhum segundo deixou de acreditar e torcer por mim, tolerou todo meu estresse (ou seria TPM) com muita paciência, me acompanhou nas horas boas e ruins. Te amo!

Agradecimentos

A verdade, é que esta tese de mestrado é fruto da ajuda e da convivência com muitas pessoas especiais, as quais eu tive a honra de conhecer:

Ao meu orientador **Prof. Arnaldo Lopes Colombo**, pela confiança, credibilidade e oportunidade que você me deu para eu realizar o meu mestrado. Sou muito grata pelos conhecimentos que adquiri ao longo desses dois anos durante sua orientação. Muito obrigada.

Ao meu co-orientador **Dr. Guilherme Maranhão Chaves**, por todo apoio e por tudo que me ensinou. Se não fosse pelo seu esforço e compromisso, esta tese não existiria. Obrigada por confiar em mim.

A todas as pessoas da minha gigantesca família (por parte de mãe e de pai), que sempre estiveram ao meu lado (apesar da distância), e que formam um exército de pessoas com as quais sempre poderei contar, em especial: à minha madrinha **Noêmia** (em quem eu me espelho), tio **Dito** e tia **Giovana** (pela prazerosa hospedagem em Campinas), minhas primas **Raquel** (pela ajuda em Estatística) e **Mayra** (minha quase irmã, pela **Bruna** e pela **Beatriz**).

À **Josiane (Jô)**, nossa “mulher-maravilha”, que é o cúmulo do brilhantismo, divertimento e eficiência. Obrigada por tudo que você fez por mim!

Ao **Jorge Menezes (Rei da Rhodotorula)**, pela torcida, ajuda e pelos momentos de risada. Gostaria de ter convivido mais tempo com você.

Ao **Fernando**, por me prestar socorro tantas vezes durante o meu mestrado. Admiro muito suas qualidades.

À **Fernanda Dias (Fer loira)**, uma pessoa muito divertida e adorável, com quem eu tive a sorte de conviver por um tempo, e que até hoje está ao meu lado.

Ao **Bruno** (*in memoriam*), meu querido amigo, obrigada pelos momentos tão divertidos que passamos juntos, pelo carinho e atenção com a qual você me tratava. Tenho certeza que hoje você é um anjinho muito especial.

À **Edmea (Éd)**, nossa supervisora, por todo auxílio e principalmente pelas sábias palavras e lições de vida. Sei que você torce muito por mim.

À **Débora (Dé)**, pelas inúmeras ajudas com os meus experimentos, por compartilharmos coisas tão gostosas juntas (Victor e Léó) e pela torcida. Desejo muito sucesso para você.

Ao **Patrício** (Pato), por ser sempre tão prestativo, bem humorado e divertido. Um dia te visitarei no Chile!

À **Maria (Mary)**, a **Maria Romilda**, à **Fátima** e à **Camila Uchoa**, pela ajuda, conversas animadíssimas e almoços juntas. Obrigada pelo carinho e atenção, sem vocês tudo seria mais difícil.

Aos amigos da Retrovirologia, **Carla**, **Maria Clara**, **Michel**, **Juliana**, e especialmente ao **Wagner (Bágnier)**. Obrigada pela ajuda no sequenciamento e também pelas risadas, fofocas e amizade.

Aos alunos **Cedenir** e **Agélica**, e à Profa. **Gláucia Maria Pastore** de Campinas, pela excelente recepção e pelos conhecimentos que pude adquirir no Laboratório de Bioaromas.

A todos os amigos e colegas do LEMI que compartilharam comigo toda trajetória da minha tese e que, de alguma forma, me ajudaram a realizar este sonho: **Letícia**, **Tiago**, **Marcos**, **Mara**, **Analy**, **André**, **Daniel Wagner**, **Viviane**, **Thaís**, **Robert**, **Thomas**, **Vinicius**, **Fábio**, **Charlys** e **Carol**.

À minha cachorra **Mel**. Com ela não tem tempo ruim, é sempre uma festa a cada encontro.

Ao meu time do coração, o **Corinthians**, pelas alegrias e momentos de glória vividos nesses dois anos. **Ronaldo**, brilha muito no Corinthians!

À **FAPESP** (PROCESSO N° 2007/05880-8) e à **CAPES**, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para esse trabalho.

Muito Obrigada....

"A minha suspeita é de que o universo seja não somente mais estranho do que imaginamos, porém mais estranho do que podemos imaginar."

J. B. S. Haldane

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS	vi
AGRADECIMENTOS	vii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
<u>1.0 INTRODUÇÃO</u>	01
1.1 Infecções de corrente sanguínea por <i>Candida</i> spp.: impacto em saúde pública	02
1.2 Aumento de espécies de <i>Candida</i> não- <i>Candida albicans</i> como agentes de candidíase hematogênica	04
1.3 <i>Candida rugosa</i> como patógeno emergente e resistente a drogas antifúngicas	06
1.4 Fatores de virulência de <i>C. rugosa</i>	13
1.4.1 Enzimas hidrolíticas em <i>Candida</i> spp.	14
1.4.2 Formação de biofilme	19
1.5 Métodos de genotipagem em <i>Candida</i> spp.	22
<u>2.0 OBJETIVOS</u>	24
<u>3.0 MATERIAL E MÉTODOS</u>	26
3.1 Seleção das cepas	27
3.2 Verificação de viabilidade, pureza e identificação fenotípica das leveduras armazenadas como <i>Candida rugosa</i>	30

3.3 Tipagem molecular	31
3.3.1 Extração de DNA e formação de protoplastos	31
3.3.2 Tratamento do DNA com RNase	32
3.3.3 Quantificação do DNA	33
3.3.4 Reação de Microsatélite e RAPD	33
3.3.5 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR gerados por microsatélite e RAPD	35
3.3.6 Avaliação da similaridade dos padrões das bandas	36
3.4 Sequenciamento da região ITS (rDNA)	37
3.4.1 PCR da região ITS	37
3.4.2 Purificação das amostras de DNA	38
3.4.3 Reação de sequenciamento	39
3.4.4 Análise e alinhamento das sequências	41
3.5 Análise fenotípica dos fatores de virulência de <i>C. rugosa</i>	42
3.5.1 Caldo NGY para padronização do inóculo	42
3.5.2 Ensaio para detecção de atividade de proteinase em <i>C. rugosa</i>	42
3.5.3 Ensaio para detecção de atividade de fosfolipase em <i>C. rugosa</i>	43
3.5.4 Ensaio para detecção de atividade de lipase em <i>C. rugosa</i>	44
3.5.4.1 <i>Screening</i> de isolados produtores de lipase (método qualitativo)	45
3.5.4.2 Incubação dos isolados em meio indutor de lipase	45
3.5.4.3 Determinação da atividade lipolítica pelo método da hidrólise do laurato de p-nitrofenila (pNPL)	46
3.5.5 Formação de biofilme	47
3.5.6 Coloração do biofilme pelo cristal violeta	49
3.6 Testes de susceptibilidade a antifúngicos	49
3.7 Análise Estatística	52

<u>4.0 RESULTADOS</u>	53
4.1 Seleção das amostras utilizadas neste estudo e confirmação da identificação taxonômica	54
4.2 Tipagem molecular	58
4.2.1 Genotipagem por microsatélite	58
4.2.2 Genotipagem por RAPD	62
4.3 Sequenciamento da região ITS (rDNA)	66
4.4 Avaliação fenotípica dos isolados clínicos quanto aos fatores de virulência	70
4.4.1 Determinação da produção de proteinase de <i>C. rugosa</i>	70
4.4.2 Determinação da produção de fosfolipase em <i>C. rugosa</i>	74
4.4.3 Determinação da produção de lipase em <i>C. rugosa</i>	75
4.4.4 Avaliação da formação de biofilme em <i>C. rugosa</i>	80
4.4.5 Compilação dos resultados obtidos da avaliação dos fatores de virulência de <i>C. rugosa</i>	83
4.5 Avaliação do perfil de susceptibilidade das cepas de <i>C. rugosa</i> aos antifúngicos pelo método de micrudiluição em caldo	85
<u>5.0 DISCUSSÃO</u>	88
<u>6.0 CONCLUSÕES</u>	110
<u>7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	114

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Curva de calibração do p-nitrofenol e equação da concentração de p-nitrofenol em função da absorbância a 348nm. 47
- Figura 2:** Distribuição dos isolados de *C. rugosa* de acordo com o desfecho clínico dos pacientes analisados em seus respectivos grupos. 54
- Figura 3:** Imagem de microscopia óptica comum do microcultivo de dois isolados de *C. rugosa*, ATCC10571 (A) e 565D (B), em aumento 1000x. A micromorfologia revela presença de blastoconídeos ovóides e cilíndricos e abundância em pseudohifas para ambos os isolados. 55
- Figura 4:** Macromorfologia das cepas 387A (A) e ATCC10571 (B) de *C. rugosa* crescidas por 48 horas em meio ágar-sabouraud, a 30°C 57
- Figura 5:** Micromorfologia das cepas 61(A) e ATCC10571 (B) crescidas por 6 horas em meio RPMI pH4.0 a 37°C. 57
- Figura 6:** Genotipagem por microsatélite das amostras clínicas de *C. rugosa* amplificadas com o *primer* GACA₄. PM= Marcador de peso molecular. 59
- Figura 7:** Dendrograma construído pelo programa GelComparII através do método UPGMA, referente aos padrões de bandas gerados por amplificação utilizando-se o *primer* GACA₄ (microsatélite). Em verde, destaque para o grupo I, em vermelho para o grupo II e em azul, para o grupo III. 61
- Figura 8:** Genotipagem por RAPD das amostras clínicas de *C. rugosa* amplificadas com o *primer* B14. PM= Marcador de peso molecular. 63
- Figura 9:** Dendrograma construído pelo programa GelComparII através do método UPGMA, referente aos padrões de bandas gerados por amplificação utilizando-se o *primer* B14 (RAPD). Em verde, destaque para o grupo I, em vermelho para o grupo II e em azul, para o grupo III. 65

Figura 10: Gel de agarose 1,2% dos produtos amplificados com os <i>primers</i> ITS1 e ITS4. PM= Peso Molecular	67
Figura 11: Árvore filogenética dos isolados clínicos de <i>C. rugosa</i> , baseada nas sequências de ITS rDNA, obtidas pelo método de Neighbor Joining	69
Figura 12: Atividade de proteinase de isolados clínicos de <i>C. rugosa</i> (Grupos I, II e III) com células crescidas em YCB+BSA por 72 h, 30 °C a 200 rpm. As barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes	73
Figura 13: Distribuição dos 45 isolados de <i>C. rugosa</i> segundo a atividade de proteinase, expressa de acordo com a razão D.O.280nm/D.O.600nm.	73
Figura 14: Gráfico-caixa (<i>Boxplot</i>) das amostras de <i>C. rugosa</i> isoladas nos anos 2001/02 (1) e nos anos 1995/96 (2). O símbolo “*” indica que existe diferença significativa entre os valores de produção de proteinase entre os dois grupos ($p < 0,05$). *41 = <i>outlier</i> representado pelo isolado 106	74
Figura 15: Amostras 1016C (A) e ATCC10571 (B), exemplificando cepas produtoras e não produtoras de lipase, respectivamente, em meio ágar-Rhodamina B, visualizadas sob incidência de luz UV	76
Figura 16: Gráfico da razão entre o diâmetro do halo de hidrólise da lipase e o da colônia (H/C) das 45 amostras de <i>C. rugosa</i> crescidas em meio contendo ágar, óleo de oliva e Rhodamina B	76
Figura 17: Produção de lipase dos isolados de <i>C. rugosa</i> (Grupos I, II e III) com células crescidas em meio indutor contendo óleo de oliva por 48h, 30 °C a 150 rpm. As barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes	78
Figura 18: Distribuição dos 45 isolados de <i>C. rugosa</i> segundo a produção de lipase, expressa em função da razão da absorbância a 348nm, que representa o produto da hidrólise do pNPL, sobre a absorbância a 600nm, que representa o crescimento celular no meio indutor	78

- Figura 19:** Gráfico-caixa (*Boxplot*) das amostras de *C. rugosa* isoladas de sangue (2) e dos demais sítios (1). O símbolo “*” indica que existe diferença significativa entre os valores de produção de lipase entre os dois grupos ($p < 0,05$) 80
- Figura 20:** Produção de biofilme avaliada em isolados clínicos de *C. rugosa* (grupos I, II e III). As barras representam o desvio padrão do ensaio realizado em triplicata 82
- Figura 21:** Distribuição dos 45 isolados de *C. rugosa* segundo a produção de biofilme, expressa de acordo com a leitura da Absorbância a 570nm de comprimento de onda 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados clínicos de <i>Candida rugosa</i> selecionados neste estudo.	29
Tabela 2: Valores de ponto de corte sugeridos para interpretação dos testes de susceptibilidade de leveduras.	52
Tabela 3: Identificação e características morfológicas das cepas de <i>C. rugosa</i> em meio sabouraud (macromorfologia), coloração no meio CHROMagar e micromorfologia em ágar-fubá.	56
Tabela 4: Dados referentes ao sequenciamento da região ITS (rDNA).	68
Tabela 5: Aspecto geral das propriedades fenotípicas dos isolados clínicos de <i>C. rugosa</i> , distribuídas em três grupos caracterizados por diferentes desfechos clínicos dos pacientes.	84
Tabela 6: Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) apresentadas pelos isolados de <i>C. rugosa</i> deste estudo	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs: Absorbância	NCBI: National Center for Biotechnology Information
ATCC: American Type Culture Collection	ng: Nanograma
BSA: Bovine Serum Albumin	ng/ μ L: Nanograma por microlitro
C.: <i>Candida</i>	NGY: Neopeptone – yeast extract - glucose
CIM: Concentração Inibitória Mínima	nm: Nanômetro
cm: centímetro	nmol: Nanomol
CVC: Cateter venoso central	P: Probabilidade de um evento ocorrer ao acaso
DNA: Ácido desoxirribonucléico	PBS: Salina Fosfatada Tamponada
dATP: desoxiadenosina trifosfato	pH: Potencial hidrogeniônico
dCTP: desoxicitosina trifosfato	pmol: Picomol
dGTP: desoxiguanosina trifosfato	pNP: p- nitrofenol
dTTP: desoxitimidina trifosfato	pNPL: laurato de p-nitrofenil
dNTP: Desoxinucleosídeo	ppm: partes por milhão
DO: Densidade óptica	Pz: Zona de fosfolipase
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético	®: marca registrada.
et al: Colaboradores	RNA: Ácido ribonucleico
g: Gramas	RNase: Ribonuclease
GPYA: Glucose peptone yeast extract agar	rpm: rotações por minuto
HCl: Ácido clorídrico	SAP: proteinase aspártica secretada
ICS: Infecções de corrente sanguínea	SDA: Sabouraud Dextrose Agar
L: litro	SDD: susceptibilidade dose dependente
M: Molar	spp.: espécie
mA: mili Amperagem	TAE: Tris acetato EDTA
mm: milímetro	TCA: Ácido tricloroacético
mM: Milimolar	™: <i>Trade mark</i>
μ g/mL: micrograma por mililitro	UFC: unidade formadora de colônia
MgCl ₂ : Cloreto de magnésio	umol: micromol
mg: Miligrama	UPGMA: “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”
mg/mL: Miligrama por mililitro	UV: Ultra violeta
mg/L: Miligrama por litro	V: (volts) unidade de corrente elétrica
μ L: Microlitro	YEPD: <i>Yeast extract peptone dextrose</i>
mL: Mililitro	YCB: Yeast Carbon Base
MOPS: ácido morfolinopropanosulfônico	
Nº: Número	
NaCl: Cloreto de sódio	

Terçarioli, Gisela Ramos

Comparação genotípica e fenotípica de diferentes isolados clínicos de colonização e candidemia por *Candida rugosa*. / Gisela Ramos Terçarioli - São Paulo, 2009.
xx 130f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia.

Título em inglês: Genotypic and phenotypic comparisons among different clinical isolates of colonization and candidemia by *Candida rugosa*.

1. *Candida rugosa* 2. Virulência 3. Genotipagem.

RESUMO

Introdução: *Candida rugosa* é um patógeno emergente que merece destaque pela sua maior ocorrência em países da América Latina. Esta levedura tem o potencial de colonizar e causar infecções de corrente sanguínea no homem, bem como de apresentar resistência a diversos antifúngicos, principalmente aos azólicos. **Objetivos:** comparar caracteres fenotípicos, como atributos de virulência e sensibilidade antifúngica, além de realizar identificação e tipagem molecular de isolados clínicos de *C. rugosa* obtidos de pacientes que desenvolveram candidemia, com cepas isoladas de pacientes que foram somente colonizados por esta espécie, sem desfecho de candidemia na internação. Também foi de nosso interesse avaliar tais diferenças entre as cepas provenientes de pacientes internados ao longo de dois períodos avaliados: 1995/96 e 2001/02. **Material e Métodos:** As cepas foram caracterizadas fenotipicamente quanto a fatores de virulência, incluindo a produção de enzimas extracelulares (proteínase, fosfolipase e lipase) e a formação de biofilme. Foram realizados teste de susceptibilidade a cinco antifúngicos pelo método de microdiluição em caldo, sendo eles: anfotericina B, fluconazol, voriconazol, caspofungina e anidulafungina. Para confirmação de espécie e avaliação de variabilidade genotípica, foram utilizadas as técnicas moleculares de RAPD, microssatélite e sequenciamento da região ITS (rRNA). **Resultados:** Observou-se grande variabilidade nos resultados referentes à produção de enzimas hidrolíticas. A população foi classificada, no geral, como baixa produtora de proteínase, não produtora de fosfolipase e baixa e média produtora de biofilme. A produção de lipase foi o único fator de virulência expresso de maneira considerável pelos isolados clínicos, destacando-se a alta produção desta enzima por cepas isoladas de sangue, sugerindo a importância da mesma no estabelecimento de infecção por *C. rugosa*. Com relação à sensibilidade aos antifúngicos, os isolados mostraram-se sensíveis a todas as drogas, exceto ao fluconazol. A avaliação dos resultados obtidos por 3 diferentes métodos moleculares demonstrou alto relacionamento filogenético entre os isolados clínicos, exceto pela cepa de referência a qual foi sempre posicionada em diferente cluster. A análise genotípica revelou similaridade de 90,5% entre todos os isolados, e de 87% para a cepa de referência ATCC1051 pela técnica de RAPD, e uma similaridade de 92% entre os isolados clínicos e de 86,5% para a cepa controle pelo método de microssatélite. O sequenciamento da região ITS identificou todos os isolados como sendo *C. rugosa*, apresentando uma identidade que variou de 89% a 93% para os isolados clínicos, e 99% para a cepa de referência ATCC10571. **Conclusões:** Não foi possível estabelecer uma correlação direta entre a expressão de todos os fatores fenotípicos avaliados e o desfecho clínico dos pacientes, embora haja evidências importantes da atividade de lipase influenciando candidemia por *C. rugosa*. Sugere-se que houve uma disseminação clonal dos isolados de *C. rugosa* no ambiente hospitalar avaliado ao longo de vários anos. Adicionalmente, as diferenças genéticas encontradas entre os isolados clínicos e a cepa de referência ATCC10571, juntamente com algumas diferenças fenotípicas observadas exclusivamente nesta cepa, tais como alta produção de biofilme, macromorfologia acentuadamente rugosa e baixa atividade de lipase, indicam a possibilidade de heterogeneidade do táxon *C. rugosa*.

ABSTRACT

Introduction: *Candida rugosa* is an emergent pathogen recognized by its higher occurrence in Latin American countries. This yeast has the ability to colonize and cause human bloodstream infections as well as to show resistance to several antifungal drugs, specifically to azoles. **Objectives:** To compare phenotypic properties such as virulence attributes and antifungal susceptibility, as well as to perform molecular identification and typing of *C. rugosa* clinical isolates obtained from patients who were either colonized or developed candidemia due to this species during the hospitalization period. We were also interested in evaluating such differences among strains isolated across two different periods: 1995/96 and 2001/02. **Material and Methods:** The strains were phenotypically characterized according to virulence factors, including the production of extra cellular enzymes (protease, phospholipase and lipase) and biofilm formation. We performed susceptibility testing to 5 antifungal drugs by using broth microdilution: amphotericin B, fluconazole, voriconazole, caspofungin and anidulafungin. To confirm identification to the species level and evaluate genetic variability, we have employed RAPD, microsatelite and rDNA ITS region sequencing. **Results:** Phenotypic properties varied considerably among the isolates, specifically regarding to hydrolytic enzymes production. Most of the isolates were low proteinase producers. The strains were phospholipase negative and showed a not very expressive biofilm formation in general. Nevertheless, lipase production was the only virulence factor considerably expressed by the clinical isolates, specifically by blood strains, suggesting the importance of this attribute in *C. rugosa* infection. The strains were sensitive to all the antifungal drugs tested, except fluconazole. The clinical isolates were highly related as determined by 3 different methods. However the control strain ATCC10571 was considered genotypically very different. Our isolates were 90.5% similar among them and 87% similar to *C. rugosa* control strain as determined by RAPD, and 92% similar among them and 86,5% similar to ATCC10571, as determined by microsatelite. All the isolates were identified as *C. rugosa* by ITS region sequencing. The percentage of similarity ranged from 89% to 93% for the clinical isolates, and 99% to *C. rugosa* ATCC10571. **Conclusions:** It was not possible to establish a direct relationship between the expression of all virulence properties and patients clinical outcomes. However there is mounting evidence that lipase activity influences candidemia due to *C. rugosa*. It is possible that clonal dissemination in the hospital environment have occurred throughout several years. In addition, the genetic differences found between our isolates *C. rugosa* control strain ATCC10571, together with the phenotypic differences observed, such as higher biofilm formation and rough colony morphology, as well as low lipase activity for this control strain, suggest the genetic heterogeneity among the taxon *C. rugosa*.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções de corrente sanguínea por *Candida* spp.: impacto em saúde pública

Nas últimas três décadas, houve um aumento significativo na ocorrência de infecções de corrente sanguínea pelo gênero *Candida* em diversos hospitais de todo mundo. Este fato tem sido comumente observado em pacientes imunocomprometidos, ou que estejam hospitalizados, particularmente aqueles submetidos ao uso de antibioticoterapia prolongada, terapia imunossupressora, nutrição parenteral e exposição a procedimentos médicos invasivos (Pfaller et al., 2007^a; Pappas, et al., 2006). Neste cenário, tem sido comum o aparecimento de infecções invasivas por microrganismos até então pouco conhecidos e de aparente baixa patogenicidade (Mekha et al., 2007; Lunardi et al., 2006; Pfaller et al., 2006^a).

Dados epidemiológicos a respeito da incidência e mortalidade atribuída à candidemia estão associados a diversos fatores, tais como as características da população de risco, o padrão das instalações disponíveis em cada centro médico, a disponibilidade financeira de cada país para o tratamento da doença, a distribuição das espécies de *Candida* e a sua prevalência de resistência aos antifúngicos. Portanto, informações epidemiológicas disponíveis para um determinado centro ou região geográfica talvez não possam ser aplicadas para outras (Mokaddas et al., 2007).

Diversos estudos apontam o gênero *Candida* como sendo um importante agente de infecções invasivas hospitalares. Geralmente, *Candida*

spp. estão entre os 10 agentes mais comuns causadores de infecções de corrente sanguínea (ICS), respondendo por 4 a 9% em frequência de isolamento em hemoculturas, quando comparadas com outros agentes (Doshi et al., 2009; Blot et al., 2008; Bouza et al., 2008).

Wisplinghoff et al. (2004) em um estudo realizado entre março de 1995 a setembro de 2002, em 49 hospitais nos Estados Unidos da América (EUA), coletaram 24.179 casos de ICS nosocomial e demonstraram que o gênero *Candida* foi o 4º agente mais comumente isolado em hemoculturas, respondendo por 9% das infecções de corrente sanguínea, posicionando-se apenas atrás dos casos de bacteremia por *Staphylococcus* coagulase-negativo (31%), *Staphylococcus aureus* (20%) e *Enterococcus* spp. (9%). Em outro estudo realizado no setor pediátrico de um hospital terciário da Finlândia, que identificou 739 casos de ICS durante um período de 8 anos (1999-2006), revelou-se que o gênero *Candida* foi o terceiro agente mais isolado em hemoculturas (6%), ficando atrás dos patógenos *Staphylococcus* coagulase-negativo (52%) e *Staphylococcus aureus* (20%) (Sarviki et al., 2008).

A infecção de corrente sanguínea nosocomial pelo gênero *Candida* destaca-se não apenas por sua prevalência em diferentes centros médicos, como também por suas complicações, apresentando altas taxas de mortalidade atribuída da ordem de 50% (Mitt et al., 2009; Acar et al., 2008; Pfaller et al., 2007^a; Colombo & Guimarães, 2003). Além disso, a candidemia é difícil de ser diagnosticada, difícil de tratar e aumenta consideravelmente o custo de hospitalização (Morgan et al., 2005).

Dados referentes a incidência de candidemia em países da América Latina são ainda escassos. No Brasil, um estudo realizado por Colombo et al. (2006) em onze centros hospitalares brasileiros distribuídos em nove cidades de grande porte situadas nas regiões sul, centro-oeste e sudeste, no período de março de 2003 a dezembro de 2004, relatou 712 casos de candidemia. Neste trabalho, verificou-se que a incidência de candidemia era de 2.49 casos por 1.000 admissões, taxa esta de 2 a 15 vezes maior de que as reportadas em centros hospitalares do Hemisfério Norte, tais como os Estados Unidos (0,28 a 0,96 por 1.000 admissões), Canadá (0,45 por 1.000 admissões) e Europa (0,20 a 0,38 por 1.000 admissões).

Em outro trabalho realizado em 4 centros médicos pertencentes à cidade de São Paulo, a taxa de incidência de candidemia foi de 1.66 casos por 1.000 admissões, que, embora seja menor do que a taxa verificada no estudo anterior, ainda caracteriza-se por ser alta quando comparada com países da América do Norte e Europa (Colombo et al., 2007).

1.2 Aumento de espécies de *Candida* não-*Candida albicans* como agentes de candidíase hematogênica

Embora *C. albicans* seja o agente etiológico mais comum em candidemia, nos últimos anos acredita-se ter havido um decréscimo global no seu isolamento. Em contrapartida, o aumento de infecções da corrente sanguínea por espécies de *Candida* não-*Candida albicans* parece ser uma

tendência global (Pfaller et al., 2007^a; Colombo et al., 2006; Almirante et al., 2005), sendo cada vez mais comuns relatos de taxas de isolamentos em torno de 50% de *Candida* não-*Candida albicans* nos episódios de candidemia (Bouza et al., 2008; Shorr et al., 2007; Passos et al., 2007; Bassetti et al., 2006)

Mais de 17 espécies de *Candida* já foram descritas como agentes causadores de fungemia, contudo a maior parte dos casos são atribuídos a 5 espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Contudo, a taxa de isolamento de espécies previamente consideradas raras, tais como *C. kefyr*, *C. famata*, *C. guilliermondii* e *C. rugosa*, tem aumentado em uma ordem de 2 a 10 vezes nos últimos anos, sendo estas duas últimas espécies particularmente comuns na América Latina (Lai et al., 2008; Pfaller et al., 2007^a).

O motivo pelo qual tem ocorrido aumento de infecções fúngicas por espécies de *Candida* não-*Candida albicans* é ainda pouco conhecido. Certamente a melhoria nas técnicas de identificação de leveduras tem tido um importante papel para este aumento, entretanto, vários autores sugerem que este fenômeno seja decorrente da combinação de diferentes variáveis, incluindo pressão seletiva de antifúngicos, aumento de pacientes portadores de diferentes doenças degenerativas e neoplasias e, finalmente, a maior utilização de procedimentos invasivos (Pfaller et al., 2007^a; Nucci & Marr, 2005; Colombo et al., 1999).

O entendimento do processo que leva à fungemia por espécies de *Candida* não-*Candida albicans* é de especial interesse. Primeiramente, é fundamental a caracterização de fontes, reservatórios e meios de transmissão

de espécies de *Candida* não-*Candida albicans* para que seja possível o estabelecimento de medidas de controle e prevenção de infecções causadas por estes agentes. Além disso, em relação à terapêutica, tais espécies podem apresentar baixa susceptibilidade aos antifúngicos de uso sistêmico, tal como ocorre com espécies com sensibilidade reduzida aos azólicos, o que dificulta o tratamento do paciente (Magill et al., 2009; Colombo & Guimarães, 2003).

Estudos em hospitais de diferentes partes do mundo mostram variações regionais no padrão de distribuição de espécies de *Candida*. Neste contexto, percebe-se que em países da América Latina há predomínio de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* relacionadas à candidemia, sendo menos comum a ocorrência de fungemias por *C. glabrata*. Por outro lado, nos EUA e muitos países da Europa, onde o uso profilático do fluconazol é uma prática bem estabelecida há muito tempo, observa-se o predomínio de *C. glabrata* entre as fungemias por espécies de *Candida* não- *Candida albicans* (Brito et al., 2006; Colombo et al., 2006; Almirante et al., 2005; Morgan, 2005; Tortorano et al., 2004; Godoy et al, 2003; Goldani et al., 2003).

1.3 *Candida rugosa* como patógeno emergente e resistente a drogas antifúngicas

Candida rugosa tem sido descrita como um microrganismo colonizante e também patogênico para muitas espécies de animais. *C. rugosa* foi originalmente isolada de fezes humanas em 1917 e denominada de

Mycoderma rugosa (Moretti et al., 2000). Desde então, esta espécie tem sido frequentemente associada a casos de mastite bovina, que é uma das doenças veterinárias mais importantes que acometem rebanhos de vacas leiteiras (Richard et al., 1980) e raramente como agente causador de mastite purulenta em éguas (Giorgi et al., 1986).

Atualmente, *C. rugosa* vem sendo citada como um patógeno humano emergente, comumente associado a surtos de caráter endêmico a determinadas instituições (Pfaller et al., 2007^a; Nucci & Marr, 2005). O primeiro caso de candidemia por essa espécie foi reportado em 1985, no qual, culturas positivas de *C. rugosa* foram obtidas em amostras de sangue e de cateter intravenoso de um paciente (Reinhardt, et al., 1985). Neste mesmo ano, *C. rugosa* foi isolada de amostras de sangue e escarro de dois pacientes imunocomprometidos numa instituição dos Estados Unidos (Sugar & Stevens, 1985). Desde o seu primeiro relato, *C. rugosa* tem sido citada em diversos outros estudos, ora surgindo de maneira casual e rara, ora de maneira mais expressiva e constituindo surtos.

Dube et al. (1994) relataram um surto de candidemia por *C. rugosa* em pacientes queimados, que posteriormente foi confirmado por um estudo de genotipagem com a técnica de *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) de acordo com Dib et al. (1996). Os autores observaram que desde o momento em que se implantou o uso de nistatina tópica nas feridas dos pacientes apresentando queimaduras, a aquisição de *C. rugosa* aumentou de 0,36% para 5,25% em admissões no período de utilização da nistatina, sugerindo uma pressão seletiva desta espécie. Os testes de susceptibilidade

dos 15 isolados de *C. rugosa* deste surto demonstraram resistência à nistatina e susceptibilidade moderada à anfotericina B e ao fluconazol.

O isolamento esporádico de *C. rugosa* tem sido reportado em diversos centros hospitalares de todo mundo. Ng et al. (1998) relataram a ocorrência de 7 culturas positivas para *C. rugosa* num estudo realizado na Malásia, sendo 3 de sangue, 2 de urina e 2 de pele. Posteriormente, estes mesmos autores relataram mais 7 casos de candidemia por *C. rugosa* entre os anos de janeiro de 1997 a outubro de 1999, número que correspondia a 4% das infecções fúngicas detectadas neste período (Ng et al., 2001).

Num outro estudo, a partir de 45 isolados de *Candida* não-*Candida albicans* provenientes de pacientes com câncer, somente um foi identificado como sendo *C. rugosa*. O isolamento de todas as cepas deste estudo estava relacionado ao tratamento profilático dos pacientes com fluconazol (Kremery et al., 1999).

Um caso de candidemia por *C. rugosa* também foi relatado em um recém-nascido de 27 dias de idade que fazia tratamento com hemodiálise (Hanzen et. al., 2002). Na Polônia, a partir de 161 cepas de fungos provenientes de pacientes com doença renal crônica, 2,48% eram de *C. rugosa*, que curiosamente apareceu com uma taxa de isolamento idêntica a de *C. tropicalis* (Drozdowska, 2007). A partir de um estudo ao longo de 3 anos (2004 a 2007) realizado no México, constituído por 398 isolados de hemocultura, somente duas cepas de *C. rugosa* foram obtidas, revelando a raridade da ocorrência desta espécie neste país (González et al., 2008).

Também houve relatos de colonização por *C. rugosa* no trato respiratório superior e intestino de pacientes com leucemia. A quantidade de leveduras encontradas nesses pacientes excedeu os limites existentes em pessoas saudáveis, e a colonização foi associada com futuras complicações de infecções fúngicas (Fedorovskaia et al., 2008).

Pfaller et al. (2006^a) coletaram dados do ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, reunindo 452 isolados clínicos de *Candida rugosa* e seus respectivos dados sobre susceptibilidade ao fluconazol e voriconazol. *C. rugosa* contabilizou 0,4% dos 134.715 isolados de *Candida* spp. de 127 diferentes centros médicos do mundo inteiro. Foi possível verificar que a frequência de isolamento desse agente aumentou de 0,03% para 0,4% durante o período de estudo de 6,5 anos, sendo este aumento especialmente verificado na América Latina. Foi observada uma baixa susceptibilidade de *C. rugosa* ao fluconazol (40,5% de susceptibilidade) em isolados de todas as regiões geográficas. Cepas provenientes da Europa e América do Norte foram muito mais susceptíveis (97 a 100%) ao voriconazol do que as que foram isoladas da Ásia e América Latina (55,8 a 58,8%). Tais dados sugerem que *C. rugosa* pode ser uma espécie de *Candida* com reduzida susceptibilidade aos antifúngicos azólicos, tais como *C. krusei* e *C. glabrata*. Este fato, além da variação regional de susceptibilidade ao voriconazol, justifica ainda mais o conhecimento da biologia deste patógeno.

No Brasil, existem alguns relatos de isolamento de *C. rugosa*. Vital et al. (2002) isolaram 7 cepas de *C. rugosa* de amostras de solo da região

amazônica em Roraima, o que mostra que o solo é possivelmente um dos nichos que esta levedura pode ocupar.

A primeira referência importante sobre a atuação desta levedura como patógeno foi realizada por Colombo et al. (2003), onde relatou-se um surto de candidemia por *C. rugosa* em seis pacientes internados em um hospital terciário na cidade de São Paulo, num período de quatro meses. Embora a fonte do surto não tenha sido identificada, foi possível averiguar que havia relacionamento genético entre os seis isolados, confirmado por meio da técnica de tipagem por RAPD. Neste surto, verificou-se que todos os pacientes haviam sido expostos a procedimentos médicos invasivos, incluindo o uso de cateter intravenoso, cirurgias ou diálises. Embora os isolados testados apresentassem susceptibilidade *in vitro* à anfotericina B, fluconazol e 5-flucitocina, quatro pacientes submetidos ao tratamento com anfotericina B, bem como um paciente não tratado, foram a óbito.

Em outro estudo realizado por um período de 18 meses (2001/2002) no mesmo hospital do surto previamente descrito, a partir de um total de 349 pacientes, foram identificados 100 indivíduos colonizados por *C. rugosa*, dos quais 14 desenvolveram candidemia por este agente. A análise multivariada revelou associação entre candidemia por *C. rugosa* e tempo de internação, colonização prévia em região pericater venoso central, tempo de sondagem vesical e tempo de nutrição enteral (Rosas et al., 2004). Este mesmo hospital foi o local de isolamento de mais 24 de um total de 25 cepas de *C. rugosa*, que foram coletadas em um estudo realizado em 4 hospitais da cidade de São Paulo, nos períodos de março de 2002 a fevereiro de 2003.

Dentre estes isolados, 16% foram resistentes ao fluconazol e 40% apresentaram susceptibilidade dose dependente à esta droga antifúngica (Colombo et al., 2007). Esta série de isolamentos clínicos reportados ao longo do tempo em um mesmo centro médico demonstra que *C. rugosa* é um agente patogênico capaz de se adaptar ao ambiente hospitalar e causar episódios frequentes de candidemia.

Um estudo multicêntrico realizado na cidade de São Paulo entre os anos de 1995 e 2003, com 1000 isolados de sangue de *Candida* spp., no qual testou-se a susceptibilidade a cinco tipos de antifúngicos diferentes em 25 isolados de *C. rugosa*, demonstrou que 44% e 32% das cepas apresentaram susceptibilidade dose-dependente para fluconazol e itraconazol, respectivamente (da Matta et al., 2007). Estes dados corroboram a idéia de baixa susceptibilidade aos azólicos para esta espécie.

Pires-Gonçalves et al. (2007) investigaram a diversidade de leveduras provenientes de amostras de cavidade oral de 175 pacientes com diabetes mellitus dependentes de insulina. Foram identificados 89 isolados de *Candida* spp., sendo que *C. albicans* representou 56% dessas amostras, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. rugosa* e *C. guilliermondii*. Testes de susceptibilidade ao fluconazol realizados com essas amostras revelaram 100% de resistência nos isolados de *C. rugosa*. Também foi verificada a ocorrência de 4 isolados desta espécie na microbiota da cavidade oral de crianças infectadas pelo vírus do HIV monitoradas pelo setor pediátrico de um hospital universitário de Campinas, o que reforça o caráter

oportunista desta levedura, bem como seu potencial de agente colonizador de seres humanos (Melo et al., 2009).

Além da aparente resistência aos azólicos, *C. rugosa* também tem sido previamente citada como um possível agente resistente a anfotericina B (Colombo et al., 2003) e com uma baixa susceptibilidade a caspofungina (Pfaller et al., 2006^b). Reforçando esta idéia, um estudo realizado na Coréia do Sul com dois isolados de *C. rugosa* relatou valores altos da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de anfotericina B pela metodologia do Etest, sendo 0.75 e 1 ug/mL, respectivamente. Estes autores sugeriram que esta metodologia possui maior poder discriminatório para evidenciar leveduras com suscetibilidade reduzida à essa droga (Park et al., 2008).

Em contrapartida, embora estudos *in vitro* apontem que *C. rugosa* possa ter baixa sensibilidade à anfotericina B, pesquisas realizadas *in vivo* indicam que esta droga pode ser utilizada no tratamento para infecção por *C. rugosa*, uma vez que ela foi capaz de diminuir os focos de infecção nos órgãos das cobaias testadas, bem como aumentar a sobrevivência dos camundongos infectados por essa levedura. O mesmo foi observado com relação ao voriconazol e ao posaconazol, sendo estas drogas aparentemente efetivas contra esse agente (Hernandez et al., 2004; Pfaller et al., 2003).

Recentemente, foi descrita uma nova espécie de *Candida* denominada *Candida pseudorugosa*. Dois isolados obtidos de amostras de escarro de um mesmo paciente foram inicialmente identificados como *C. albicans* e *C. tropicalis*, baseados em suas colorações em meio CHROMagar. Testes bioquímicos subsequentes utilizando-se o API 20C AUX identificaram

tais isolados como *Candida rugosa*. O sequenciamento do domínio D1/D2 da região 26S do rDNA revelou 4,7% de diferenças entre estes isolados e *C. rugosa*, enquanto que a região ITS, revelou 20,4% de diferenças em relação ao alinhamento das bases das sequências de DNA. Por conseguinte, tais amostras foram consideradas como uma nova espécie, *C. pseudorugosa*, a qual seria filogeneticamente relacionada à *C. rugosa*. Notoriamente, estes dois isolados pertencentes a esta nova espécie descrita mostraram-se resistentes a anfotericina B, caspofungina, itraconazol e nistatina, dose-dependente para o fluconazol e sensíveis a flucitocina e voriconazol (Li et al., 2006).

1.4 Fatores de virulência de *C. rugosa*

A literatura apresenta poucos dados sobre os atributos de virulência da espécie *C. rugosa*. Num estudo *in vivo* realizado por Richard et al. (1980), isolados de *C. rugosa* previamente isolados de glândulas mamárias infectadas de vacas leiteiras foram inoculados em glândulas mamárias de vacas saudáveis, causando infecção em 100% das glândulas inoculadas, com recuperação dos organismos após aproximadamente 7 dias da inoculação.

Em outro estudo realizado por Jensen et al. (1994), camundongos foram inoculados intravenosamente com 1×10^6 ou 1×10^7 células de *Candida rugosa* proveniente de vacas com mastite. Embora as cepas não tenham sido capazes de matar os animais infectados, observou-se a presença de necrose e infiltração de células inflamatórias nos tecidos renais, hepáticos e cardíacos,

demonstrando que os isolados de *C. rugosa* estudados podem apresentar virulência moderada. Este estudo corrobora a idéia de que leveduras consideradas pouco virulentas ao homem podem se tornar patogênicas de acordo com as condições imunológicas do hospedeiro, sendo possíveis causadores de doenças.

Como foi apresentado anteriormente, não há dados *in vitro* sobre atributos de virulência de *C. rugosa*. Da mesma forma, poucos dados são disponíveis sobre a história natural e infecção por este agente em modelos experimentais (Hernandez et al., 2004; Jensen et al., 1994; Richard et al., 1980). Tendo em vista a emergência de *C. rugosa* em centros médicos na América Latina e ocorrência de surtos no Brasil, justifica-se o interesse na caracterização dos fatores de virulência deste agente utilizando-se como modelo os estudos já realizados com *C. albicans*.

1.4.1 Enzimas hidrolíticas em *Candida* spp.

C. albicans ainda é a espécie responsável pela maioria das doenças fúngicas causadas pelo gênero *Candida* e também a mais virulenta em modelos animais de infecção disseminada. Além disso, esta espécie encontra-se com o genoma completamente sequenciado. Por esse motivo, seus fatores de virulência têm sido bastante estudados, tais como: transição levedura a hifa, adesão a células epiteliais e endoteliais do hospedeiro, bem como a materiais plásticos utilizados em procedimentos médicos invasivos

(produção de biofilmes), habilidade de escapar do ataque de células do sistema imunológico e a capacidade de secretar enzimas hidrolíticas (Schaller et al., 2005; Odds, 1994). Entretanto, investigações a respeito dos atributos de virulência de espécies de *Candida* não-*Candida albicans*, ainda são escassos, apesar de estes patógenos serem frequentemente relatados como causadores de doença.

C. albicans é capaz de secretar diversas enzimas hidrolíticas, tais como proteinases, fosfolipases e lipases, e todos estes atributos de virulência auxiliam o fungo na obtenção de nutrientes a partir das células do hospedeiro, auxiliando a levedura a invadir os tecidos do hospedeiro através da quebra das membranas celulares e matrizes extracelulares, bem como no escape aos mecanismos de defesa do organismo humano, garantindo ao patógeno uma habilidade ímpar de sobreviver e infectar vários sítios anatômicos com diferentes pressões ambientais (Fu et al., 1997).

Atividade proteolítica extracelular é um fator de virulência importante em *C. albicans* atribuído às proteinases aspárticas secretadas (SAPs), que são codificadas por uma família de pelo menos 10 genes que expressam 10 tipos de proteinases diferentes (SAP1-SAP10). Estas proteinases assumem papéis variados durante o processo de infecção no hospedeiro, uma vez que são diferencialmente expressas e reguladas. É sabido, por exemplo, que as SAP4-6 são produzidas quase que exclusivamente durante a formação de hifas e em pH neutro, e também são comumente associadas à infecção de mucosa vaginal. Por sua vez, SAP9 e SAP10, são constitutivamente expressas em todas as formas de crescimento

do patógeno. Durante as infecções sistêmicas, SAP2, SAP 4-6 e SAP9 são altamente expressas, sendo SAP2 expressa nos estágios mais tardios dessas infecções (Schaller et al., 2005).

As funções propostas para as proteinases durante a infecção incluem: digestão das proteínas do hospedeiro para suprimento nutricional, evasão do sistema imunológico humano através da degradação de imunoglobulinas e proteínas do complemento, bem como a aderência e degradação das barreiras do hospedeiro durante a invasão e resistência ao ataque antimicrobiano (Hube et al., 2001; Monod et al., 1994; Monod et al., 1998).

Genes homólogos aos genes SAPs também foram identificados em outras espécies de *Candida*. Utilizando-se a sonda SAP1DNA, foi possível identificar bandas no genoma de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*. Diferenças substanciais na especificidade de substratos em cada uma das proteinases produzidas pelas diferentes espécies também foram encontradas, tal como ocorre em *C. albicans* (Hrusková-Heidingsfeldová et al., 2009; Haynes, 2001).

A produção de proteinase por espécies de *Candida* não-*Candida albicans* já foi relatada em diversos estudos, particularmente em *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Contudo estas outras espécies geralmente caracterizam-se por apresentarem cepas não produtoras ou baixas produtoras de proteinase quando comparadas à *C. albicans* (Rorig et al., 2009; Gokce et al., 2007).

Produção de fosfolipase por *C. albicans* é considerada outro aspecto importante na virulência dessa levedura. Microscopia eletrônica e ensaios bioquímicos radioativos demonstraram que a atividade de fosfolipase nessa levedura está presente na superfície da célula leveduriforme, e é principalmente encontrada na extremidade de crescimento das formas filamentosas. Seu alvo fundamental são os fosfolípidos da membrana celular, os quais são hidrolisados levando a ruptura da membrana celular no momento da invasão tissular. Algumas funções para as fosfolipases durante a infecção têm sido postuladas, entre elas: penetração na célula do hospedeiro, adesão às células epiteliais e invasão de epitélio oral humano (Schaller et al., 2005; Banno et al., 1985).

A produção de fosfolipase, evidenciada através do cultivo em meio contendo gema de ovo (rico em fosfolípidos), também foi detectada em *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. krusei* (Kantarcioğlu & Yücel, 2002). Contudo, a produção desta enzima por espécies de *Candida* não-*Candida albicans* é, em sua maioria, baixa ou nula, independentemente do sítio de isolamento (da Costa et al., 2009; Mohan das & Ballal, 2008; Ghannoum, 2000).

Ibrahim et al. (1995) comparam a habilidade de cepas de *C. albicans* recuperadas do sangue de pacientes com isolados obtidos da cavidade oral de indivíduos saudáveis em produzirem fosfolipase. Estes isolados clínicos, com diferentes níveis de expressão de fosfolipase, foram também comparados quanto à sua virulência em modelo murino de candidíase disseminada. Nas amostras de sangue, foram observadas altas taxas de

produção de fosfolipase quando comparados às cepas comensais. Em modelo de infecção em camundongo, outros fatores de virulência foram avaliados em paralelo, entretanto, somente a atividade de fosfolipase foi preditora de mortalidade. Estes dados sugerem um envolvimento de fosfolipase no processo de invasão dos tecidos por *C. albicans*.

Considerando que 25% de todo conteúdo lipídico do estrato córneo humano é formado por triacilglicerol, espera-se que fungos patogênicos secretem lipases para conseguirem infectar o hospedeiro. Pouca atenção tem se dado para o papel das lipases em virulência. Contudo, um estudo revelou que a produção de lipases em 85 isolados de *Candida* spp. foi crucial no crescimento das leveduras em determinadas condições específicas, embora o papel fisiológico dessas lipases não tenham sido completamente esclarecidos (Tsuboi et al., 1996).

Dez genes que codificam lipases em *C. albicans* (*LIP1-LIP10*) já foram reportados, os quais são diferencialmente regulados e expressos de acordo com o estágio de infecção do paciente. Além disso, um recente estudo utilizando modelos experimentais demonstrou que mutantes deficientes para o gene *LIP8* foram significativamente menos virulentos em modelos de infecção em camundongos, indicando claramente que o produto expresso pelo gene *LIP8* é um importante fator de virulência em *C. albicans* (Gácsér et al., 2007^a). Também foi verificado que mutantes não produtores de lipase de *C. parapsilosis*, cuja expressão dos genes *LIP1* e *LIP2* foram suprimidas, mostraram-se menos virulentos em modelos de infecção intraperitoneal em

murinos, além de se tornarem mais suscetíveis à ação destrutiva dos macrófagos (Gácsér et al., 2007^b).

Embora as atividades de proteinase e fosfolipase ainda não tenham sido amplamente estudadas em *C. rugosa*, sabe-se que esta levedura é um grande produtor de lipase, o que torna de fundamental importância investigar se a produção desta enzima apresenta potencial patogênico para esta espécie. Lipases de *C. rugosa* foram descritas pela primeira vez nos anos sessenta, através do isolamento da levedura de amostras de solo. Subsequentemente, duas isoenzimas chamadas de LipA e LipB foram identificadas, purificadas e caracterizadas. Atualmente, pelo menos sete genes foram descritos como envolvidos no maquinário produtor de lipase por *C. rugosa*, sendo cinco deles completamente caracterizados bioquimicamente (de Maria et al., 2005).

1.4.2 Formação de biofilme

C. albicans, bem como algumas outras espécies de *Candida*, possui a capacidade de formar biofilme, característica esta fortemente associada à capacidade de causar infecção, sendo considerada como um importante determinante de virulência em *Candida* spp. (Donlan & Costerton, 2002).

Os biofilmes são estruturas complexas formadas de microrganismos aderidos a superfícies sólidas de natureza biótica ou abiótica. Os organismos encontram-se envolvidos em uma densa matriz de substância polimérica extracelular (EPS), cujas células possuem taxas de crescimento e fenótipos alterados. Esta matriz de EPS pode ser composta de populações que se desenvolvem a partir de uma única espécie ou de uma comunidade derivada de múltiplas espécies microbianas (Adam et al., 2002). Algumas vantagens da formação do biofilme incluem: proteção dos microrganismos contra as agressões geradas pelo meio ambiente, disponibilidade de nutrientes, cooperação metabólica e aquisição de modificações genéticas (Douglas, 2002).

Há evidências de que células do biofilme formado sobre materiais implantados estejam sendo constantemente liberadas para a corrente sanguínea, garantindo o sucesso do estabelecimento da infecção. Desta forma, as células do biofilme possuem maior resistência à terapia antifúngica e maior capacidade de escapar das defesas imunes do hospedeiro (Ramage et al., 2006).

Além disso, um estudo de coorte retrospectivo onde foram avaliados os fatores de risco para mortalidade em pacientes com candidemia durante um período de 5 anos (2000 a 2004), revelou que pacientes infectados por isolados de *Candida* produtores de biofilme tinham maior taxa de mortalidade do que pacientes infectados por isolados não produtores (75% versus 45.7% respectivamente). Tais resultados atentam para o fato de que a formação do biofilme pode ser um fator preditivo de mortalidade em pacientes com candidemia (Tumbarello et al., 2007).

Candida spp. diferem entre si com relação à habilidade de formação de biofilme, bem como na composição do mesmo, com variações na morfologia, composição da EPS e resistência aos antifúngicos (Seneviratne et al., 2008).

Shin et. al (2002) compararam a capacidade de formar biofilmes em isolados sanguíneos de sete diferentes espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, entre outras) e com as mesmas espécies isoladas em diferentes sítios anatômicos, utilizando meio contendo glicose. Foi observado que em comparação às espécies de *Candida* não-*Candida albicans* (61%), *C. albicans* foi capaz de produzir menos biofilme (8%). Entre os isolados de *Candida* não-*Candida albicans*, cepas de sangue produziram mais biofilme (79%) do que aquelas obtidas de outros sítios do paciente (52%). Esses dados sugerem uma associação entre a capacidade de *Candida* spp. em produzir biofilme e um maior potencial desses isolados para causar fungemia relacionada a cateter venoso central (CVC) em pacientes sob administração de nutrição parenteral total (NPT).

De acordo com Hasan et al (2009), a habilidade de uma amostra em formar biofilme é uma característica inerente à espécie de *Candida* envolvida. Neste estudo, *C. albicans*, *C. lusitaniae* e *C. krusei* foram descritas como as espécies que mais produziram biofilme. Além disso, houve uma correlação entre o grau de formação de biofilme *in vitro* com a virulência observada em modelos experimentais com camundongos, uma vez que os animais infectados por isolados com baixa ou nenhuma formação de biofilme

tiveram maior sobrevivência do que os infectados com cepas altamente produtoras de biofilme.

Não existe nenhum dado na literatura investigando a habilidade de *C. rugosa* em formar biofilme, tornando inédita a nossa investigação.

1.5 Métodos de genotipagem em *Candida* spp.

Dentre as técnicas moleculares correntemente utilizadas no estudo de identificação e genotipagem do gênero *Candida* pode-se citar: RAPD (amplificação randômica de DNA polimórfico), análise de micro e minissatélite, cariotipagem com eletroforese em campo pulsátil (pulsed field gel electrophoresis–PFGE), análise de fragmentos de restrição de DNA e hibridação com sondas específicas de DNA, análise das sequências de nucleotídeos de genes ribossômicos, e, mais recentemente, Multilocus Sequence Typing - MLST (Tavanti et al., 2005; Sader et al., 1995).

O RAPD é uma técnica que se baseia na amplificação de segmentos de DNA utilizando-se oligonucleotídeos contendo cerca de 10 pares de bases escolhidos aleatoriamente. O número de sítios de ligação e a localização dos *primers* variam entre as cepas e produzem vários fragmentos de DNA que são separados em gel de agarose por eletroforese, sendo este um método simples, rápido e que apresenta grande poder discriminatório inter e intraespecífico (Walczak et al., 2007; Power, 1996).

Outra ferramenta molecular utilizada para tipagem de espécies de *Candida* é a análise de polimorfismos de microssatélites, que são sequências relativamente pequenas repetidas em *tandem* ao longo de todo o genoma. O polimorfismo dos microssatélites manifesta-se como diferenças nas unidades repetidas presentes nos alelos, sendo facilmente determinado por técnica de PCR (Walczak et al., 2007; Sampaio et al., 2005). O *primer* GACA₄ é amplamente empregado na diferenciação entre as espécies de dermatófitos, bem como na diferenciação intraespecífica dos mesmos, revelando-se como uma excelente ferramenta de tipagem molecular para fungos (Shehata et al., 2008).

A comparação direta de seqüências de nucleotídeos é um método objetivo para a resolução dos problemas de taxonomia e identificação de fungos de interesse médico. Para este tipo de abordagem as sequências mais conservadas e espécies-específicas são representadas por genes ribossomais (rDNA). Estes genes possuem regiões muito conservadas, alternadas por regiões variáveis, representadas, por exemplo, pelos genes espaçadores transcritos internos (internal transcriber spacer – ITS), ideais para comparações interespecíficas (Ciardo et al., 2006; Sugita, et al., 2002)

2.0 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- I. Confirmar a identificação dos isolados de *C. rugosa* por meio do sequenciamento da região ITS do rDNA, bem como avaliar a relação filogenética entre os mesmos, numa tentativa de detectar variabilidade genética deste táxon.
- II. Avaliar a similaridade genética das cepas através de tipagem molecular por RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) e Microssatélite, comparando os isolados obtidos nos anos de 1995/96 com os de 2001/02.
- III. Caracterizar fatores de virulência em *C. rugosa* através da determinação da atividade das enzimas extracelulares fosfolipase, proteinase e lipase, bem como pela avaliação da capacidade de produção de biofilme destes isolados.
- IV. Avaliar o perfil de susceptibilidade à Anfotericina B, Fluconazol, Voriconazol, Caspofungina e Anidulafungina em amostras clínicas colhidas em 1995/96 e 2001/02.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção das cepas

Foram selecionadas cepas de *C. rugosa* isoladas durante um estudo de coorte longitudinal envolvendo pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva (UTI) de um Hospital Terciário na cidade de São Paulo, no qual se estudou por 18 meses a dinâmica de colonização/infecção invasiva por leveduras do gênero *Candida* (Rosas *et al.*, 2004). Ao longo deste período foram isoladas mais de 2.000 leveduras em diferentes sítios nos pacientes analisados, amostras estas identificadas em nível de espécie e imediatamente congeladas e armazenadas em freezer a -70°C no banco de leveduras do Laboratório Especial de Micologia (LEMI), Disciplina de Infectologia, Escola Paulista de Medicina – UNIFESP.

Para o presente estudo, foram selecionadas 36 cepas de *C. rugosa* pertencentes ao banco de microorganismos acima descrito, obtidas nos anos de 2001/2002, provenientes de pacientes com idade e APACHE II score conhecidos. Além disso, foram incluídas 6 cepas provenientes de 6 pacientes que desenvolveram candidemia por *C. rugosa*, com idade variando entre 48 e 79 anos e cujo APACHE II score não foi informado. Estes pacientes pertenciam a um surto ocorrido por esta espécie no mesmo Hospital entre novembro de 1995 e fevereiro de 1996, relatado por Colombo *et al.* (2003).

Por conseguinte, este estudo foi realizado com um total de 42 amostras clínicas de *C. rugosa*, as quais foram divididas em três grupos distintos, de acordo com o desfecho clínico dos pacientes, a saber:

Grupo I: pacientes com colonização persistente, sem desenvolvimento de fungemia ao longo de sua internação;

Total de 19 cepas sequencialmente isoladas de 9 pacientes, 6 do sexo feminino e 3 do sexo masculino, com idade variando entre 53 e 65 anos, e APACHE II score variando entre 23 e 30 no momento da internação (Tabela 1).

Grupo II: pacientes com colonização persistente, desenvolvimento de fungemia ao longo da internação e evolução para alta hospitalar;

Total de 5 cepas sequencialmente isoladas de 3 pacientes, 2 do sexo feminino e 1 do sexo masculino, idade variando entre 43 e 66 anos, com APACHE II score entre 27 e 31 no momento da internação (Tabela 1).

Grupo III: paciente com colonização persistente, desenvolvimento de fungemia ao longo da internação e evolução a óbito a despeito de tratamento antifúngico;

Total de 18 cepas sequencialmente isoladas de 10 pacientes, 6 do sexo masculino e 4 do sexo feminino, idade variando entre 40 e 79 anos, com APACHE II score entre 23 e 35 (Tabela 1).

Para efeito comparativo, além destes isolados clínicos, foram incluídas uma amostra proveniente da “American Type Culture Collection” (*Candida rugosa* ATCC 10571) e duas amostras de *C. rugosa* isoladas do sangue de um paciente pertencente a um Hospital Terciário do Rio de Janeiro, como controles externos.

Tabela 1: Isolados clínicos de *Candida rugosa* selecionados neste estudo.

Paciente (idade)	APACHE	Nº do banco	Sítio de isolamento	Ano da Coleta	Desfecho Clínico
Paciente 1 (53)	29	945 A	Swab retal	2001/2002	Colonização
		968 B1	Urina		
		978 A1	Swab retal		
		1016 C	Secreção traqueal		
Paciente 2 (60)	29	530 C	Swab pericateter		
		535 C	Swab pericateter		
Paciente 3 (62)	30	581 A2	Swab retal		
Paciente 4 (63)	27	852 B2	Urina		
Paciente 5 (65)	26	4,5 A	Swab retal		
		9 B1	Urina		
Paciente 6 (59)	23	875 D	Swab pericateter		
		880 D	Swab pericateter		
		892 D2	Swab pericateter		
		903 D2	Swab pericateter		
Paciente 7 (60)	26	105 A1	Swab retal		
Paciente 8 (54)	25	145 D	Swab pericateter		
		157 C	Swab pericateter		
		165 C	Swab pericateter		
Paciente 9 (56)	24	300 A	Swab retal		
Paciente 10 (48)	35	565 D	Swab pericateter	2001/2002	Candidemia e alta
		573 D	Sangue		
Paciente 11 (66)	27	981 F	Sangue		
		955 D	Swab pericateter		
Paciente 12 (48)	-	107	Sangue	1995/1996	
Paciente 13 (48)	35	589 F	Sangue	2001/2002	Candidemia e óbito
Paciente 14 (64)	32	387A	Swab retal		
		412 A2	Swab retal		
		412 D	Swab pericateter		
		536 D	Swab pericateter		
		554 D2	Swab pericateter		
		577 D	Sangue		
Paciente 15 (66)	31	1130 D	Swab pericateter		
		1160.5	Sangue		
Paciente 16 (59)	24	686 F	Sangue		
		629 A2	Swab retal		
		656 A1	Swab retal		
Paciente 17 (54)	23	69 D	Sangue		
Paciente 18 (65)	-	61	Sangue	1995/1996	
Paciente 19 (73)	-	69	Sangue		
Paciente 20 (67)	-	70	Sangue		
Paciente 21 (79)	-	106	Sangue		
Paciente 22 (71)	-	154	Sangue		
Paciente 23	-	2683A	Sangue	Controle	-
	-	2683B	Sangue	Controle	-

3.2. Verificação de viabilidade, pureza e identificação fenotípica das leveduras armazenadas como *Candida rugosa*

Previamente aos experimentos, as cepas foram submetidas à verificação de sua pureza e viabilidade. Portanto, as células de levedura foram semeadas em meio ágar Sabouraud dextrose (SDA / Oxoid, Cambridge, UK) contendo cloranfenicol, com repiques sucessivos, com a finalidade de que os testes fossem realizados com culturas recentes.

Para a avaliação da pureza, as leveduras foram semeadas pela técnica de esgotamento, em placas de Petri (90x15 mm) descartáveis contendo meio CHROMagar *Candida*® (BD, NJ, USA), meio cromogênico seletivo, que permite a identificação de culturas mistas de leveduras. Após 48 horas de incubação a 37°C, as colônias foram identificadas por microcultivo em ágar Fubá (fubá 20 g/L; Agar Oxoid 10 g/L; Tween 80 5ml/L) e pelo perfil bioquímico através da utilização do kit comercial ID32C (BioMérieux, Etoile, França).

Com a finalidade de criar um banco de microrganismos próprio para este estudo, todas as amostras foram cultivadas em meio YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) por 24 horas à 30°C, estocadas em tubos de congelamento contendo 20% de glicerol e armazenadas em freezer -70°C.

3.3 Tipagem molecular

3.3.1 Extração do DNA e formação de protoplastos

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo de isolamento de Wash et al. (1994). Para este procedimento, uma colônia de *C. rugosa* foi crescida “overnight” em 5 mL de YEPD, sob agitação de 200 rpm e incubada a 30°C. Foi transferida, em seguida, alíquota de 1,3 mL da cultura para tubo de microcentrifugação de 1,5 mL, sendo o mesmo, centrifugado a 6000 rpm por 3 minutos. As células foram lavadas em 1 mL de água milli-Q e ressuspensas no agitador de tubos (vórtex).

Após nova centrifugação, o sobrenadante foi removido, as células homogeneizadas em 200 µL de tampão protoplasto (β -mercaptoethanol 10U/mL – Pharmacia -; 1:10 de Tris-HCl 1M, pH 7.4; 1:50 de EDTA 5M pH 8.0; Zymolyase 0.2 mg/mL - ICN Biomedicals -) e incubadas por 1h a 37°C em banho-maria. Posteriormente, 200 µL de tampão de lise (NaOH 10N, SDS 10% v/v, 1 mL água milli-Q) acrescido de 8µL de Proteinase K (20g/mL) foram adicionados à suspensão, sendo a mesma incubada a 65 °C por 20 minutos, e, em seguida, resfriada rapidamente no gelo. Para precipitar as proteínas e restos celulares, foram adicionados 200 µL de acetato de potássio (5M, pH 5,4) ao tubo, sendo o mesmo incubado no gelo por 15 minutos. A suspensão foi centrifugada em velocidade máxima por 3 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo de microcentrifugação.

Foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol (Merck & Co., Inc., NJ, USA) no tubo, misturado suavemente por inversão e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Após centrifugação em velocidade máxima por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado, sendo 1 mL de etanol 70% (Merck & Co., Inc., NJ, USA) adicionado ao precipitado, homogeneizado por inversão e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos e, novamente, centrifugado por 10 minutos em velocidade máxima.

A lavagem com etanol foi repetida, o precipitado seco por 10 minutos em fluxo laminar e o DNA dissolvido em 50 μ L de água milli-Q.

3.3.2 Tratamento do DNA com RNase

Para remoção do RNA e purificação do DNA, foram adicionados 48 μ L de água milli-Q, 1 μ L de Tris-HCl 1M pH 7,5 e 1 μ L de RNase A a 10 mg/mL (USB Corporation) nos tubos contendo o DNA extraído, e colocados em banho-maria a 37°C por 1h. O DNA foi precipitado com a adição de 10 μ L de acetato de sódio (NaOAc) 3M e 220 μ L de etanol absoluto gelado. A suspensão foi homogeneizada, incubada por 10 minutos no gelo e centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm. Após desprezar o sobrenadante, foram adicionados 500 μ L de etanol 80% (Merck & Co., Inc., NJ, USA) para remoção do sal e precipitação do DNA. O tubo foi novamente centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm, o etanol retirado e o precipitado seco durante 5 a 10 minutos em

fluxo laminar. A dissolução completa do “pellet” foi realizada em 50uL de água milli-Q.

3.3.3 Quantificação do DNA

Alíquotas de 5 uL de DNA foram diluídas em 1 mL de água milli-Q. Em seguida, a absorbância foi medida utilizando-se como comprimento de onda $DO_{260\text{ nm}}$ em espectrofotômetro (GeneQuant*pro* Amersham Pharmacia Biotech AB, Cambridge, UK). Segundo Sambrook *et al.* (1989), a absorbância igual a 1 neste comprimento de onda contém uma concentração de 50 ug/mL de DNA dupla fita, 40 ug/mL de DNA fita simples e aproximadamente 20 ug/mL de oligonucleotídeos de fita simples. Também foi medida a absorbância de $DO_{280\text{ nm}}$ de comprimento de onda para verificar a presença de proteínas e calcular a pureza do DNA. A razão entre as leituras $DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}}$ permite uma estimativa da pureza do DNA, que deve apresentar valores entre 1,8 e 2,0. A razão abaixo de 1,6 indica grande quantidade de contaminantes e proteínas, e na sua ocorrência, a extração foi realizada novamente.

3.3.4 Reações de Microssatélite e RAPD

Todas as amostras de *C. rugosa* foram submetidas às técnicas de microssatélite e RAPD para avaliação da similaridade genética entre as mesmas.

Para as reações de PCR, em ambos os métodos empregados foram adicionados em tubos de microcentrifugação de 0,2 mL, os seguintes reagentes: 11,5 uL de água milli-Q; 2,5 uL de Tampão 10X (Invitrogen Corporation, CA, USA); 5 uL de dNTP mix 1,25 mM (Amersham Biosciences/GE Healthcare, Estocolmo, Suécia); 3,5 uL de MgCl₂ 25 mM (Invitrogen Corporation, CA, USA); 1uL do oligonucleotídeo a 50 pmol/uL (BIO.SYNTHESIS); 0,13 uL de Tween-20; 0,4 uL de Taq DNA polimerase 500 U (Invitrogen Corporation, CA, USA) e 1 uL de DNA diluído à 40 ng/uL, totalizando um volume de 25 uL. A amplificação foi realizada em termociclador (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA).

Para a reação de microssatélite utilizou-se o oligonucleotídeo GACA₄ - GACAGACAGACAGACA - (Walczak *et al.*, 2007; Meyer & Mitchell, 1995), e os seguintes ciclos de PCR foram adotados: 1 ciclo de 97 °C por 3 min. (desnaturação inicial); 40 ciclos de 93 °C por 20 s (desnaturação), 48 °C por 20 s (hibridização) e 72 °C por 2 min. (extensão) e 1 ciclo de 72 °C por 5 min. (extensão final).

Para a reação de RAPD utilizou-se o oligonucleotídeo B14 – GATCAAGTCC - (Colombo *et al.*, 2003), com os seguintes ciclos de PCR: 1 ciclo de 94 °C por 5 min.; 45 ciclos de 94 °C por 30 s, 36 °C por 30 s e 72 °C por 2 min.; 1 ciclo de 72 °C por 10 min.

3.3.5 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR gerados por microssatélite e RAPD

O gel de agarose (Ultra Pure Agarose-Invitrogen Corporation, CA, USA) para a eletroforese foi usado na concentração de 1,2% em solução tampão TAE 1X (Tris, 4,84g; acetato, 1,14g; EDTA, 2mL). Os produtos amplificados pelas reações de PCR foram diluídos em tampão Orange G (10uL da reação em 2uL do tampão orange G) assim como 1ul do marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder / Invitrogen Corporation, CA, USA), foi diluído em 9uL de água milli-Q mais 2uL do tampão Orange G. Foram adicionadas 10 uL da reação diluída a cada orifício do gel. Foi utilizada alíquota de água milli-Q para controle negativo da reação. Para a corrida eletroforética foi utilizada uma corrente elétrica de 100 volts por 30 minutos e em seguida a 55 volts por 4:30 horas.

Após o término da eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (USB Corporation) durante 20 minutos (400 mL de TAE 1X + 20 µL de brometo de etídio 10 mg/mL) e descorado em água destilada por 15 minutos.

Os padrões de bandas contidos nos géis tiveram sua imagem capturada em um transiluminador de raios UV (UVP – BioDoc – it™ System) e transferida para um disquete (no formato JPEG) para posterior análise.

3.3.6 Avaliação da similaridade dos padrões de bandas

A análise dos resultados gerados pelos métodos de microssatélite e RAPD foi realizada por dendrograma desenhado pelo programa GEL COMPAR II versão 4.0 Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) através de análise de agrupamento, de acordo com a similaridade dos padrões de bandas obtidos.

Os géis foram comparados entre si após o aporte de suas imagens pelo programa Gel Compar II. Este programa corrige distorções do gel, como padrões de sorriso, através da comparação com um padrão universal e seleciona automaticamente as bandas presentes no gel. As imagens originais dos géis foram analisadas visualmente para desconsiderar artefatos.

O coeficiente de Dice com tolerância de 2% foi utilizado para esta análise que se baseia na presença e ausência de bandas, bem como do maior peso para as bandas em comum entre as amostras analisadas para gerar a matriz de similaridade. Para gerar o dendrograma, utilizou-se o método UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages), que baseado na matriz de similaridade, faz o grupamento par a par das amostras, gerando desta maneira o grupamento em uma árvore enraizada (Walczak et al., 2007).

3.4 Sequenciamento da região ITS (rDNA)

Todas as amostras foram submetidas ao sequenciamento da região ITS do rDNA, para fins de identificação confirmatória e análise do grau de relacionamento filogenético entre elas. O sequenciamento foi realizado em colaboração com o Laboratório de Retrovirologia, Disciplina de Infectologia, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP.

3.4.1 PCR da região ITS

Para amplificar a região ITS (“Internal Transcribed Spacer” do DNA ribossomal) foram utilizados os *primers* ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATG), segundo Ciardo et. al (2006). Nesta reação utilizou-se 25µL de 2x PCR Master Mix (Invitrogen Corporation, CA, USA), 1µL de cada *primer* (10pmol/µL), 22µL H₂O Nuclease Free (Invitrogen Corporation, CA, USA) e acrescentou-se 1µL de DNA *template* a 40ng/µL, totalizando um volume de 50µL. A amplificação foi realizada em termociclador (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA). Os ciclos utilizados na reação de PCR foram os seguintes: 1 ciclo de 94 °C por 3 min (desnaturação inicial); 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 57 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; 1 ciclo de 72 °C por 5 min

(extensão final). A cepa ATCC10571 foi utilizada como controle positivo da reação e uma alíquota de água milli-Q foi adicionada como controle negativo.

Previamente à purificação do DNA amplificado, foi corrido um gel de eletroforese dos *amplicons* para verificar a eficácia da reação de PCR, nas mesmas condições descritas no item 3.7.5, exceto pelo fato de que as amostras foram submetidas à corrente elétrica de 90 volts por 1 hora e 30 minutos.

3.4.2 Purificação das amostras de DNA

Os amplicons da região ITS foram purificados utilizando-se o kit de purificação ChargeSwitch PCR Clean-UP (Invitrogen Corporation, CA, USA) (Silva et al., 2006). Na fase de ligação do DNA, adicionou-se 50ul do “Purification Buffer” a 50ul de amostra (em tubo de microcentrifugação de 1,5ml). Em seguida, 10ul do “Charge Switch Magnetic Beads” foram adicionados ao tubos, sendo estes homogeneizados suavemente sem formar bolhas e incubados por 1 minuto em temperatura ambiente. Os tubos foram colocados na estante magnética por 1 minuto e o sobrenadante posteriormente removido.

Na etapa de lavagem, retiraram-se os tubos da estante magnética e 150µl do “Wash Buffer” foram adicionados na amostra. Os tubos foram

homogeneizados suavemente, colocados novamente na estante magnética por 1 min. e o sobrenadante descartado. Repetiu-se a lavagem mais uma vez.

Na fase de eluição, os tubos foram retirados da estante magnética e 50µl do “Elution Buffer” foram colocados nos mesmos, os quais foram homogeneizados suavemente e incubados por 1 min. à temperatura ambiente. Os tubos foram colocados na estante magnética por 1 min. e o sobrenadante (amplicon purificado) foi transferido para um tubo de microcentrifugação limpo e identificado. As amostras foram armazenadas em freezer (-20°C) até o momento da sua utilização.

3.4.3 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada pelo método de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeo (Sanger et al., 1992), com o kit comercial DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences/GE Healthcare, Estocolmo, Suécia) em placas de 96 poços de polipropileno (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme descrito em Silva et al. (2006).

Cada reação de sequenciamento foi composta de 6µL do produto de PCR purificado (em média 40ng de DNA total) mais 9µL de um MIX contendo 2µL de “Big Dye™ Terminator versão 3.1 / Sequencing Standard Kit” (DNA polimerase AmpliTaq, tampão Tris-HCl pH 9,0, MgCl₂, deoxinucleotídeos

trifosfato e dideoxynucleotídeos marcados com um doador e um acceptor de fluorescência), 3ul de oligonucleotídeo a 2pmol/ul e 4ul de tampão *Save Money* 2.5 X. As condições de ciclagem foram: 25 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, em um termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR system 9700.

Na etapa de precipitação, 90µl de etanol 70% foram colocados em cada amostra, vedou-se bem a placa, a qual foi homogeneizada em vórtex e incubada à temperatura ambiente por 15 minutos protegida da luz. A placa foi novamente homogeneizada e centrifugada a 4.000 rpm, 45 minutos, 20°C. Em seguida, a placa foi invertida sobre papel absorvente até a completa remoção do etanol. Adicionou-se 150µl de etanol 70% em cada amostra e a placa foi vedada e homogeneizada em vórtex. Após centrifugação a 4.000 rpm, 15 minutos, 20°C, a placa foi novamente invertida em papel absorvente, sendo realizada uma breve centrifugação com a placa invertida para a remoção do etanol. A placa foi colocada no termociclador a 94 °C por alguns minutos com a finalidade de secar completamente o etanol.

Por fim, as amostras foram ressuspendidas em 15uL de formamida HI-DI (Invitrogen Corporation, CA, USA), desnaturadas por 4 minutos a 95°C, resfriadas no gelo por 5 minutos e colocadas em um sequenciador automático de DNA modelo ABI 3100 - Genetic Analyzer – (Applied Biosystems, CA, USA).

3.4.4 Análise e alinhamento das sequências

As sequências foram editadas pelo programa Sequencher™ 4.1.4 (Genes Code Co., MI, USA), para a obtenção da sequência consenso de cada amostra a partir da análise das seqüências geradas com os *primers* ITS1 e ITS4. As sequências consenso foram comparadas em bancos genômicos através do site “National Center for Biotechnology Information (NCBI)” disponível em: <http://ncbi.nlm.nih.gov>, utilizando o serviço Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Esta ferramenta se caracteriza por programas de procura de similaridade que podem ser utilizados para identificar e classificar os homólogos em potencial para uma determinada seqüência, e neste caso, foi utilizado para a identificação de espécie. Apenas sequências depositadas no GenBank apresentando alta similaridade com as nossas e um *E-value* abaixo de “10⁻⁵” foram utilizadas em nosso estudo.

As sequências foram alinhadas utilizando-se o programa Mega 4.1 (V4.1, Beta, AZ, USA), com o qual se realizou também a análise filogenética das mesmas, pelo método de *Neighbor Joining* para a construção da árvore filogenética.

3.5 Análise fenotípica dos fatores de virulência de *C. rugosa*

3.5.1 Caldo NGY para padronização do inóculo

Para a caracterização fenotípica dos diferentes isolados, as amostras foram inicialmente crescidas em meio NGY (Neopeptona Difco 1g/L; dextrose 4g/L; Extrato de leveduras Difco 1g/L). Quando as células são inoculadas por “wet looping” neste meio (com uma alça em anel carregada por um filme de suspensão de leveduras rapidamente imersa no meio e removida) e incubadas por 18-24 h em shaker a 30°C, 200 rpm, um inóculo de aproximadamente 2×10^8 células/mL é produzido.

3.5.2 Ensaio para detecção de atividade de proteinase em *C. rugosa*

A atividade de proteinase foi determinada utilizando-se a metodologia de Copping et al. (2005). Lotes contendo 200 µL de células crescidas em NGY foram transferidos a tubos de ensaio contendo 5 mL de meio YCB+ BSA (yeast carbon base Difco 11.7 g/L; dextrose 10 g/L; bovine serum albumine fraction V Sigma 5g/L) e incubadas em shaker a 30 °C por 72 h. A turbidez da cultura ($DO_{600\text{ nm}}$) foi determinada em espectrofotômetro (Gene Quant Pro, Biochrom Ltd., Cambridge, UK).

A atividade proteolítica foi determinada pelo aumento de produtos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) medida a 280 nm em triplicata. As culturas foram então centrifugadas a 4.300 g por 35 minutos, e um volume de 250 µL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de tampão citrato de sódio (0,1M citrato de sódio Sigma; 0,1M ácido cítrico Sigma) acrescido de 1% BSA, pH 3.8. Tubos controle contendo apenas os sobrenadantes das culturas foram incluídos. Os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 37°C por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de 2.5 mL de TCA 5% (p/v) gelado a cada tubo e 1 mL do tampão citrato de sódio foi adicionado aos tubos controle. Os tubos foram incubados no gelo por 10 min. Os precipitados foram removidos por centrifugação a 4°C, 3.000 rpm por 10 min e a absorbância em DO_{280nm} dos sobrenadantes dos tubos teste foi determinada utilizando-se os sobrenadantes dos tubos controle como branco. Para efeito de documentação da produção de proteinase, cada isolado foi avaliado em 3 diferentes experimentos, sendo a média das 3 determinações o valor final reportado como produção de proteinase.

3.5.3 Ensaio para detecção de atividade de fosfolipase em *C. rugosa*

Para a detecção da atividade de fosfolipase, foi utilizado o método de Price *et al.* (1982). Culturas crescidas “overnight” em NGY foram diluídas e padronizadas a uma concentração de 2×10^5 cells/mL; e a suspensão de células inoculada em triplicata em superfície de ágar fosfolipase (agar

Sabouraud adicionado de 1M NaCl; 5 mM de CaCl₂; 80 mL de gema de ovo Sigma após autoclavação e resfriamento do meio). As placas foram incubadas por 72 h. Após o período de incubação, os diâmetros das colônias e os halos formados foram medidos. O Pz (zona de fosfolipase) foi determinado pela seguinte equação:

$$P_z = \frac{\text{diâmetro da colônia (cm)}}{\text{diâmetro da colônia (cm)} + \text{zona de precipitação (cm)}}$$

As amostras com valores de Pz=1.0 são consideradas fosfolipase negativas, enquanto que valores mais baixos indicam cepas produtoras de fosfolipase. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5.4 Ensaio para detecção de atividade de lipase em *C. rugosa*

Os ensaios de padronização de produção e detecção de lipase nos isolados de *C. rugosa* foram realizados no Laboratório de Bioaromas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, com a colaboração da Prof^a. Dra Glácia Maria Pastore.

3.5.4.1 Screening de isolados produtores de lipase (método qualitativo)

Foi realizado um ensaio em duplicata para um *screening* dos 45 isolados pela técnica de formação de halos em placas de Petri contendo ágar e o corante Rhodamina B (p/v): 1% de óleo de oliva, 0,3% de peptona, 0,2% de extrato de levedura, 0,2% de K_2PO_4 , 0,1% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2% de ágar e 0,001% de Rhodamina B (Prazeres et al., 2006). Adicionou-se 10 μ l de um inóculo de leveduras na escala 1 de McFarland em cada placa, as quais foram incubadas a 30°C por 96 h.

Foram consideradas colônias produtoras de lipase extracelular aquelas que formaram um halo claro ao seu redor, devido à hidrólise do óleo de oliva pela lipase evidenciada pela Rhodamina. Os tamanhos da colônia e do halo de hidrólise foram medidos e posteriormente analisados.

3.5.4.2 Incubação dos isolados em meio indutor de lipase

Para a análise quantitativa da atividade lipolítica foi utilizado o seguinte meio indutor de lipase (p/v): peptona 1,5%, extrato de levedura 0,5%, H_2HPO_4 0,3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,04% e azeite de oliva 1% (Galo). O pH do meio foi ajustado para 7,2 (dos Prazeres et al., 2006).

Acrescentou-se 2,5ml de uma solução de inóculo de leveduras ajustada a 90% de transmitância em erlenmeyers contendo 50mL do meio indutor, os quais foram incubados com agitação de 150 rpm, 30°C durante 48 horas.

Para efeito de documentação da produção de lipase, cada isolado foi avaliado em 3 diferentes experimentos, sendo a média das 3 determinações o valor final reportado como produção de lipase.

3.5.4.3 Determinação da atividade lipolítica pelo método da hidrólise do laurato de *p*-nitrofenil (pNPL).

Este método espectrofotométrico baseia-se na hidrólise do laurato de *p*-nitrofenil (pNPL) pela enzima lipase, em meio aquoso. Neste ensaio, 500µl do substrato (161mg de *p*-nitrofenil laurato – Sigma Aldrich -, 80 ml de tampão acetato de sódio 50mM pH5,6 e 800uL de Triton X-100) juntamente com 300µl de tampão fosfato de sódio 0,05M (pH 7,0) foram colocados em cubetas de polimetilmetacrilato e deixadas em banho-maria a 37°C por alguns minutos para equilibrar a temperatura.

Paralelamente, um volume de 1 ml das células crescidas em meio indutor foi transferido para microtubos de 1,5ml, e, posteriormente, centrifugado por 15 minutos, 10.000 rpm a 4°C. Por fim, acrescentou-se 200µl do sobrenadante das culturas à cubeta contendo o substrato e o tampão, e as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C.

A formação do *p*-nitrofenol (produto de hidrólise), de coloração amarela, foi quantificada a 348nm (Dalmau, 2000). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol (pNP) por minuto. A atividade enzimática foi

calculada a partir de uma equação gerada por uma curva de calibração do pNP nas mesmas condições do ensaio.

Partindo de uma solução mãe de p-nitrofenol a 1mM, foram feitas 8 diluições seriadas (de 1:5 a 1:40), a partir das quais foram realizadas leituras a 348nm. O gráfico obtido pela correlação da absorbância e da concentração de p-nitrofenol gerou uma equação da qual é possível relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura de cada amostra (Figura 1).

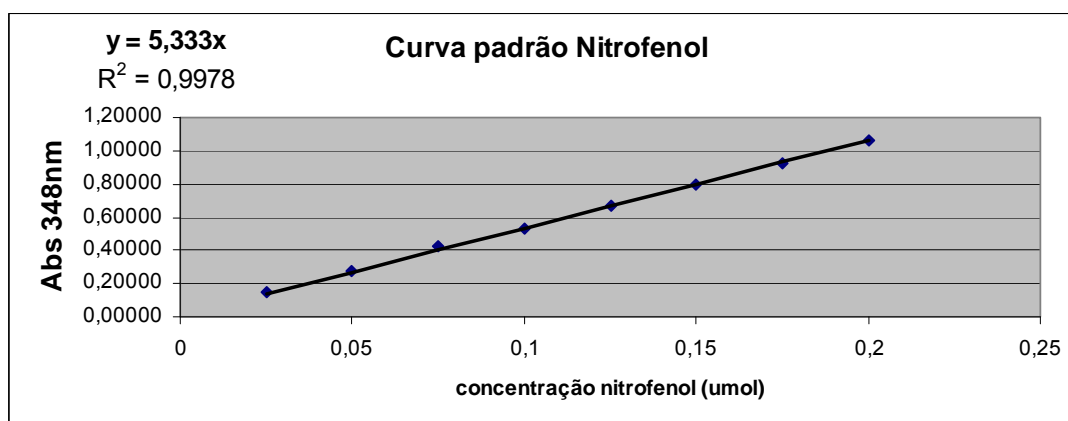


Figura 1: Curva de calibração do p-nitrofenol e equação da concentração de p-nitrofenol em função da absorbância a 348nm.

3.5.5 Formação de biofilme

Para a indução de biofilme foi seguido o protocolo de Jin et al. (2003) adaptado por Melo et al. (2007). Células de *C. rugosa* foram cultivadas em SDA a 35°C por 18 horas. Os isolados foram inoculados em 5 mL do meio RPMI-1640 (Angus Buffers e Biochemicals, Niagara Falls, NY, EUA),

tamponado com 0,164M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA) e o pH acertado para 7,0 com solução de hidróxido de sódio 10M, e incubados durante 18 horas a 200 rpm. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 6.000 rpm por 7 minutos a temperatura ambiente, sendo o pellet formado lavado duas vezes em 5 mL de PBS (solução salina de tampão fosfato, pH 7,2, Ca²⁺ e Mg²⁺ livres), em iguais condições de centrifugação. Para ajustar a concentração celular em 10⁷ células/mL, o pellet foi ressuspenso em 3 mL de PBS, e a suspensão celular ajustada para uma densidade óptica de 0,38 de absorbância a 520 nm.

Subsequentemente, para a fase de adesão, transferiu-se a suspensão do inóculo padronizado para placas de microtitulação de poliestireno estéreis com 96 poços. Em cada poço foram adicionados 100 µL da suspensão, sendo a placa incubada por 1,5 h a 37°C sob agitação mecânica de 75 rpm. Como controle negativo, 8 poços foram tratados de maneira idêntica, excluindo-se os conteúdos celulares.

Após a fase de adesão, aspirou-se a suspensão de células não aderidas, sendo os poços lavados duas vezes com 150 µL de PBS. Imediatamente, um total de 100 µL de meio RPMI-1640 foi adicionado em cada um dos poços e a placa incubada 66 horas a 37° C sob agitação de 75 rpm. Após este período, o biofilme foi quantificado utilizando-se coloração de cristal violeta. Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata.

3.5.6 Coloração do biofilme pelo cristal violeta

Após a indução de biofilme, removeu-se por pipetagem o meio RPMI-1640 sendo cada poço da placa lavado duas vezes com 150 uL de PBS. Depois de retirado o PBS, a placa foi mantida por 20 minutos em estufa à 37°C para secagem. Em seguida, foram adicionados 110 uL de solução aquosa de cristal violeta 0,4% (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA) em cada poço com incubação por 45 minutos, seguido de três lavagens com 200 uL de água milli-Q. Sequencialmente, as amostras foram descoradas com 200 uL de etanol 95% por um período de 45 minutos. Cerca de 100 uL da solução descorante foram transferidos para uma nova placa e submetidos à quantificação em leitor espectrofotométrico de placas, com filtro de 570nm. Os valores de absorbância dos controles negativos foram subtraídos das amostras teste para normalização dos resultados.

3.6 Testes de susceptibilidade a antifúngicos

Os testes de susceptibilidade a antifúngicos foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, conforme a norma de padronização publicada no documento M27-A2 pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Além dos isolados clínicos selecionados para este estudo, organismos controle de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258,

foram incluídos em cada lote de ensaios para a verificação da perfeita diluição dos antifúngicos. Esta verificação é possível uma vez que são conhecidas previamente as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) para estes microrganismos controles frente aos antifúngicos a serem testados.

Utilizou-se meio de cultivo líquido, RPMI-1640 (Angus Buffers e Biochemicals, Niagara Falls, NY, EUA). Foram adicionados 10,4 g de RPMI e 34,53g de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) em 1L de água destilada. O pH do meio foi acertado para 7,0 com solução de hidróxido de sódio 10M, e a solução esterilizada por filtração em filtro biológico de 0,22 micra (Corning Incorporated Costar, Corning, NY, EUA).

Os antifúngicos testados foram diluídos em dez diferentes concentrações seriadas, a saber: fluconazol (Pfizer Incorporated, New York, NY, EUA) para 1,25 a 640 ug/mL; voriconazol (Pfizer Incorporated, New York, N.Y.,EUA) e anfotericina B (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA) para 0,3 a 160 ug/mL; caspofungina (Merck, Rahway, N.J., EUA) e anidulafungina (Pfizer Incorporated, New York, N.Y. EUA) para 0,06 a 32 ug/mL.

As drogas foram diluídas em meio RPMI-1640, e alíquotas de 100 uL destas concentrações foram dispensadas nas placas de microtitulação (Corning Incorporated Costar, Corning, NY, EUA), utilizando-se pipeta multicanal (Digital Multichannel Pipette, Labsystem, Helsinki, Finland). Concentrações progressivas de drogas foram dispensadas sequencialmente nos poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. Os poços pertencentes à coluna identificada com o número 11 foram utilizados como

controles de crescimento, sendo dispensados 100uL do meio RPMI sem nenhum antifúngico, mais 100ul de meio de cultura contendo o inóculo. Os poços da coluna 12 foram os controles de esterilidade, contendo apenas o meio RPMI-1640. As placas foram mantidas a -70° C até sua utilização por período máximo de 6 meses. No dia do experimento, as placas foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos antes de serem utilizadas.

A partir de um cultivo de 24 horas da levedura a ser testada, realizado em SDA, foi preparada uma suspensão de inóculo inicial com transmitância de 90% determinada por espectrofotometria, utilizando-se comprimento de onda a 530nm. Em seguida, foram realizadas duas diluições seriadas (1:1000) em meio RPMI-1640 para obtenção de inóculo final contendo de 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/mL. Alíquotas de 100 uL da solução do inóculo final foram dispensadas nos poços contendo 100 uL de diferentes concentrações dos antifúngicos testados. Ao final, as placas foram transferidas para estufa a 35°C, sendo a leitura do teste realizada após 48 horas de incubação para os ensaios com anfotericina B e azólicos, e após 24 horas para equinocandinas.

Foi considerado como CIM para azóis e equinocandinas a menor concentração da droga que apresentou cerca de 50% de redução em sua turbidez comparativamente ao poço controle positivo. Para a anfotericina B, a concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento visualmente perceptível (CLSI, 2008).

Os critérios para a definição de susceptibilidade e ponto de corte para o fluconazol estavam de acordo com o documento M27-A2 (NCCLS, 2002), e os critérios para o voriconazol, anidulafungina e caspofungina foram

aqueles sugeridos pelo documento M27-A3 (CLSI, 2008). Como não existe definição de pontos de corte estabelecidos para anfotericina B, utilizamos aqueles preconizados por outros autores (Nguyen et al., 1998; Maenza et al., 1996; Rex et al., 1995; Dewsnap & Stevens, 1994). A Tabela 2 ilustra os valores dos pontos de corte utilizados para a interpretação dos testes de susceptibilidade neste estudo.

Tabela 2: Valores de ponto de corte sugeridos para interpretação dos testes de susceptibilidade de leveduras.

Variação dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para a categoria				
Antifúngico	Sensível (S)	SDD*	Resistente (R)	Referências
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64	M27-A2/2002
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4	M27-A3/2008
Anfotericina B	≤ 1	-	≥ 2	Nguyen, 1998; Rex, 1995; Maenza, 1996; Dewsnap, 1994;
Caspofungina	≤ 2	-	> 2	M27-A3/2008
Anidulafungina	≤ 2	-	> 2	M27-A3/2008

* Susceptibilidade Dose-Dependente: categoria exclusiva para triazólicos

3.7 Análise Estatística

Foi realizada análise estatística para comparação dos fatores de virulência expressos pelos diferentes grupos de isolados de *C. rugosa* avaliados, utilizando-se a técnica de análise de variância pelo método Oneway ANOVA com auxílio do software SPSS versão 13.0 for Windows (SPSS Inc., Illinois, USA).

4.0 RESULTADOS

4.1 Seleção das amostras utilizadas neste estudo e confirmação da identificação taxonômica

Neste estudo foram selecionadas 42 amostras de *C. rugosa*, as quais foram divididas em 3 grupos de acordo com o desfecho clínico dos pacientes dos quais foram isoladas (Tabela 1 e Figura 2): Grupo I: pacientes com colonização persistente, sem desenvolvimento de candidemia ao longo da internação (19 cepas); Grupo II: pacientes com colonização persistente, desenvolvimento de candidemia ao longo da internação e evolução para alta hospitalar (5 cepas); Grupo III: paciente com colonização persistente, desenvolvimento de candidemia ao longo da internação e evolução a óbito (18 cepas). Para efeito comparativo, além destes isolados clínicos, foram incluídas duas cepas do Rio de Janeiro como controle externo e a cepa de referência ATCC10571, todas elas de *C. rugosa*.

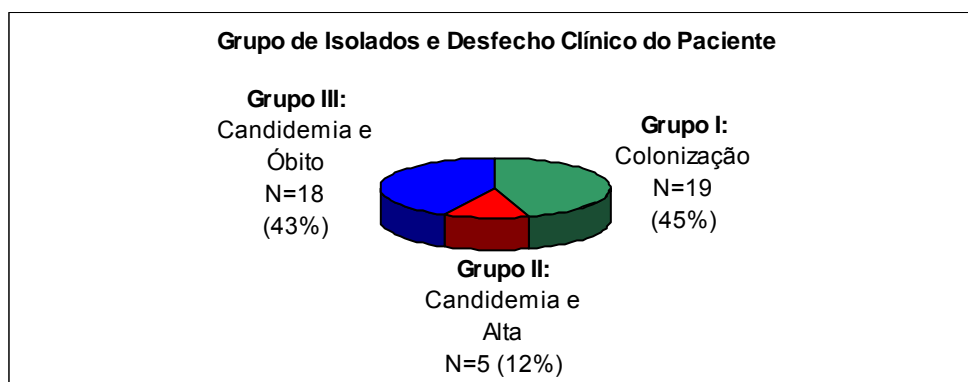


Figura 2: Distribuição dos isolados de *C. rugosa* de acordo com o desfecho clínico dos pacientes analisados em seus respectivos grupos.

Como pode ser visto na Tabela 3, todas as amostras foram identificadas fenotipicamente como sendo *C. rugosa* pelo *kit* comercial ID32C. As cepas exibiram coloração variando de azul claro e azul escuro em CHROMagarCandida®, e a micromorfologia revelou presença de blastoconídeos e pseudohifas em abundância no ágar-fubá (Figura 3).

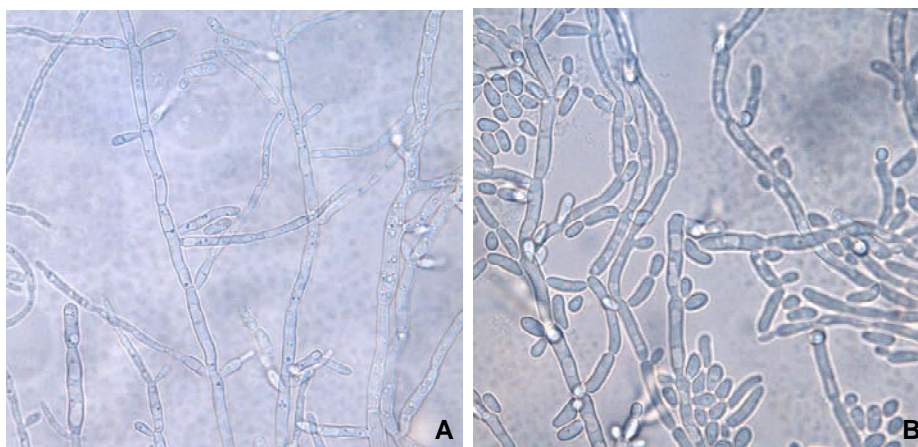


Figura 3: Imagem de microscopia óptica comum do microcultivo de dois isolados de *C. rugosa*, ATCC10571 (A) e 565D (B), em aumento de 1000x. A micromorfologia revela presença de blastoconídeos ovóides e cilíndricos e abundância em pseudohifas para ambos os isolados.

Tabela 3: Identificação e características morfológicas das cepas de *C. rugosa* em meio sabouraud (macromorfologia), coloração no meio CHROMagar e micromorfologia em ágar-fubá.

Cepa	Identidade <i>C. rugosa</i> ID32C (%)	Morfologia Sabouraud 48hs 30°C	Cor no CHROMagar 48hs 30°C	Aspecto micromorfológico
61	99	Opaca/Lisa	azul claro	Blasto ² / pseudohifas
69	99,7	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
70	99,7	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
106	clássico ¹	Opaca/Lisa	azul escuro	blasto/ pseudohifas
107	99,7	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
154	99,8	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
4,5 A	98,9	Opaca/Lisa	azul escuro	blasto/ pseudohifas
9 B1	99,1	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
69 D	99	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
105 A1	99,1	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
145 D	99,8	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
157 C	99	Opaca/Lisa	azul escuro	blasto/ pseudohifas
165 C	99,1	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
300 A	99,1	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
387A	99,1	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
412 A2	99,7	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
412 D	99,9	Opaca/Lisa	azul escuro	blasto/ pseudohifas
530 C	94,7	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
535 C	98,9	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
536 D	99,1	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
554 D2	99,7	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
565 D	98,9	Opaca/Rugosa	azul claro	blasto/ pseudohifas
573 D	99	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
577 D	99	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
581 A2	94,7	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
589 F	98,8	Opaca/Lisa	azul escuro	blasto/ pseudohifas
629 A2	99,1	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
656 A1	99	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
686 F	99,1	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
852 B2	99	Opaca/Lisa	azul escuro	blasto/ pseudohifas
875 D	99	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
880 D	99	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
892 D2	98,7	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
903 D2	99	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
945 A	99,9	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
955 D	99	Opaca/Lisa	azul escuro	blasto/ pseudohifas
968 B1	99,1	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
978 A1	99,8	Opaca/Lisa	azul escuro	blasto/ pseudohifas
981 F	98,7	Opaca/Lisa	azul escuro	blasto/ pseudohifas
1016 C	99,1	Opaca/Rugosa	azul escuro	blasto/ pseudohifas
1130 D	99,7	Opaca/Lisa	azul escuro	blasto/ pseudohifas
1160.5	99,7	Opaca/Lisa	azul escuro	blasto/ pseudohifas
2683 A	99,1	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
2683 B	99,1	Opaca/Lisa	azul claro	blasto/ pseudohifas
ATCC10571	99,7	Opaca/Rugosa	azul escuro	blasto/ pseudohifas

1 identificação fenotípica pela metodologia clássica (assimilação e fermentação de carboidratos)

2 blasto = blastoconídeos

A macromorfologia dos isolados em meio ágar-sabouraud revelou colônias de aspecto opaco e liso, exceto pelos isolados 565D, 1016C e ATCC 10571, os quais mostraram morfologia acentuadamente rugosa e opaca (Figura 4). O cultivo em meio RPMI1640, pH4.0, a 37°C por 6 horas, também revelou uma diferença morfológica entre essas três cepas e os demais isolados do presente estudo. Como pode ser observado na Figura 5, a análise micromorfológica mostrou abundância de blastoconídeos de formato ovóide/cilíndrico na maioria das cepas, exceto para os isolados 565D, 1016C e ATCC 10571, que além da presença dos blastoconídeos, exibiram a formação de pseudo-hifas em estágio inicial.

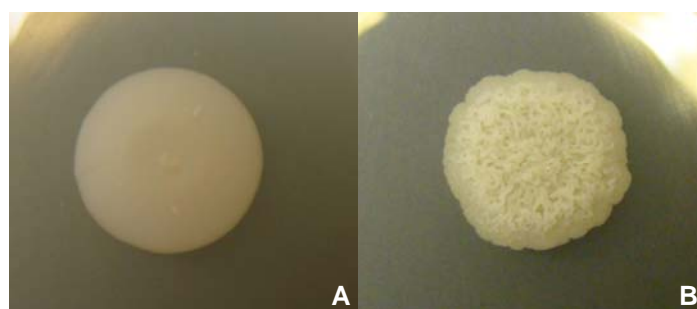


Figura 4: Macromorfologia das cepas 387A (A) e ATCC10571 (B) de *C. rugosa* crescidas por 48 horas em meio ágar-sabouraud, a 30°C .

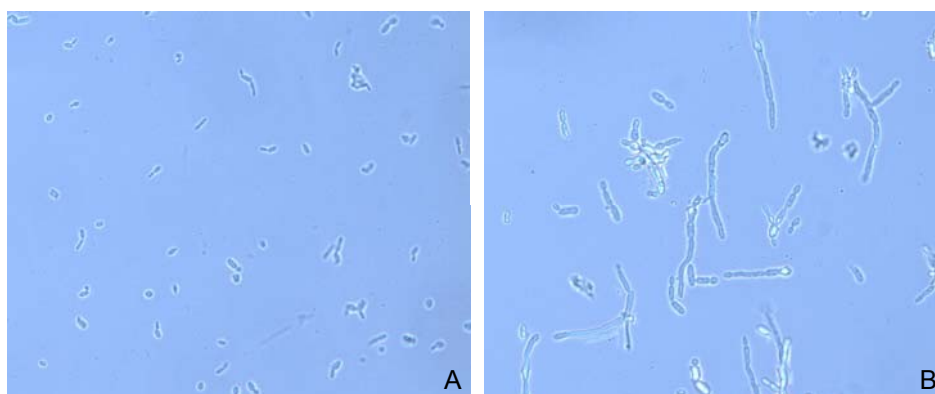
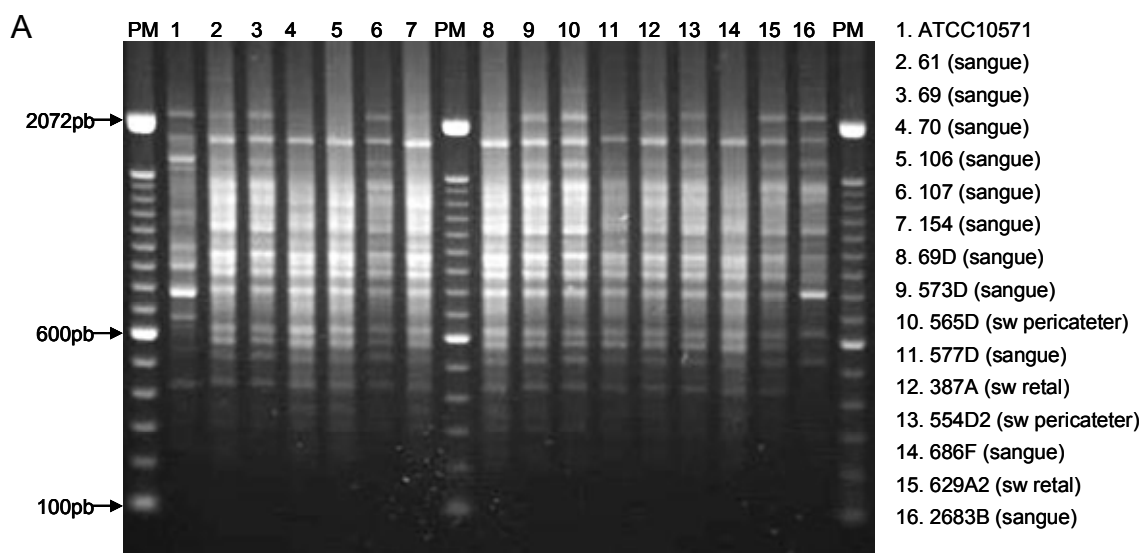


Figura 5: Micromorfologia das cepas 61(A) e ATCC10571 (B) crescidas por 6 horas em meio RPMI pH4.0 a 37°C.

4.2 Tipagem molecular

4.2.1 Genotipagem por microssatélite

As amostras amplificadas com o *primer* GACA₄, referente à técnica de microssatélite, exibiram um padrão de bandas com satisfatório poder discriminatório e reprodutível. A análise visual das bandas geradas por este método foi capaz de ressaltar poucas diferenças intraespecíficas para os isolados clínicos avaliados neste estudo. Pode-se notar que o padrão de bandas destes isolados é semelhante, diferentemente do perfil genotípico obtido para a cepa de referência ATCC10571 (Figura 6).



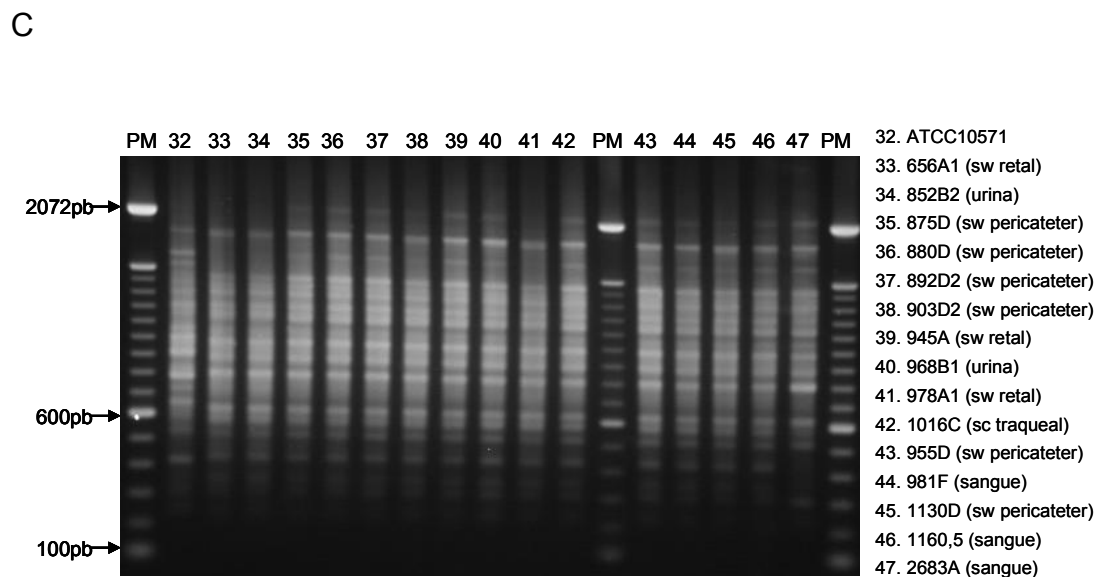
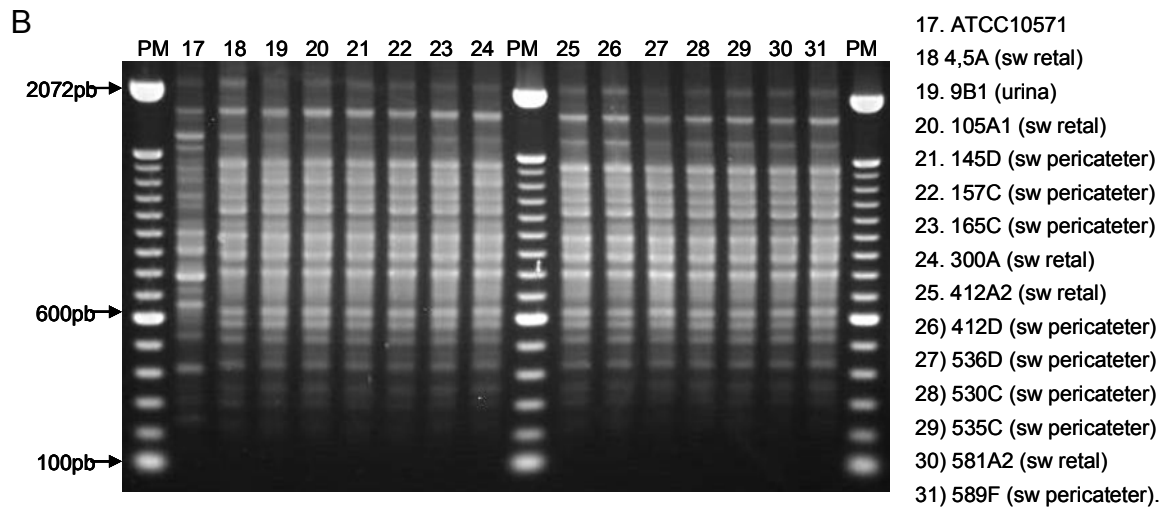


Figura 6 (A, B e C): Genotipagem por microsatélite das amostras clínicas de *C. rugosa* amplificadas com o *primer* GACA₄. PM= Marcador de peso molecular.

O dendrograma gerado pela análise de bandas amplificadas com o *primer* GACA₄ pode ser visualizado na Figura 7. Os isolados avaliados no presente estudo apresentam uma alta porcentagem de similaridade (aproximadamente 94%). Este método foi capaz de agrupar os isolados sequenciais de um mesmo paciente no mesmo cluster, exceto no caso dos pacientes 5 e 16, em que os isolados apresentaram ligeira heterogeneidade genotípica, sendo localizados em diferentes *clusters*, sendo A e B para o primeiro e B e C para o segundo (figura 7).

Foi possível discriminar por este método os controles externos do Rio de Janeiro (cepas 2683A e 2683B), os quais foram incluídos em um mesmo cluster (letra D), e apresentaram-se 92% similares com as cepas avaliadas nesse estudo, revelando variação genotípica provavelmente pelo fator geográfico. Além disso, foi notável que muitos isolados apresentaram 100% de identidade, o que sugere uma disseminação clonal destas cepas neste microambiente hospitalar, onde as pequenas variações encontradas são possíveis microevoluções ocorridas em função da adaptação no referido hospital.

Interessantemente, os isolados avaliados neste projeto, e também as cepas oriundas do Rio de Janeiro, apresentaram baixa similaridade com a cepa de referência ATCC10571 (cerca de 86%), sugerindo uma alta heterogeneidade genética no táxon *C. rugosa*.

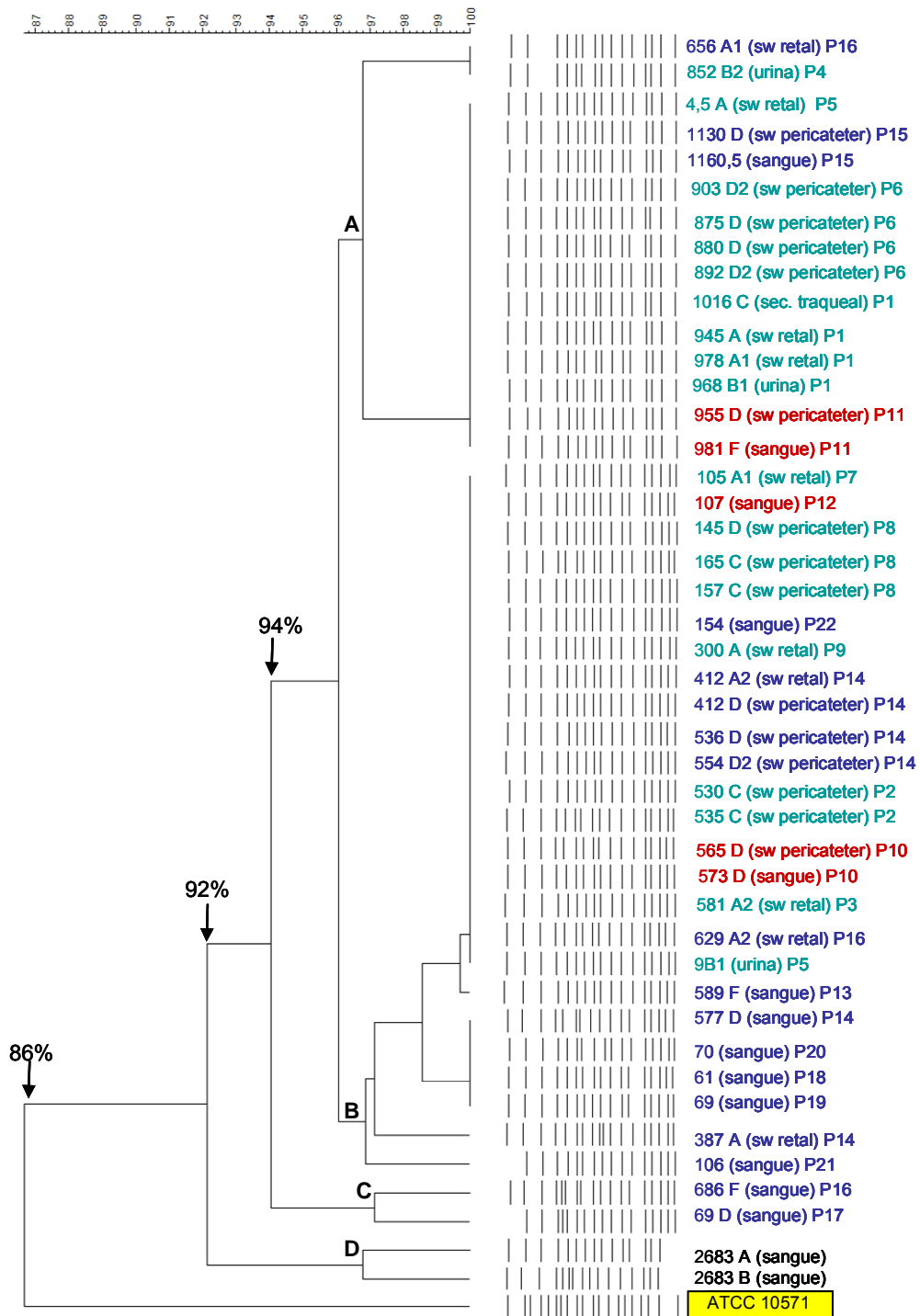
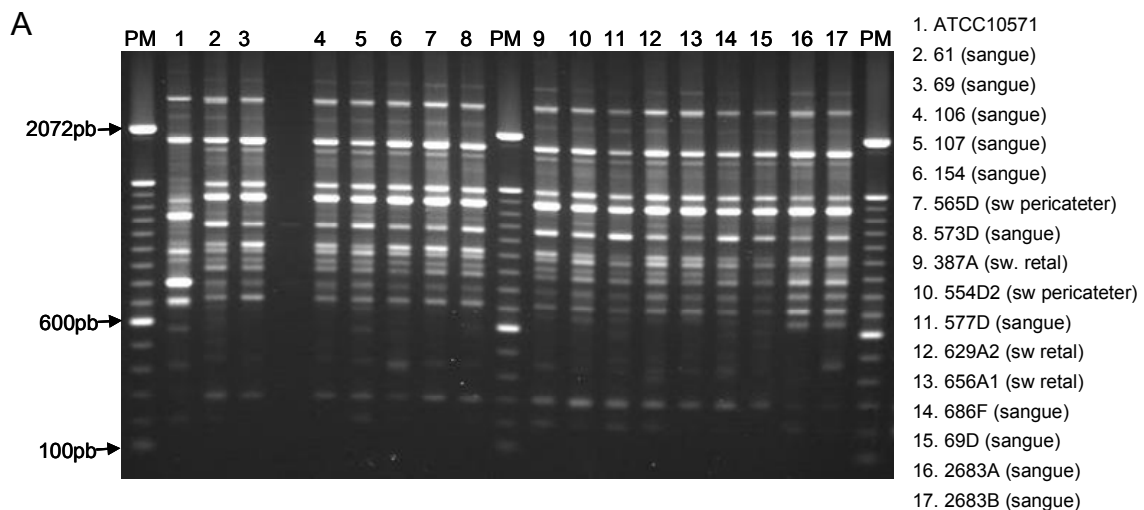


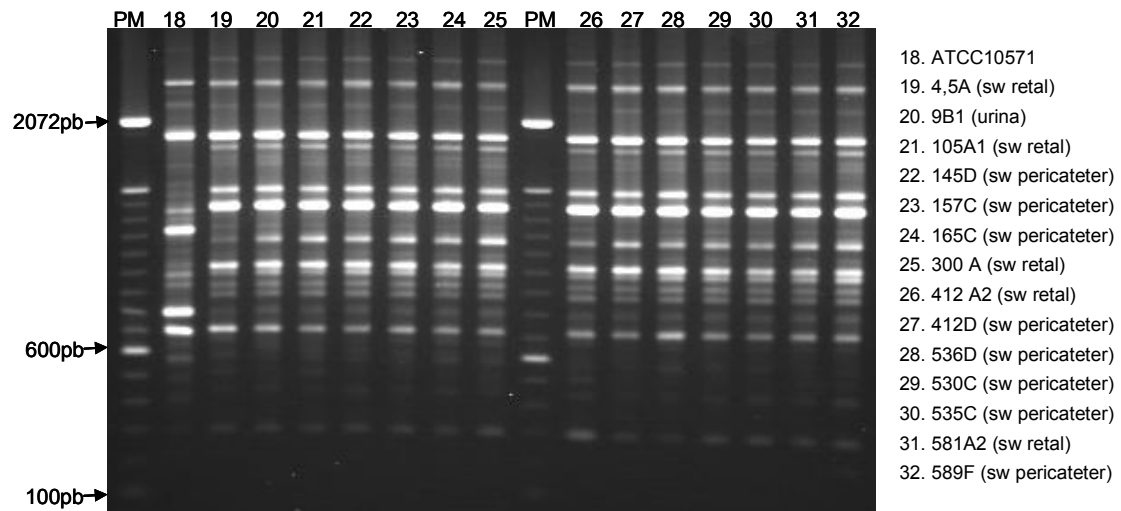
Figura 7. Dendrograma construído pelo programa GelComparII através do método UPGMA, referente aos padrões de bandas gerados por amplificação utilizando-se o *primer* GACA4 (microsatélite). Em verde, destaque para o grupo I, em vermelho para o grupo II e em azul, para o grupo III.

4.2.2 Genotipagem por RAPD

A genotipagem por RAPD, utilizando o *primer* B14, revelou um padrão de bandas com maior poder discriminatório quando comparado com a técnica de microssatélite, sendo possível detectar maiores diferenças intraespecíficas entre as cepas, o que caracteriza esta técnica como satisfatória na realização de genotipagem. A análise visual do padrão de bandas também revela uma grande similaridade entre todos os isolados (incluindo as cepas do Rio de Janeiro), e um padrão genético distinto para a cepa de referência ATCC10571 (Figura 8).



B



C

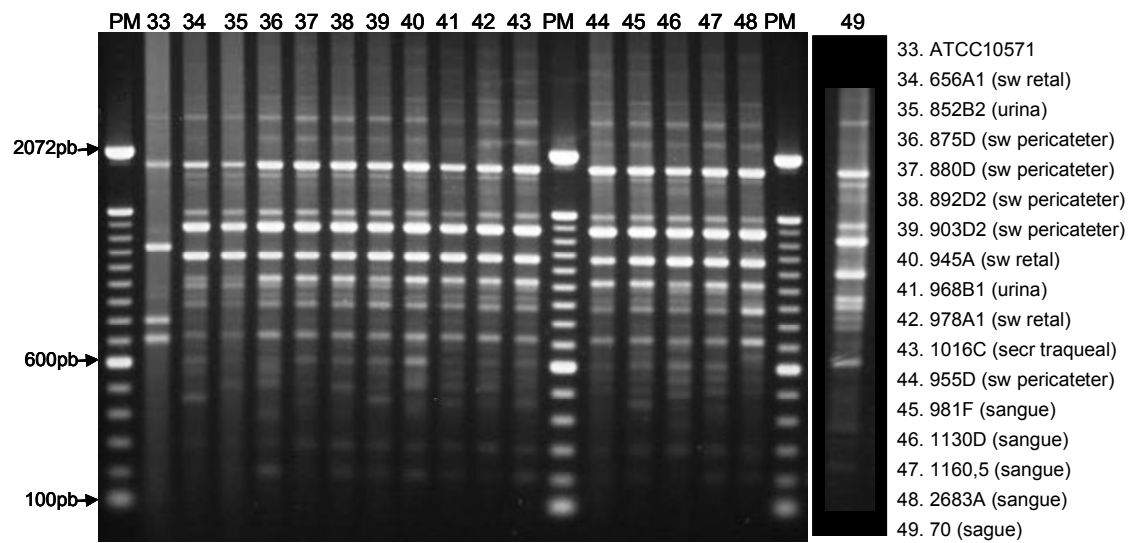


Figura 8 (A, B e C): Genotipagem por RAPD das amostras clínicas de *C. rugosa* amplificadas com o *primer* B14. PM= Marcador de peso molecular.

Através do dendrograma gerado pelo método de RAPD, foi possível observar uma similaridade $\geq 90\%$ entre todos os isolados clínicos do presente estudo, e de 87% entre estes e a cepa de referência ATCC10571. Esta técnica apresentou maior poder discriminatório quando comparada à metodologia do microssatélite, revelando microvariações entre as cepas, como pode ser observado na Figura 9. Interessantemente, foi possível observar que as cepas que somente colonizaram os pacientes (Grupo I) agruparam-se em sua maioria no clado B, com 93,5% de semelhança, enquanto que o clado A reuniu somente cepas de pacientes que desenvolveram candidemia.

Com relação aos diferentes períodos avaliados, tanto a técnica de RAPD quanto a de microssatélite, não foram capazes discriminar cepas isoladas em 1995/96 das que foram isoladas em 2001/02, uma vez que ambas apresentaram alta similaridade entre si, e agruparam-se nos mesmos clusters.

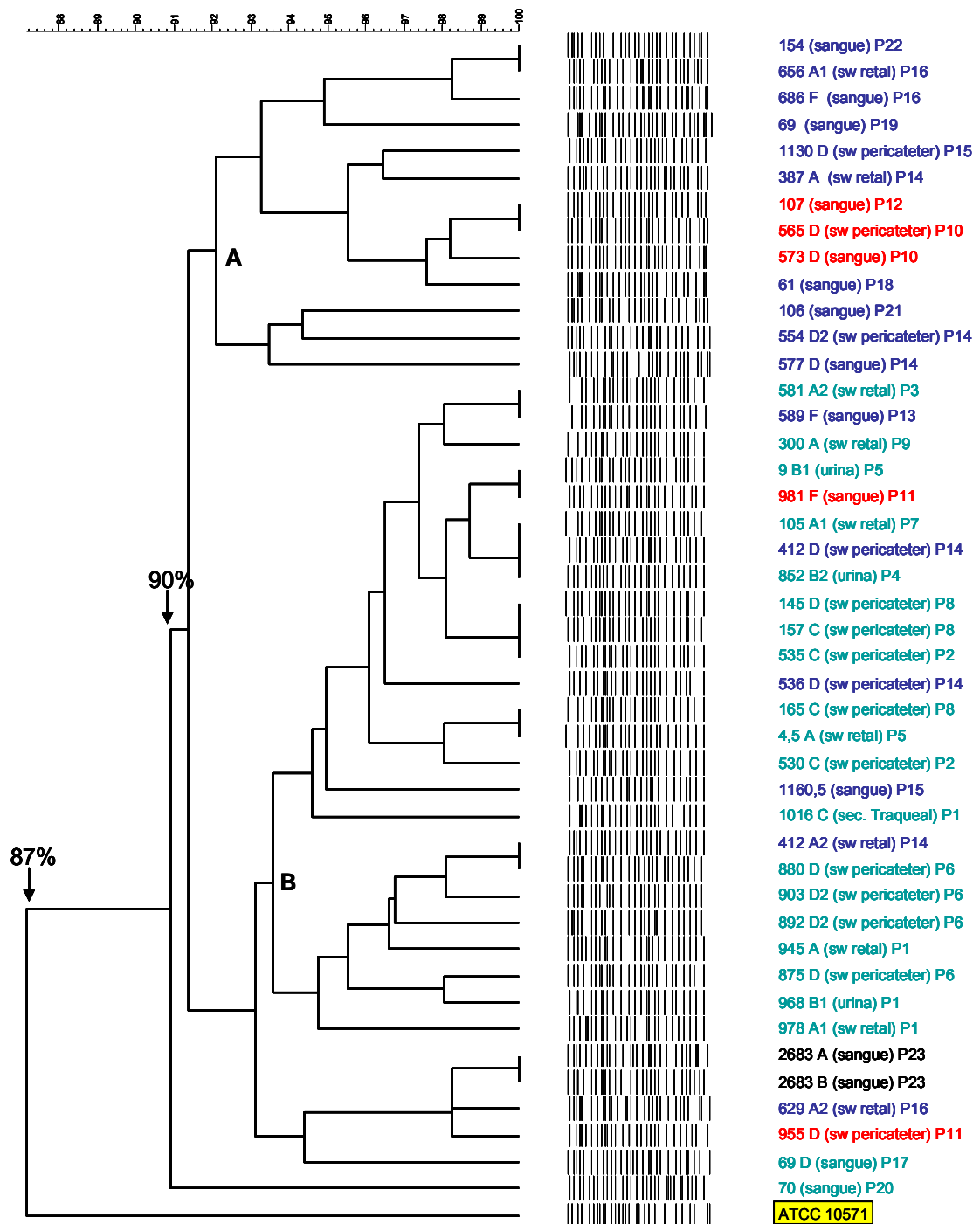
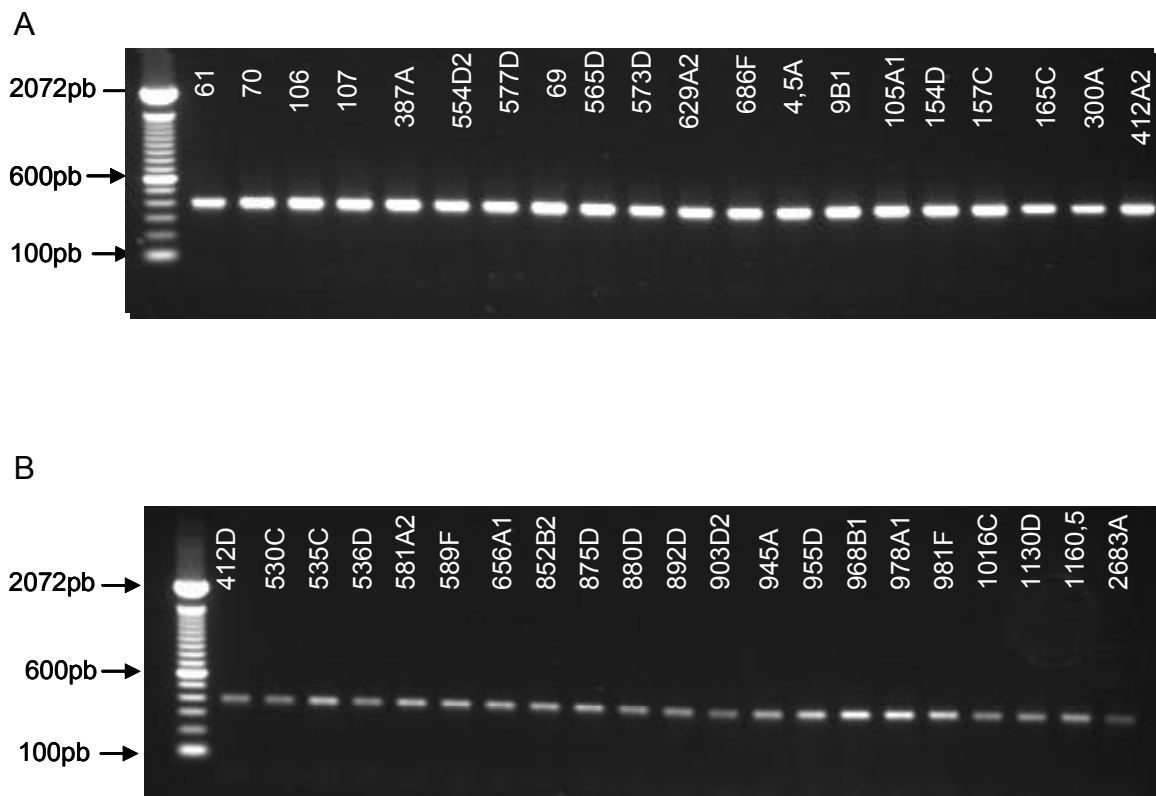


Figura 9. Dendrograma construído pelo programa GelComparII através do método UPGMA, referente aos padrões de bandas gerados por amplificação utilizando-se o *primer* B14 (RAPD). Em verde, destaque para o grupo I, em vermelho para o grupo II e em azul, para o grupo III.

4.3 Sequenciamento da região ITS (rDNA)

O DNA das amostras foi amplificado com os *primers* universais para fungos ITS1 e ITS4, gerando bandas intensas e com aproximadamente 360pb, como pode ser visualizado na Figura 10. Não foi visualizada nenhuma banda indicativa de contaminação nos controles negativos. Os produtos de PCR foram sequenciados e a análise destas sequências foi realizada no banco genômico disponível no site “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) com a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).



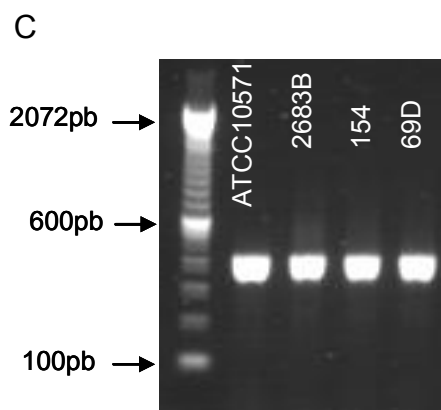


Figura 10 (A, B e C): Gel de agarose 1,2% dos produtos amplificados com os primers ITS1 e ITS4. PM= Peso Molecular.

A análise do sequenciamento identificou todas as amostras como sendo *Candida rugosa*, embora o índice de identidade tenha variado. Todos os isolados revelaram um índice de identidade máxima variando de 89% a 93% com as amostras de *C. rugosa* depositadas no banco, enquanto que a cepa controle ATCC10571 apresentou identidade máxima de 99% com as mesmas. De modo geral, todas as amostras apresentaram valores de *E-value* e porcentagem de cobertura satisfatória para dar credibilidade à análise (Tabela 4).

Após a edição das sequências de DNA e a montagem da sequência consenso de cada amostra, uma árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbor Joining (Figura 11), o qual cria árvores filogenéticas a partir de uma matriz de distâncias e de acordo com o princípio da evolução mínima (soma total do comprimento de seus ramos).

Tabela 4: Dados referentes ao seqüenciamento da região ITS (rDNA).

Isolado	Descrição	Porcentagem De Cobertura	Máxima Identidade	E-value	Número de Acesso*
61	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	8e-129	EF197805.1
70	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	8e-134	AY500374.1
106	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	2e-130	AY500374.1
107	<i>C. rugosa</i>	99%	90%	8e-134	AY500374.1
154	<i>C. rugosa</i>	100%	89%	2e-120	AY500374.1
387A	<i>C. rugosa</i>	93%	91%	8e-124	AM711371.1
554D2	<i>C. rugosa</i>	99%	90%	7e-135	AY500374.1
577D	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	8e-134	AY500374.1
69	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	1e-136	AY500374.1
565D	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	8e-134	AY500374.1
573D	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	1e-132	AY500374.1
629A2	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	1e-131	AY500374.1
686F	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	5e-131	AY500374.1
69D	<i>C. rugosa</i>	100%	89%	2e-115	EF197805.1
2683B	<i>C. rugosa</i>	99%	89%	8e-124	EF197805.1
ATCC	<i>C. rugosa</i>	100%	99%	0.0	AY500374.1
4,5A	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	3e-133	AY500374.1
9B1	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	5e-136	AY500374.1
105A1	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	1e-132	AY500374.1
145D	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	8e-134	AY500374.1
157C	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	6e-135	AY500374.1
165C	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	5e-131	AY500374.1
300A	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	1e-136	AY500374.1
412A2	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	1e-131	AY500374.1
412D	<i>C. rugosa</i>	92%	92%	4e-111	FM173089.1
530C	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	9e-134	AY500374.1
535C	<i>C. rugosa</i>	99%	90%	1e-131	AY500374.1
536D	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	2e-135	AY500374.1
581A2	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	2e-135	AY500374.1
589F	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	4e-132	AY500374.1
656A1	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	1e-136	AY500374.1
852B2	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	1e-137	AY500374.1
875D	<i>C. rugosa</i>	99%	90%	3e-133	AY500374.1
880D	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	4e-132	AY500374.1
892D2	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	2e-135	AY500374.1
903D2	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	1e-131	AY500374.1
945D	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	1e-131	AY500374.1
955D	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	2e-135	AY500374.1
968B1	<i>C. rugosa</i>	95%	91%	2e-129	EF197805.1
978A1	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	1e-136	AY500374.1
981F	<i>C. rugosa</i>	100%	91%	7e-140	AY500374.1
1016C	<i>C. rugosa</i>	100%	90%	5e-136	AY500374.1
1130D	<i>C. rugosa</i>	99%	90%	7e-130	AY500374.1
1160,5	<i>C. rugosa</i>	99%	90%	2e-130	AY500374.1
2683A	<i>C. rugosa</i>	88%	93%	2e-129	EF197805.1

* Número de acesso das seqüências depositadas no banco genômico do NCBI (disponível em: <http://ncbi.nlm.nih.gov>)

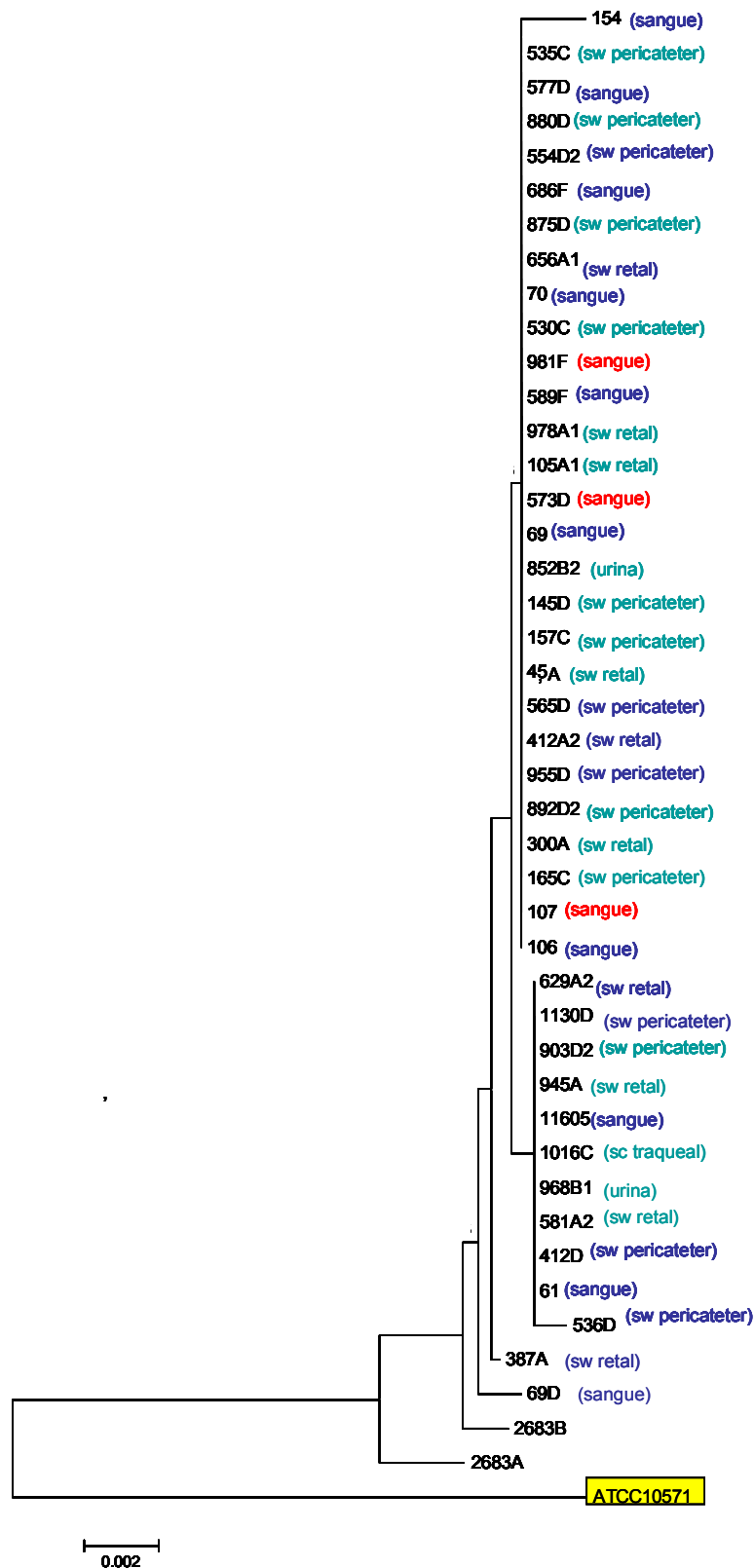


Figura 11: Árvore filogenética dos isolados clínicos de *C. rugosa*, baseada nas sequências de ITS rDNA, obtidas pelo método de Neighbor Joining.

A partir da análise do relacionamento genético dos isolados por meio do seqüenciamento da região ITS, também é possível notar que os isolados clínicos são bastante relacionados, reunindo-se basicamente em dois grandes clados distintos, cada um clusterizando cepas altamente relacionadas, mas não necessariamente pertencentes a um mesmo grupo (de colonização ou candidemia). As cepas 2683A e 2683B, ambas pertencentes a um Hospital do Rio de Janeiro, apresentam pequena variabilidade genética quando comparadas aos isolados avaliados no presente estudo, o que pode ser explicado pela distância geográfica existente entre as instituições em que as cepas foram obtidas. Confirmando os achados obtidos pelas técnicas de microsatélite e RAPD, novamente torna-se bastante evidente a distância filogenética em que a cepa ATCC10571 encontra-se das demais, posicionando-se em um ramo bastante distinto dos outros isolados (Figura 11).

4.4 Avaliação fenotípica dos isolados clínicos quanto aos fatores de virulência

4.4.1 Determinação da produção de proteinase de *C. rugosa*

Para induzir a produção de proteinases pelos isolados, células de *C. rugosa* foram cultivadas durante 72h em YCB+BSA, o qual apresenta albumina como única fonte de nitrogênio. Foram quantificados os produtos

solúveis dissolvidos em TCA resultantes da degradação de proteínas após o período de incubação do sobrenadante das culturas em BSA preparado em tampão citrato pH 3,8 por 1h. A atividade de proteinase foi expressa em função do crescimento das culturas em YCB+BSA (DO_{600nm}).

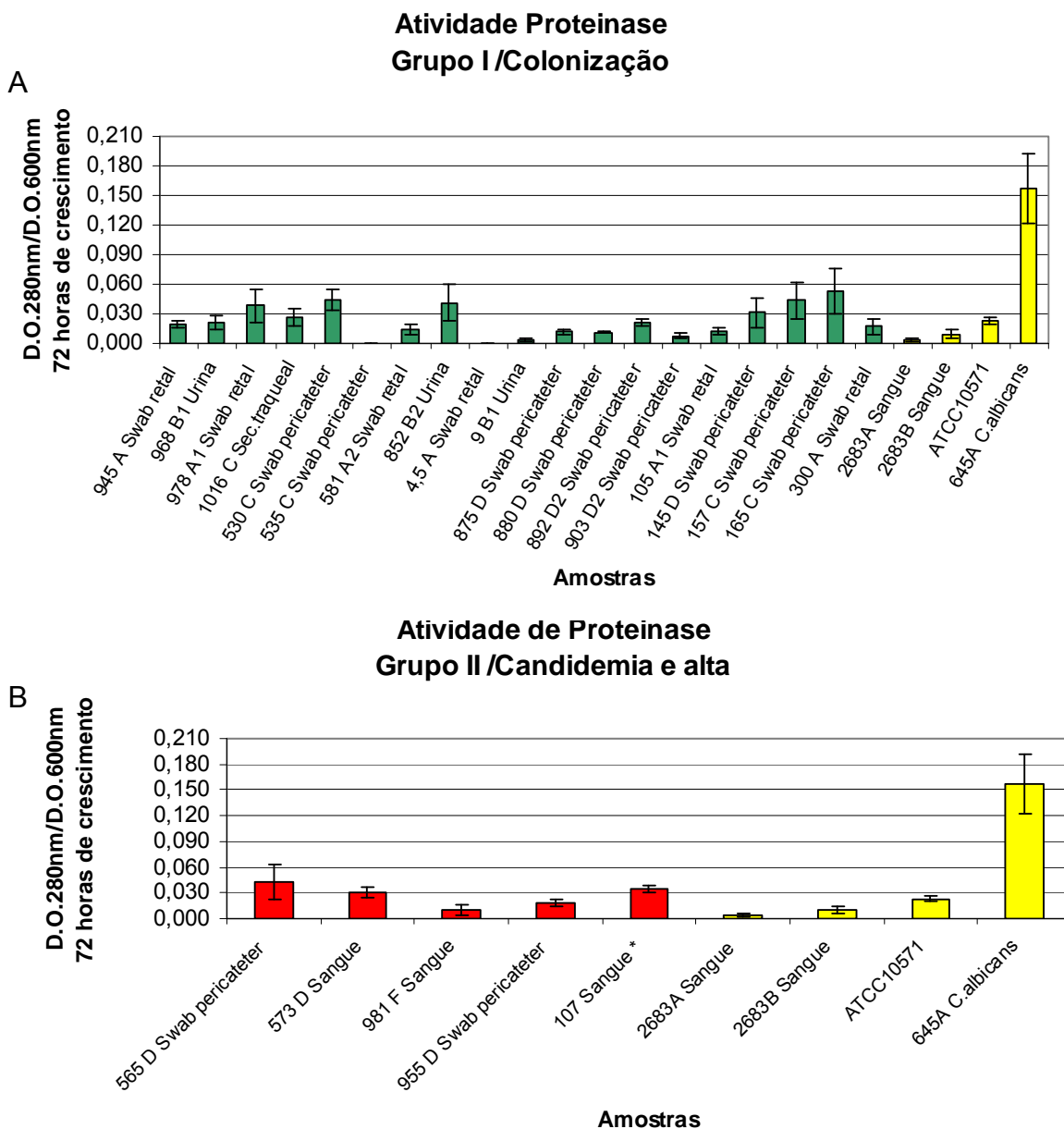
Para efeitos comparativos, serão apresentados dados referentes à cepa 645A, de *C. albicans*, altamente produtora de proteinase. Esta cepa também pertence ao banco de microrganismos do LEMI, e foi caracterizada em estudo paralelo sobre os fatores de virulência de *C. albicans* (dados não publicados).

Por serem as cepas, em sua maioria, não produtoras ou baixas produtoras de proteinase, não foi possível observar nenhuma diferença significativa entre os três grupos. Entretanto, o único isolado com alta atividade de proteinase tratava-se de cepa colhida de corrente sanguínea de paciente que teve mortalidade atribuída à candidemia por *C. rugosa* (Figura 12).

Uma análise geral da distribuição dos valores da atividade de proteinase revelou que quase todas as cepas de *C. rugosa*, bem como as cepas do Rio de Janeiro, apresentaram baixos níveis de produção de proteinase, com valores $\leq 0,05$, quando comparadas ao isolado controle de *C. albicans* (Figura 13). A cepa de referência ATCC10571 mostrou-se baixa produtora de protease, com valores em torno de 0,03. Cinco isolados, 4.5A e 535C, dos pacientes somente colonizados, e 69, 629A2 e 1160.5, do grupo com candidemia e óbito, apresentaram atividade de proteinase negativa. Uma única cepa clínica apresentou-se como alta produtora de proteinase, o isolado

106, de sangue e do grupo candidemia e óbito, expressando um valor de atividade de proteinase de 0,17.

A análise comparativa da atividade de proteinase entre as cepas isoladas nos anos de 1995/96 e 2001/02 revelou que amostras pertencentes ao primeiro grupo apresentaram maior atividade de proteinase quando comparadas às do segundo grupo ($p < 0,05$), o que pode ser observado na figura 14. O mesmo não foi observado ao se fazer uma comparação das amostras isoladas de sangue com as dos demais sítios.



C

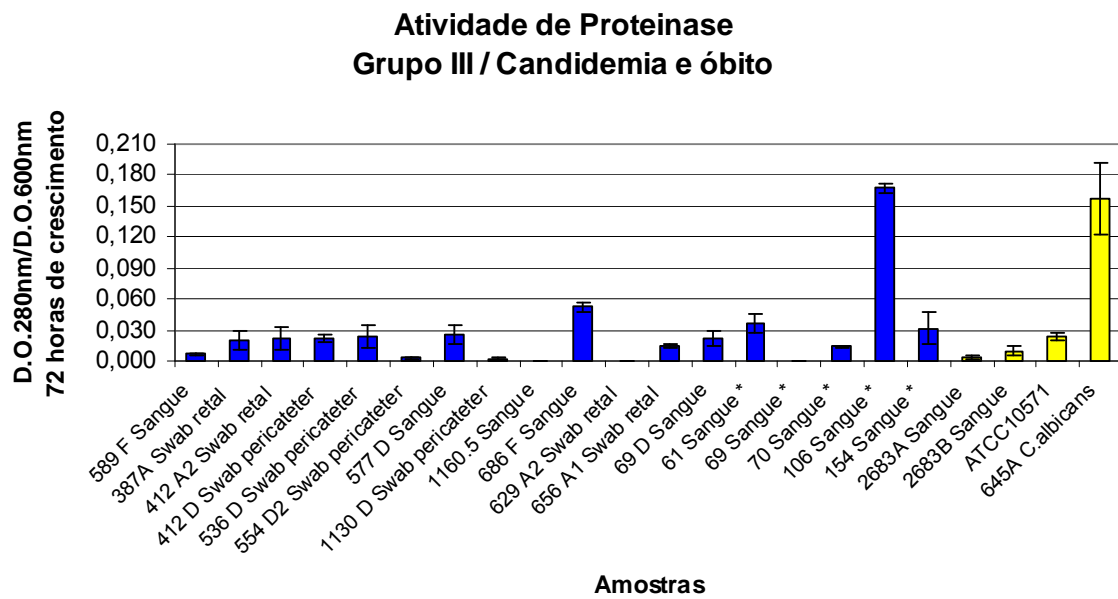


Figura 12 (A, B e C). Atividade de proteinase de isolados clínicos de *C. rugosa* (Grupos I, II e III) com células crescidas em YCB+BSA por 72 h, 30 °C a 200 rpm. As barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. * cepas isoladas em 1995/1996

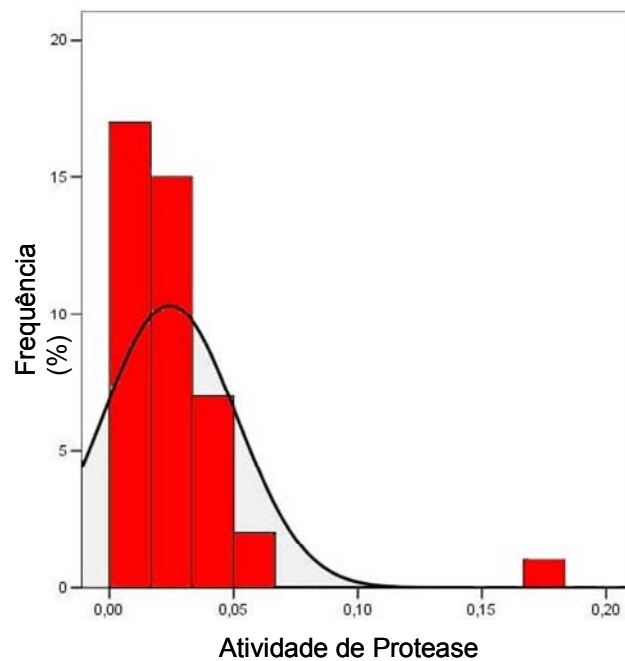


Figura 13: Distribuição dos 45 isolados de *C. rugosa* segundo a atividade de proteinase, expressa de acordo com a razão D.O.280nm/D.O.600nm.

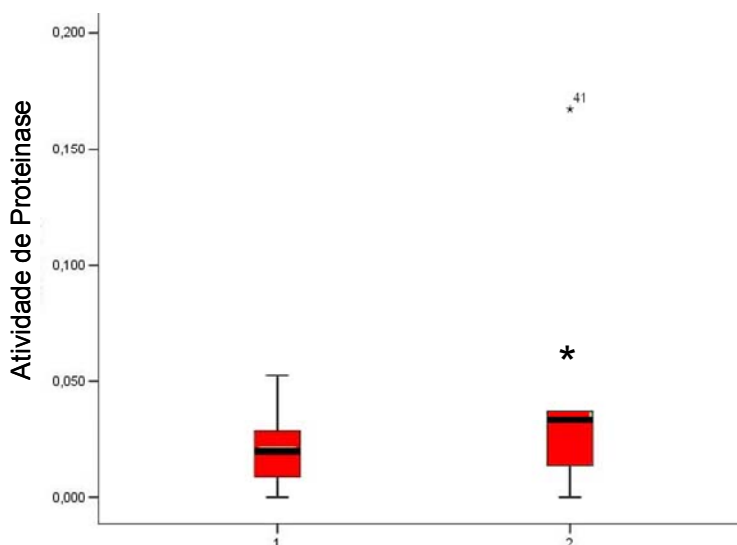


Figura 14: Gráfico-caixa (*Boxplot*) das amostras de *C. rugosa* isoladas nos anos 2001/02 (1) e nos anos 1995/96 (2). O símbolo “*” indica que existe diferença significativa entre os valores de produção de proteinase entre os dois grupos ($p < 0,05$). *41 = *outlier* representado pelo isolado 106.

4.4.2 Determinação da produção de fosfolipase em *C. rugosa*

Para a indução da atividade de fosfolipase nos isolados do presente estudo, as cepas foram crescidas em meio ágar fosfolipase, onde os fosfolipídeos contidos na gema de ovo são degradados pela produção desta enzima pelo microrganismo, resultando em ácidos graxos. Os ácidos graxos formam um complexo de precipitação com o cálcio também presente no meio de cultura, resultando em um halo ao redor da colônia.

Neste ensaio, observou-se que todas as amostras, incluindo a ATCC10571 e os controles externos 2683A e 2683B, apresentaram atividade de fosfolipase negativa. Embora houvesse o crescimento da colônia no meio indutor, não houve a formação de halo ao redor da mesma, o que indica a

natureza não produtora de fosfolipase desses isolados. Como controle de qualidade do meio de cultura, foi utilizada uma cepa de *C. albicans* do nosso banco de microrganismos que apresentou atividade de fosfolipase positiva.

4.4.3 Determinação da produção de lipase em *C. rugosa*

Com a finalidade de se verificar a produção de lipase pelos isolados clínicos, foram realizados 2 ensaios, um qualitativo e um quantitativo: o primeiro foi realizado em placas de Petri com meio contendo ágar, o corante rodamina B e óleo de oliva, e o segundo em meio líquido, também com óleo de oliva, verificando a atividade enzimática pela hidrólise do *p*-nitrofenil laurato (pNPL). O óleo de oliva é um excelente indutor de produção de lipase devido à grande porcentagem de trioléina presente em sua composição, que é o substrato natural para as lipases.

Todas as cepas analisadas cresceram no meio contendo azeite de oliva e rodamina B, apresentando o diâmetro médio da colônia de 1,2cm ($\pm 0,11$). A produção de lipase em placas de Petri foi confirmada pela presença de halos alaranjados, fosforescentes ao UV, após 96 horas de incubação a 30°C (Figura 15).

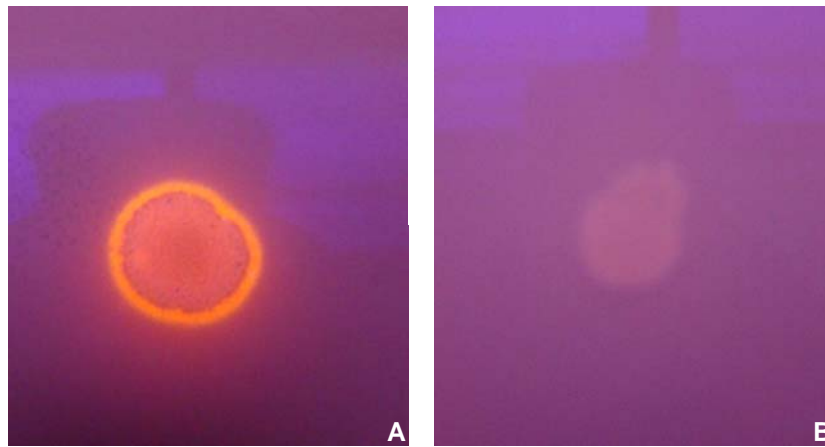


Figura 15: Amostras 1016C (A) e ATCC10571 (B), exemplificando cepas produtoras e não produtoras de lipase, respectivamente, em meio ágar-Rhodamina B, visualizadas sob incidência de luz UV.

A determinação da razão entre a medida do halo de hidrólise e a medida da colônia (H/C), mostrou uma variação de razão mínima de 1,0 e máxima de 1,7. As cinco maiores razões (H/C) foram obtidas com as cepas 1016C e 535C (colonização), 565D (candidemia e alta) e 106 e 577D (candidemia e óbito), as quais foram as maiores produtoras de lipase. As cepas 4.5A e 968B1, ambas de pacientes somente colonizados, mostraram-se como não produtoras de lipase. A cepa de referência ATCC10571 também foi classificada como não produtora de lipase, uma vez que obteve o valor da razão H/C igual a 1 (Figura 16).

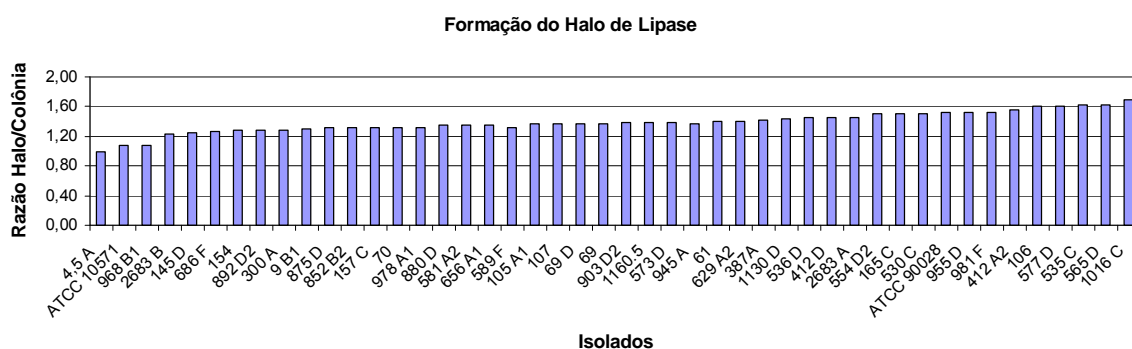
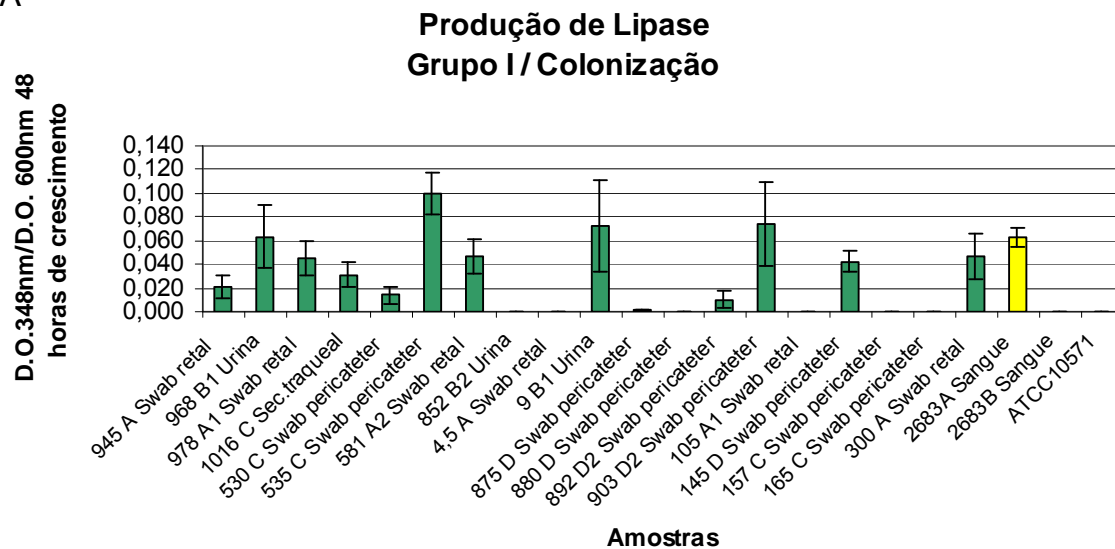


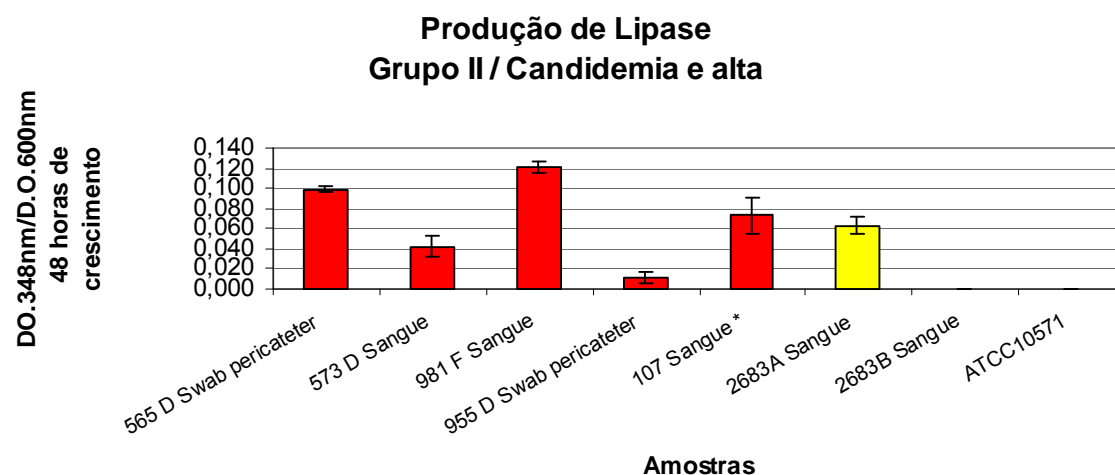
Figura 16: Gráfico da razão entre o diâmetro do halo de hidrólise da lipase e o da colônia (H/C) das 45 amostras de *C. rugosa* crescidas em meio contendo ágar, óleo de oliva e Rhodamina B.

A Figura 17 ilustra a produção de lipase das cepas de acordo com seus respectivos grupos. A análise quantitativa de produção de lipase, realizada pelo método da hidrólise do pNPL, mostrou que os valores variaram muito entre as amostras, conforme pode ser visto no histograma de distribuição das mesmas (Figura 18). Um panorama geral da população em estudo revelou que 18% das cepas não são produtoras de lipase, 24% são baixas produtoras (valores menores que 0,045), 31% são médias produtoras (entre 0,045 e 0,07) e 27% são altas produtoras (acima de 0,07).

A



B



C

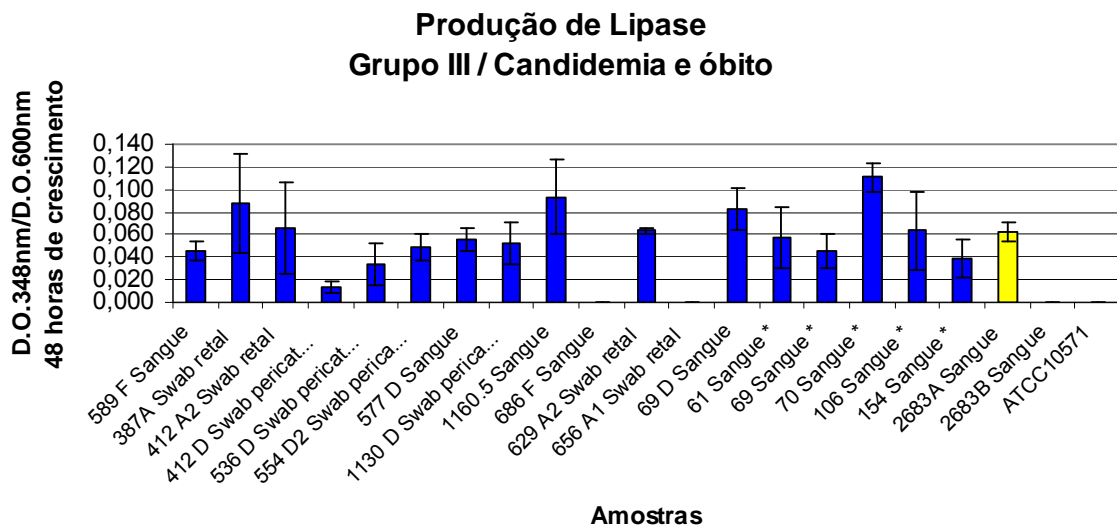


Figura 17 (A, B e C). Produção de lipase dos isolados de *C. rugosa* (Grupos I, II e III) com células crescidas em meio indutor contendo óleo de oliva por 48h, 30 °C a 150 rpm. As barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes. * cepas isoladas em 1995/1996

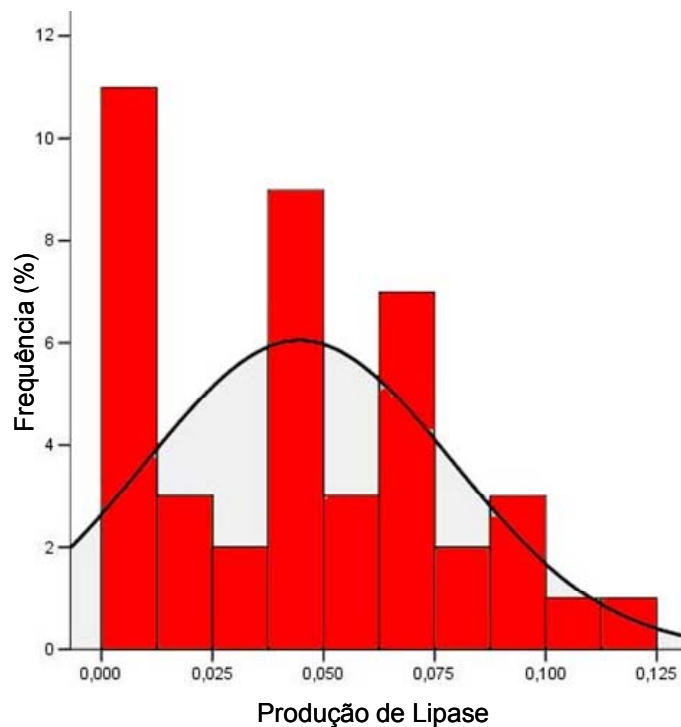


Figura 18: Distribuição dos 45 isolados de *C. rugosa* segundo a produção de lipase, expressa em função da razão da absorvância a 348nm, que representa o produto da hidrólise do pNPL, sobre a absorvância a 600nm, que representa o crescimento celular no meio indutor.

O grupo I, dos isolados de colonização, foi o que obteve menor média de produção de lipase (0,030), e caracterizou-se por ser menor produtor de lipase do que o grupo II ($p < 0,05$), causadores de candidemia e alta. As cepas do grupo II foram as maiores produtoras de lipase, expressando uma média de 0,069, contudo não se diferenciaram estatisticamente das cepas do grupo III, isolados obtidos de pacientes que apresentaram candidemia e morte, as quais obtiveram uma média de 0,058.

Também não foi encontrada nenhuma diferença significativa na análise estatística quando o grupo de cepas isoladas em 1995/96 foi comparado com o das cepas isoladas em 2001/02.

O grupo I caracterizou-se por abranger seis das 8 cepas não produtoras de lipase, sendo elas 4.5A, 105A1, 157C, 165C, 852B2 e 880D. As cepas controle ATCC10571 e 2683A também foram classificadas como não produtoras. O grupo II caracteriza-se por ser um grupo pequeno, e foi composto em sua maioria por cepas altamente produtoras de lipase (107, 565D e 981F) sendo as outras duas, 573D e 955D, consideradas como baixas produtoras. O grupo III é o mais heterogêneo, englobando cepas das quatro categorias, embora mais de 70% das cepas sejam consideradas como médias e altas produtoras de lipase, o que justifica alto valor da sua média. Os grupos II e III englobam os isolados obtidos de pacientes com candidemia, sugerindo uma importância deste fator de virulência no desfecho clínico do paciente colonizado por *C. rugosa* em desenvolver doença.

Além deste aspecto, como pode ser observado na Figura 19, foi possível verificar que as cepas isoladas de sangue são maiores produtoras de

lipase do que as isoladas de outros sítios ($p < 0,05$), sugerindo altamente o papel desta enzima no estabelecimento da infecção por *C. rugosa*.

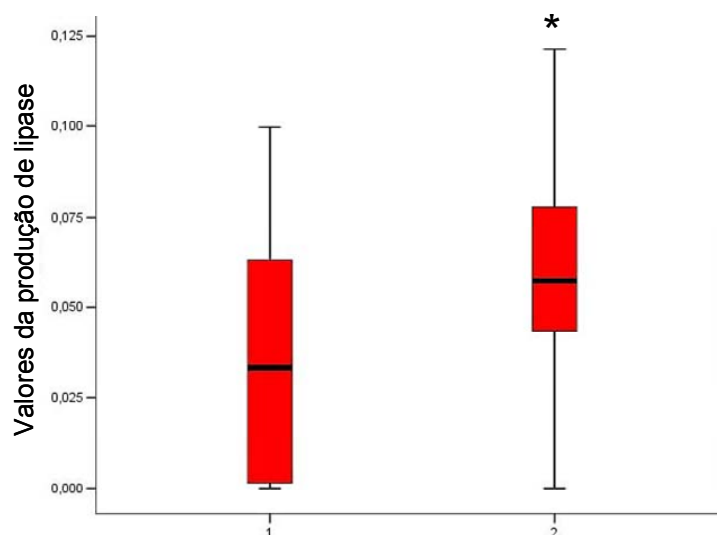


Figura 19: Gráfico-caixa (*Boxplot*) das amostras de *C. rugosa* isoladas de sangue (2) e dos demais sítios (1). O símbolo “*” indica que existe diferença significativa entre os valores de produção de lipase entre os dois grupos ($p < 0,05$).

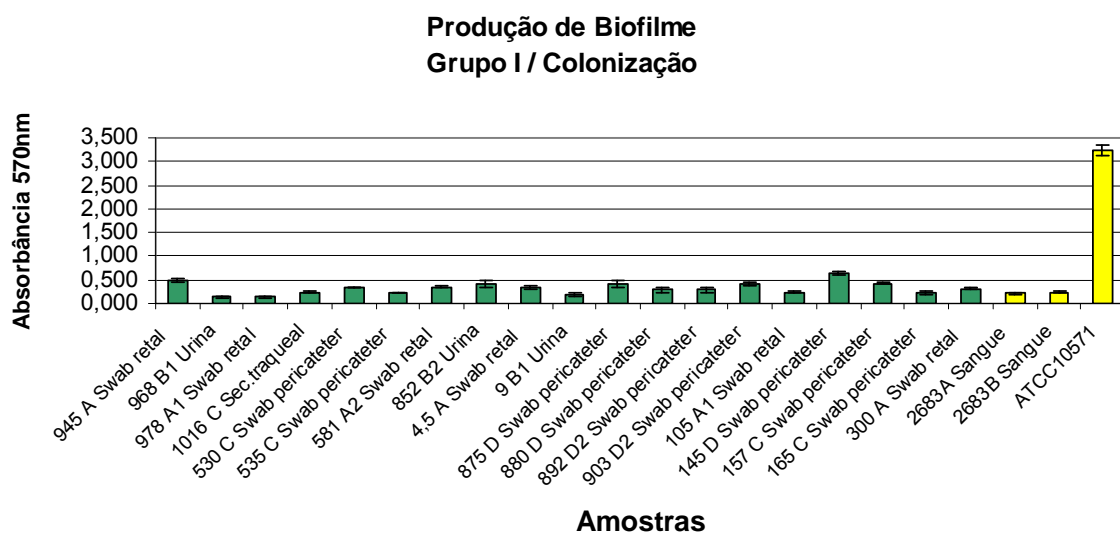
4.4.4 Avaliação da formação de biofilme em *C. rugosa*

A formação de biofilme foi avaliada para todas as cepas de *C. rugosa* selecionadas para este estudo, utilizando-se uma adaptação da metodologia preconizada por Jin et al. (2003). A formação do biofilme foi induzida em placas de poliestireno a 37°C por 48 horas. Após a fase de adesão das células à placa, as mesmas foram lavadas com o intuito de retirar células

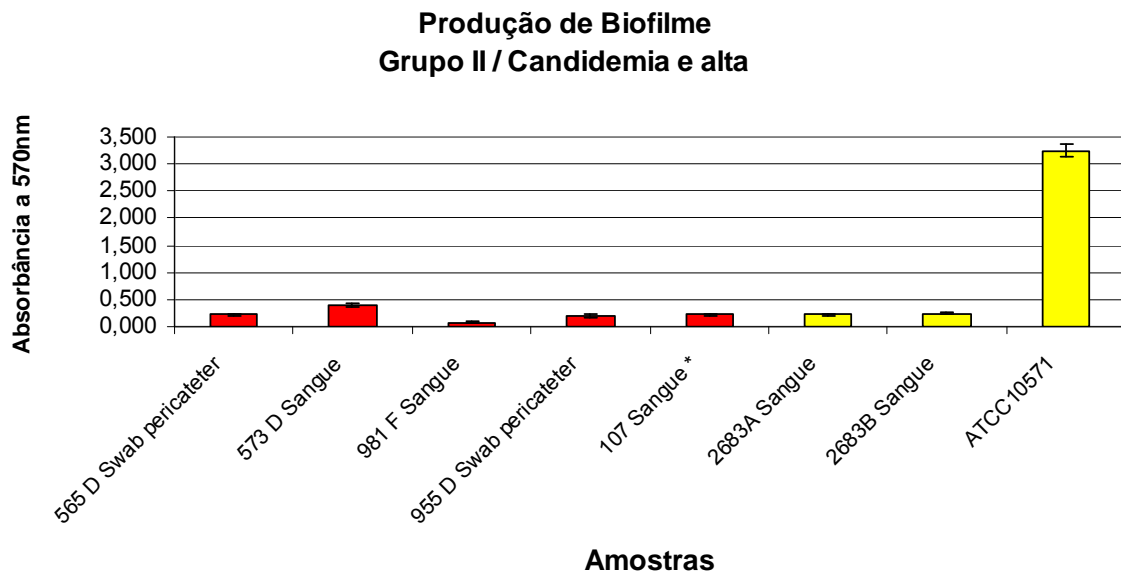
não aderidas. Subsequentemente, realizou-se a coloração do biofilme maduro com cristal violeta, descoloração com álcool 95% e leitura espectrofotométrica a um comprimento de onda de 570nm, a fim de quantificar indiretamente a biomassa presente no biofilme.

A comparação da produção de biofilme entre os três grupos não revelou nenhuma diferença significativa entre eles para esse parâmetro (Figura 20). Uma análise geral da Figura 21 ressalta que a população em estudo expressou baixos valores de produção de biofilme (de 0,1 a 0,4 de absorbância). Os isolados que mais produziram biofilme ($> 0,4$) encontram-se em sua maioria inseridas no grupo I (145D, 157C, 852B2, 875D, 903D e 945A), o qual apresentou maior média entre os três, e somente os isolados 589F e 1160,5 no grupo III. A cepa de referência ATCC10571 foi a única que apresentou um valor elevado na produção do biofilme ($> 3,0$).

A



B



C

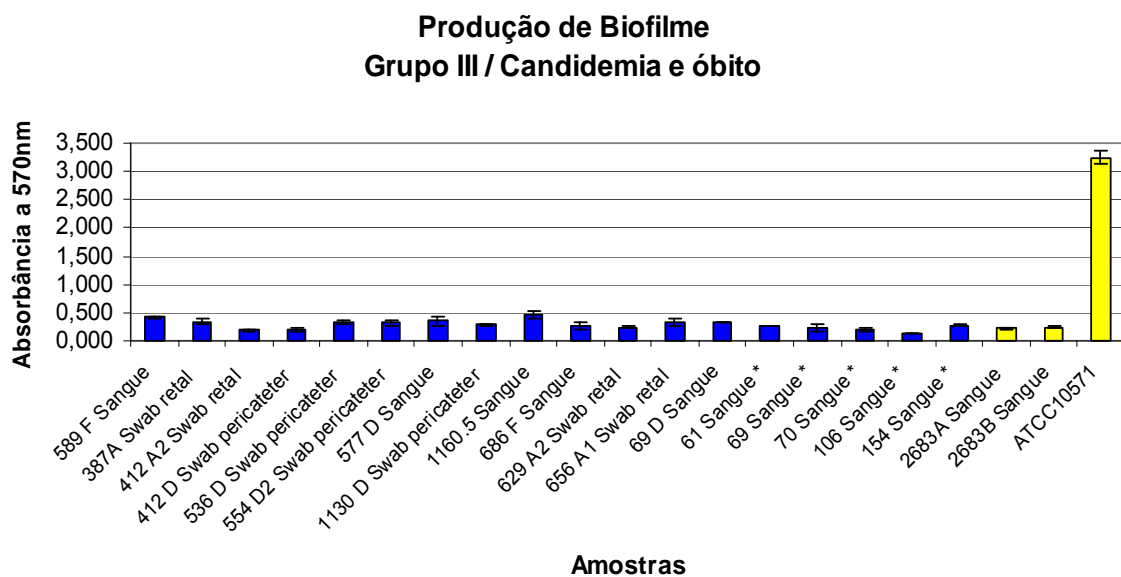


Figura 20 (A, B e C): Produção de biofilme avaliada em isolados clínicos de *C. rugosa* (grupos I, II e III). As barras representam o desvio padrão do ensaio realizado em triplicata. * cepas isoladas nos anos de 1995/1996

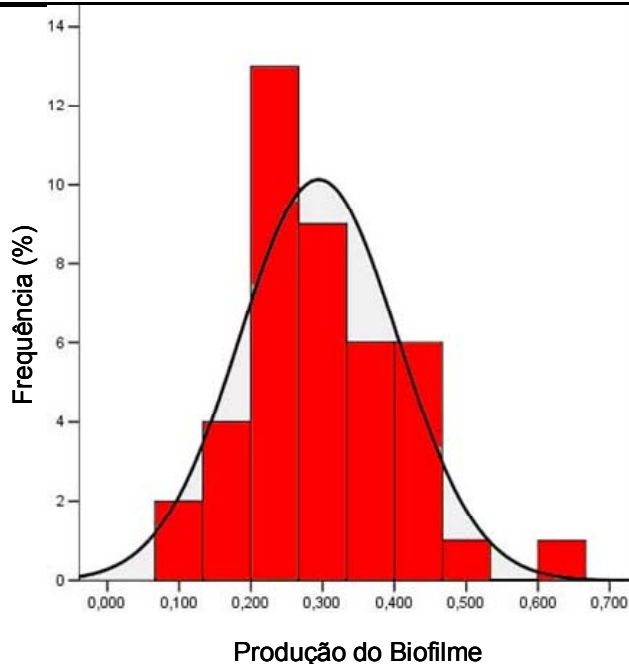


Figura 21: Distribuição dos 45 isolados de *C. rugosa* segundo a produção de biofilme, expressa de acordo com a leitura da Absorbância a 570nm de comprimento de onda.

Também não foi observada diferença significativa nos valores de produção de biofilme com relação aos isolados de sangue quando comparados com os dos demais sítios, bem como as cepas isoladas em 1995/96 com as isoladas em 2001/02.

4.4.5 Compilação dos resultados obtidos da avaliação dos fatores de virulência de *C. rugosa*

A tabela 5 estabelece uma comparação das propriedades fenotípicas de todos os isolados pertencente aos três grupos propostos de acordo com o desfecho clínico do paciente. Foi possível notar que houve grande variabilidade nos resultados obtidos, não sendo possível estabelecer uma correlação direta entre todos os fatores avaliados e o desfecho clínico dos

pacientes. Contudo, destacou-se o fato de que a cepa de referência de *C. rugosa* ATCC10571 mostrou valores muito diferentes dos da população em estudo, principalmente nas avaliações de produção de lipase e biofilme.

Tabela 5: Aspecto geral das propriedades fenotípicas dos isolados clínicos de *C. rugosa*, distribuídas em três grupos caracterizados por diferentes desfechos clínicos dos pacientes.

Grupo	Produção de Proteinase	Produção de Fosfolipase	Produção de Lipase	Produção de Biofilme
Colonização	Baixa	Não produtores	Baixa	Baixa
Candidemia e alta	Baixa	Não produtores	Média e alta	Baixa
Candidemia e óbito	Baixa ou Alta	Não produtores	Média e alta	Baixa
ATCC10571	Baixa	Não produtora	Não Produtora	Alta

É importante destacar que a cepa 106, isolada de sangue e pertencente ao grupo de pacientes que desenvolveram candidemia e evoluíram a óbito, foi a única amostra clínica que expressou alta atividade de proteinase, bem como altos valores de lipase. Vale também ressaltar que altos valores de atividade de lipase foram obtidos principalmente por cepas isoladas de sangue, sendo este um indício importante na sua atuação como fator de virulência de *C. rugosa*.

Uma análise comparativa da média dos valores dos três fatores de virulência que foram expressos pelos isolados de *C. rugosa*, sendo eles: a atividade de proteinase, a produção de lipase e a formação de biofilme, realizada em cepas de colonização provenientes de pacientes que foram somente colonizados ou de pacientes com candidemia, mostrou que não há

diferença significativa na expressão destes fatores de virulência entre estas duas populações.

Por sua vez, para analisar a hipótese de que poderia haver um incremento na expressão dos fatores de virulência com o progresso da infecção invasiva ao longo da internação por isolados de *C. rugosa*, foram comparados os valores médios destes três fatores de virulência expressos entre as cepas de sangue e aquelas de colonização provenientes dos pacientes que desenvolveram candidemia. Nesta análise foi possível observar que todos os valores médios destes fatores foram maiores em isolados de sangue do que em isolados de colonização. Embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa, ela possivelmente aponta uma tendência de ganho de virulência ao longo da infecção, em que cepas de sangue sejam mais adaptadas do que as cepas de colonização, causando assim a candidemia.

4.5 Avaliação do perfil de susceptibilidade das cepas de *C. rugosa* aos antifúngicos pelo método de microdiluição em caldo

Os testes de susceptibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, voriconazol, caspofungina e anidulafungina foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, conforme a norma de padronização publicada no documento M27-A2 pelo CLSI (2008).

Além dos isolados clínicos avaliados neste estudo, organismos controle de *C. parapsilosis*, ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram incluídos em cada dia de experimento. Todos os valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos para os organismos controles foram compatíveis com aqueles esperados pela metodologia do CLSI 2002, o que garante a confiabilidade dos valores obtidos para as amostras testes.

A Tabela 6 ilustra os valores das CIMs para todas as drogas testadas (fluconazol, voriconazol, anfotericina B, caspofungina e anidulafungina), e seus respectivos CIM50 (concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas) e CIM90 (concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas).

Tabela 6: Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) apresentadas pelos isolados de *C. rugosa* deste estudo.

Droga	Variação da CIM			Sensibilidade
	(ug/mL)	CIM ₅₀	CIM ₉₀	
Anfotericina B	0,25-1	0,25	0,5	100
Fluconazol	1,0-64	16	64	38*
Voriconazol	0,03-1	0,25	0,5	100
Anidulafungina	0,06-0,5	0,125	0,25	100
Caspofungina	0,25-2	1	1	100

* 42% das cepas são SDD para o fluconazol

Para a anfotericina B, nenhuma cepa apresentou valores de CIM superiores a 1 µg/mL, sendo as mesmas, portanto, sensíveis à essa droga.

Quando testadas com o fluconazol, somente 38% das cepas tiveram valores de CIMs $\leq 8\mu\text{g/mL}$, sendo classificadas como sensíveis, e 42% das cepas exibiram susceptibilidade dose dependente (SDD) à essa droga (CIM entre 16 e $32\mu\text{g/mL}$), ressaltando considerável resistência aos azólicos para esta espécie. Em relação ao voriconazol, todos os isolados foram sensíveis, exibindo valores de CIM $\leq 1\mu\text{g/mL}$. Frente às equinocandinas, todos isolados apresentaram valores de CIM $< 2\mu\text{g/mL}$ para a anidulafungina, e $< 0,5\mu\text{g/mL}$ para a caspofungina, sendo sensíveis a ambas as drogas.

Não foram observadas quaisquer diferenças no padrão de susceptibilidade das cepas com relação aos grupos I, II e III. Ao analisar o agrupamento das cepas de acordo com o ano de isolamento, verificou-se que as cepas isoladas nos anos de 2001/02 exibiram valores de CIMs à caspofungina maiores do que os das cepas isoladas em 1995/96 ($p < 0,05$), mesmo sendo os dois grupos sensíveis à essa droga. Também foi possível observar que a cepa 154, do grupo de candidemia e óbito e isolada em 1995/96, apresentou os maiores valores de CIMs para as drogas anidulafungina, voriconazol, anfotericina B e fluconazol dentre as cepas isoladas nesse mesmo período. Dentre todos os isolados de sangue, foi possível verificar que a cepa 69D, do grupo candidemia e óbito, caracterizou-se por apresentar os maiores valores de CIM para as drogas anidulafungina, voriconazol, anfotericina B e fluconazol

5.0 DISCUSSÃO

Atualmente *C. rugosa* é descrita como um patógeno oportunista emergente, capaz de causar infecções de natureza invasiva no homem, e com frequência de isolamento aumentada em países da América Latina. Além disso, estudos revelam ser um patógeno que possui sensibilidade reduzida a antifúngicos azólicos, e, possivelmente, a anfotericina B, drogas estas amplamente utilizadas em terapia antifúngica no Brasil (Pfaller et al., 2006^a).

A ocorrência de inúmeros isolamentos de *C. rugosa* realizados no Hospital Terciário “Casa de Saúde Santa Marcelina”, localizado na cidade de São Paulo, evidenciou a importância em se estudar este patógeno, uma vez que se demonstrou o potencial desta levedura em habitar o ambiente hospitalar ao longo de vários anos, bem como de causar surtos e infecções sistêmicas em pacientes com saúde comprometida (Colombo et al., 2003).

Tal observação foi complementada através de um estudo de coorte longitudinal realizado durante o período de 18 meses (2001/02), incluindo 349 pacientes internados por diferentes doenças na UTI deste hospital, onde se verificou a ocorrência de 28,7% de colonização por *C. rugosa* nesses indivíduos, sendo que 14% deles evoluíram com candidemia (Rosas et al., 2004). Neste estudo, *C. rugosa* foi a segunda espécie de levedura mais isolada de diversos sítios dos pacientes em questão, totalizando 218 cepas, precedida somente de *C. albicans*. Até o presente momento, não existe nenhum relato na literatura sobre alguma instituição médica em que se tenha isolado *C. rugosa* com tamanha frequência, e em um curto espaço de tempo, o que criou o cenário adequado para evidenciar a relevância deste estudo, bem como para a obtenção das cepas e informações clínicas dos pacientes necessárias para o projeto em questão.

Embora relatos de isolamento de *C. rugosa* sejam cada vez mais frequentes em diversas partes do mundo, poucos são os trabalhos na literatura que tenham evidenciado o caráter patogênico desta espécie. Assim sendo, é importante salientar o caráter inédito deste estudo em relação a três aspectos: I) trata-se do primeiro estudo de caracterização de virulência de *C. rugosa* a partir de isolados obtidos dentro de um cenário clínico bem detalhado com relação às condições clínicas e a evolução dos pacientes infectados; II) realizamos a caracterização mais ampla de atributos de virulência de *C. rugosa* já feita até o presente momento; III) avaliação de número robusto de cepas cuja tipagem molecular, em especial o sequenciamento da região ITS do rDNA, foi realizada.

Horvath et al. (2003) avaliou a habilidade de detecção de candidemia do sistema de hemocultura automatizado BACTEC 9240, inoculando diferentes espécies de leveduras em frascos BACTEC aeróbicos e anaeróbicos, com avaliação de crescimento por 21 dias. Decorrido o tempo de análise, o equipamento não detectou o crescimento da cepa de *C. rugosa* em ambos os frascos, porém, a mesma foi recuperada por meio de subcultivo após este prazo, o que indica que este patógeno pode estar presente no sangue e, devido a um crescimento mais lento, não ser detectado pelo equipamento em condições de incubação utilizadas na rotina.

De maneira geral, *C. rugosa* é uma levedura facilmente identificada pelo perfil bioquímico de assimilação de açúcares, porém, já existem relatos de técnicas de identificação que apresentam baixo poder discriminatório para esta espécie. Um estudo a respeito da acurácia de identificação do cartão colorimétrico para rápida identificação de leveduras do sistema VITEK 2 (Biomérieux, Etoile,

France) revelou falhas de identificação em 52% das cepas de *C. rugosa* avaliadas, sendo desaconselhável o seu uso na identificação desta espécie (Valenza et al., 2008). De acordo com Szabó et al. (2008), *C. rugosa* foi identificada erroneamente como *C. valida* por meio do kit de identificação Micronaut-Candida (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim, Germany), mesmo depois dos testes adicionais propostos por esse método.

Por meio destes relatos, pode-se afirmar que, possivelmente, o número de episódios de candidemia por *C. rugosa* esteja sendo subestimado, seja pela dificuldade de isolamento, ou pela falha na identificação desta espécie. Neste projeto, todas as cepas foram corretamente identificadas como *C. rugosa* por meio da utilização do kit ID32C (Biomérieux, Etoile, France), exceto a cepa de sangue 106, isolada do grupo de pacientes com candidemia e óbito, que foi identificada pelo método clássico de assimilação e fermentação de açúcares. Assim sendo, este kit mostrou-se como uma técnica altamente recomendável e eficaz na identificação de *C. rugosa*. Contudo, nos laboratórios em que o ID32C não esteja disponível para a identificação de leveduras, é provável que o diagnóstico desta levedura esteja comprometido.

Como mencionado anteriormente, atualmente, existem poucos estudos *in vivo* e *in vitro* sobre os fatores de virulência de *C. rugosa*, o que caracteriza a peculiaridade deste projeto, mas que impossibilita a comparação com resultados prévios sobre esta espécie, a qual será feita em sua maioria baseando-se em estudos com outras espécies de *Candida*.

Uma análise geral dos resultados referentes à produção de enzimas hidrolíticas mostrou que *C. rugosa* é uma espécie com baixa expressão dos

fatores de virulência quando comparada, por exemplo, com *C. albicans*. Com relação à produção de proteinase, as cepas apresentaram-se em sua maioria como não produtoras ou baixas produtoras desta enzima, e por essa razão, não foi observada diferença significativa na produção de proteinase entre os três grupos com diferentes desfechos clínicos: somente colonização (grupo I), candidemia e alta (grupo II) e candidemia e óbito (grupo III). A baixa expressão de proteinase por *C. rugosa* observada neste estudo corrobora alguns relatos da literatura que apontam outras espécies de *Candida*, tais como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*, como sendo baixas produtoras de proteinase quando comparadas com *C. albicans* (Gokce et al., 2007).

Estudos clínicos e microbiológicos conduzidos por Melo et al. (2009) confirmam estes achados. Estes autores realizaram uma análise da microbiota oral de 52 crianças infectadas pelo HIV, e que passaram a receber tratamento com drogas inibidoras de protease. Após a utilização desta droga, o isolamento de espécies de *Candida* não-*Candida albicans* aumentou de 9.6% para 28%, além de ter sido documentado o isolamento de espécies raras, tais como *C. novyensis*, *C. humicola* e uma cepa de *C. rugosa*. Assim sendo, os autores sugerem que a supressão deste importante fator de virulência de *C. albicans*, que é a produção de proteinase aspártica secretada (SAP), favoreceu o crescimento de espécies não produtoras de proteinase, uma vez que esta enzima possui natureza similar à proteinase do vírus HIV, sendo, portanto, também inibida por antiretrovirais inibidores de protease.

Excepcionalmente, a única cepa altamente produtora de proteinase em todo o estudo foi a 106, obtida de sangue, e que causou como desfecho clínico candidemia e óbito ($Abs_{280nm} = 0,167 \pm 0,004$), induzindo a uma interpretação de que a alta produção desta enzima tenha tido papel fundamental neste desfecho (figura 12C). Esta correlação entre produção de proteinase e virulência tem sido amplamente descrita em modelos de estudo de virulência utilizando-se *C. albicans*, nos quais tanto a atividade de proteinase quanto a expressão dos genes SAP são aumentadas em pacientes com candidíase, quando comparadas com indivíduos saudáveis (Mohan et al., 2008; Tavanti et al., 2004; Kuriyama et al. 2003). A elevada produção de proteinase da cepa 106, possivelmente justifica a diferença estatística observada entre as cepas isoladas em 1995/96, que inclui este isolado, e as do ano de 2001/02, a qual pode ser explicada unicamente pela presença desta cepa como um *outlier* (figura 14), e não como uma tendência de perda de virulência ao longo dos anos.

É sabido que a produção de fosfolipase extracelular por *C. albicans* é considerada um aspecto importante de sua virulência. Estudos avaliando a expressão de alguns genes responsáveis pela produção desta enzima em modelos murinos de candidíase disseminada, como por exemplo, o gene *PLB1*, também já comprovaram a relevância desta enzima na patogenicidade desta espécie (Schaller et al., 2005; Mukherjee et al., 2001). Diferentemente com o que ocorre com *C. albicans*, em nosso estudo, todos os isolados de *C. rugosa* apresentaram atividade de fosfolipase negativa. O mesmo foi verificado por Kantarcioglu et al. (2002) que avaliaram a produção de fosfolipase em 2 cepas de *C. rugosa* por meio da mesma técnica de observação de halos de precipitação, e constataram que ambas foram fosfolipase negativas. Este resultado está de

acordo com observações existentes na literatura, as quais apontam a positividade desta enzima entre espécies de *Candida* não- *Candida albicans* como sendo rara, sendo este um fator de virulência altamente expresso somente em cepas de *C. albicans* (Mohan et. al, 2008; Gokce et al., 2007).

Embora a produção de lipase seja bem documentada para *C. rugosa*, a maior parte dos dados na literatura relacionados à esta enzima enfocam sua utilização em processos biotecnológicos e industriais (de Maria et al., 2006; Dalmau et al., 2000; Brocca et al., 1998), sendo que nenhum estudo foi realizado na tentativa de caracterizar a expressão de lipase como sendo um fator de virulência para esta espécie, com a propriedade de estabelecer o sucesso das infecções invasivas causadas por esta levedura.

Com relação à produção de lipase pelas cepas de *C. rugosa*, a análise quantitativa realizada pelo método da hidrólise do pNPL mostrou a existência de uma população bastante heterogênea, composta por indivíduos não produtores (18%), baixos (24%), médios (31%) e altos produtores de lipase (27%). Interessantemente, nossa cepa de referência ATCC10571 de *C. rugosa* não produziu lipase, o que pode ser explicado ou pela sua natureza não produtora, ou pela perda de virulência a partir de inúmeros subcultivos que esta cepa foi submetida desde sua aquisição por nosso laboratório, uma vez que o fenômeno da atenuação da virulência ao longo dos anos já é de conhecimento para alguns fungos (Macoris et al., 2006).

Neste estudo houve duas constatações importantes que sugerem que a produção de lipase seja um importante fator de virulência em *C. rugosa*, e que pode desempenhar um papel fundamental no processo de infecção: primeiro,

as cepas obtidas do grupo I, de pacientes que foram somente colonizados, expressaram valores médios de produção de lipase (0,030) menores do que os valores médios das cepas isoladas de pacientes do grupo II (0,069), candidemia e alta, sendo este valor estatisticamente diferente do primeiro. Isolados do grupo III, candidemia e óbito, apresentaram valor maior do que o do grupo I (0,058), sem contudo, ser diferente estatisticamente do mesmo. Segundo, como pode ser observado na figura 19, verificou-se que as cepas isoladas de sangue são maiores produtoras de lipase do que as isoladas de outros sítios ($p < 0,05$).

De fato, existem evidências na literatura afirmando que a lipase possui importante papel na patogenicidade de *Candida* spp. Gácsér et al. (2007^a) demonstrou o papel do gene lipase 8 (*LIP8*) na virulência de *C. albicans* através da supressão deste gene em cepas mutantes. Verificou-se que a expressão diminuída do gene *LIP8* resultou em crescimento reduzido em meios de cultura ricos em lipídios, uma vez que o produto deste gene possui um importante papel na digestão de lipídeos para aquisição de nutrientes. Também foi constatado que as cepas mutantes deficientes para o *LIP8* foram significativamente menos virulentas no modelo de infecção intravenosa em camundongos, tanto em relação ao tempo de sobrevivência quanto à carga de infecção em órgãos vitais.

Estes mesmos autores, ao pesquisarem o papel da lipase na virulência de cepas de *C. parapsilosis*, verificou que mutantes deficientes para os genes de lipase 1 e 2 (*LIP1* e *LIP2*) não possuem atividade lipolítica nos meios ricos em lipídeos, foram mais facilmente ingeridas por macrófagos, além de apresentar produção de biofilme dramaticamente reduzida quando comparada com as cepas selvagens. Adicionalmente, cepas mutantes lipase negativas foram

significativamente menos virulentas tanto em modelos de infecção que envolvem inoculação de epitélio oral humano, quanto em modelo murino de candidíase (Gácsér et al., 2007^b). Em analogia com os estudos realizados com *C. albicans* e *C. parapsilosis*, esses dados corroboram a idéia de que a produção de lipase esteja relacionada também com a virulência de *C. rugosa*, uma vez que isolados de sangue expressaram significativamente mais esta enzima que aqueles de outros sítios anatômicos.

Com relação ao ensaio de formação de biofilme, foi demonstrado que todas as cepas avaliadas possuem capacidade de formar esta estrutura em superfícies plásticas. Entretanto, houve uma grande variação na intensidade de formação das mesmas entre os isolados ($Abs_{570nm} = 0,079$ a $0,633$), sendo que a maioria deles foram classificados como baixos e médios produtores ($< 0,4$), conforme pode ser visualizado na figura 21. A comparação deste parâmetro entre os três grupos com diferentes desfechos clínicos não revelou nenhuma diferença significativa entre eles, embora alguns relatos da literatura afirmem que o alto potencial de formação de biofilme *in vitro* pode ser associado não só com a maior persistência, mas também com o pior desfecho da infecção (Hasan et al., 2009).

A produção de biofilme é um fenômeno bastante estudado e relacionado à virulência em *C. albicans* (Kuhn et al., 2002). Os resultados do nosso ensaio, em que o valor médio da formação de biofilme foi de $0,291 (\pm 0,109)$ de absorvância a 570nm, foram semelhantes aos obtidos em alguns estudos que utilizaram a mesma técnica de coloração por cristal violeta (CV). Ao analisar a formação de biofilme em *C. albicans*, Li et al. (2003) demonstrou que cepas desta espécie provenientes de diferentes fontes (cavidade oral, mucosa

vaginal e ambiental) variaram bastante com relação à produção de biofilme, tal como ocorreu em nosso ensaio, sendo que a média de produção de biofilme das 115 cepas avaliadas foi de 0,189 (\pm 0,301), com uma variação entre 0,043 a 2,179, entre as cepas produtoras de biofilme. Em outra investigação, foram comparadas 26 cepas de *C. albicans* isoladas de cavidade oral de pacientes infectados com HIV com 20 cepas de indivíduos saudáveis. Os nível médio de produção de biofilme quantificado pelo CV foi de 0,196 (\pm 0,072) no primeiro grupo, e de 0,176 (\pm 0,086) no segundo, não sendo constatada diferença quantitativa significativa entre estes dois grupos (Jin et al., 2003).

Há diversidade de constatações na literatura em que é possível correlacionar a produção do biofilme com a capacidade de patogênese e virulência. Ora autores sugerem que a produção de biofilme em cepas de candidemia é maior do que em sítios não invasivos, ora observa-se relação entre órbito e a maior produção desta estrutura. Em relação à *C. rugosa*, houve alguma variabilidade com relação à produção de biofilme, sendo na maioria das vezes baixa, independentemente do sítio.

Ao avaliar a formação de biofilme entre cepas isoladas de sangue e cepas dos demais sítios, nosso estudo não observou diferença significativa na quantificação do biofilme entre estes grupos. Estes resultados contradizem outras investigações, tais como a de Shin et al. (2002), onde a capacidade de formar biofilme em uma coleção de isolados clínicos sanguíneos foi comparada com a de outros sítios anatômicos em *Candida* spp. Demonstrou-se que a proporção de cepas de *Candida* não-*Candida albicans* sanguíneas capazes de formar biofilme foi significativamente maior do que as cepas obtidas de outros sítios anatômicos

(79% versus 52%, sendo $p < 0.0001$). Baseado nestes dados é razoável indicar que isolados sanguíneos formam mais biofilme, o que caracteriza seu poder de patogenicidade, diferentemente do que ocorreu em nosso estudo, onde talvez a formação de biofilme não tenha tido papel tão fundamental no estabelecimento da candidemia. Entretanto, este atributo de virulência pode ser importante nos momentos iniciais da infecção por *C. rugosa*, uma vez que muitos isolados de colonização foram altamente produtores de biofilme (figura 20A)

Notavelmente, a cepa de referência ATCC10571 foi a única que apresentou um valor extremamente elevado na produção de biofilme ($Abs_{570nm} > 3,0$), contrastando das demais. Este achado, juntamente com a constatação de que a cepa ATCC10571 possui macromorfologia em meio Sabouraud acentuadamente mais rugosa do que as demais (figura 4), é uma característica morfológica marcante que distingue a cepa de referência e a população em estudo, evidenciando ainda mais a heterogeneidade genética dos nossos isolados e a cepa de referência ATCC10571

É importante ressaltar que a habilidade de transição do estado de levedura para hifa em cepas de *C. albicans*, além de constituir um importante fator de virulência, está diretamente relacionada com a expressão dos genes que também são indutores da produção de biofilme (Goyard et al., 2008). Estabelecendo-se um paralelo da importância do padrão morfológico na produção de biofilme com cepas de *C. albicans* e de *C. rugosa*, podemos sugerir que cepas com maior filamentação teriam maior produção de biofilme. No nosso estudo, a cepa ATCC10571 de *C. rugosa*, que apresentou maior filamentação com relação aos isolados clínicos, demonstrou maior capacidade de formação de biofilme.

Em relação aos testes de susceptibilidade, conforme a tabela 6, todos os isolados avaliados apresentaram 100% de sensibilidade *in vitro* aos seguintes antifúngicos: anfotericina B, voriconazol, caspofungina e anidulafungina. Com relação ao fluconazol, somente 38% das cepas foram susceptíveis, evidenciando a tendência desta espécie em apresentar susceptibilidade reduzida à essa droga (Pfaller et al., 2006^a).

Nossos achados sobre a susceptibilidade dos isolados à anfotericina B (todos com CIM ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$) estão de acordo com alguns relatos na literatura que observaram sensibilidade de *C. rugosa* a este poliênico em estudos *in vitro* (Melo et al., 2009; González et al., 2008; Ostrosky-Zeichner et al., 2003; García-Martos et al., 2001) e também *in vivo* (Hernandez et al., 2004). Carrillo-Muñoz et al. (1999) verificou a susceptibilidade de 1 cepa clínica de *C. rugosa* não somente à anfotericina B (desoxicolato), mas também a diversos poliênicos, sendo eles, nistatina, nistatina lipossomal, anfotericina B complexo lipídico, anfotericina B lipossomal e anfotericina B colesteryl sulfato. Utilizando-se da metodologia de microdiluição em caldo, da Matta et al. (2007), avaliaram 25 cepas de *C. rugosa* isoladas de sangue, provenientes de 4 hospitais terciários da cidade de São Paulo, e verificaram 100% de sensibilidade à anfotericina B.

Contrariamente aos achados de sensibilidade antifúngica *in vitro* à anfotericina B dos nossos isolados e às citações anteriores, alguns autores sugerem que *C. rugosa* possa ser uma espécie refratária ao tratamento com este antifúngico. Durante um surto reportado no Brasil, 4 de 6 pacientes com candidemia por *C. rugosa* evoluíram a óbito, mesmo após terem recebido tratamento com anfotericina B (Colombo et al., 2003). Dubé et al. (2004) reportou

15 episódios de candidemia por *C. rugosa* em uma unidade de queimados, onde o uso da nistatina tópica foi associado ao aumento de fungemia. Pfaller et al. (2004) realizaram um estudo retrospectivo de diversos dados da literatura e verificaram que 54,5% dos isolados analisados (um total 13), apresentaram resistência a anfotericina B pelo método de microdiluição em caldo. Em outro estudo, realizado em hospitais coreanos, 2 isolados de sangue de *C. rugosa* exibiram CIMs $\geq 0,38$ $\mu\text{g/mL}$ para a anfotericina B por meio da metodologia do E-test, o que é considerado um valor elevado para esta droga (Park et al., 2008).

Mesmo com as evidências obtidas em nossos ensaios a respeito da eficácia *in vitro* da anfotericina B contra *C. rugosa*, diante da controvérsia com a qual este tema é discutido na literatura, é necessária realização de mais estudos *in vitro* e *in vivo* com este antifúngico, com o intuito de se chegar à conclusão da eficácia ou não desta droga contra esta espécie, uma vez que a maioria das investigações utilizou poucas cepas para análise. Estes dados sugerem que a resistência à anfotericina B deva estar presente em alguns isolados clínicos desta espécie, não se tratando, portanto, de resistência intrínseca à esta droga.

Com relação ao fluconazol, somente 38% das nossas cepas tiveram valores de CIM ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$, sendo classificadas como sensíveis, 42% exibiram valores de CIM entre 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$, apresentando susceptibilidade dose dependente (SDD) e 20% foram resistentes a este antifúngico, exibindo CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$. Nossos resultados são condizentes com vários relatos citados na literatura, nos quais isolados de *C. rugosa* apresentam susceptibilidade reduzida a essa droga (da Matta et al., 2007; Pires-Gonçalves et al., 2007; Pfaller et al., 2004; Maxwell et al., 2003; Testore et al., 2001; Ng et al., 2000).

Em uma investigação conduzida pelo centro de vigilância do *ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance*, ao longo de 8,5 anos de análise (1997 a 2005), foi avaliada a susceptibilidade *in vitro* de 205.329 e 147.776 isolados leveduriformes ao fluconazol e ao voriconazol, respectivamente, através da metodologia de disco difusão. Das 502 cepas de *C. rugosa* avaliadas, somente 43,8% apresentaram sensibilidade ao fluconazol e 64,1% ao voriconazol. Também foi observado que dos 230 isolados com susceptibilidade reduzida ao fluconazol, somente 26,5% foram sensíveis ao voriconazol, evidenciando a possibilidade de ocorrência do fenômeno de resistência cruzada entre estes dois antifúngicos (Pfaller et al., 2007^b).

Este mesmo grupo avaliou o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos fluconazol e voriconazol pelo método de disco difusão em 452 isolados de *C. rugosa* provenientes de 127 instituições médicas de diferentes partes do mundo (Ásia, América Latina, Europa e Oriente Médio). Demonstrou-se que somente 40,4% das cepas foram sensíveis ao fluconazol, sendo que esta taxa de sensibilidade foi menor em países asiáticos (34,9%) e latino-americanos (35,7%) do que em países europeus (75,9%) e norte-americanos (50%). Estes dados sugerem significativa variação regional no perfil de susceptibilidade de *C. rugosa* a este antifúngico. Contudo observou-se um aumento de 30% para 60% de resistência a esse antifúngico ao longo dos anos avaliados (2001 a 2003). Ainda neste trabalho, o autor sugere que *C. rugosa* deveria ser enquadrada, juntamente com *C. krusei* e *C. glabrata*, como espécies com susceptibilidade reduzida aos azólicos (Pfaller et al., 2006^a).

Com relação ao voriconazol, todas as nossas cepas foram sensíveis ($CIM_{50}=0,25 \mu\text{g/mL}$ e $CIM_{90}= 0,5 \mu\text{g/mL}$, tabela 6), seguindo a tendência observada na literatura desta droga exibir CIM abaixo das concentrações limites (*breakpoints*) para se caracterizarem as cepas como sensíveis. Ostrosky-Zeichner et al. (2003) demonstraram a eficácia do voriconazol ao avaliar 2.000 isolados de sangue de leveduras isoladas entre os anos de 1995 e 1999 nos Estados Unidos, onde as 7 cepas de *C. rugosa* avaliadas mostraram-se sensíveis à essa droga, apresentando valor médio do CIM= 0,06 (0,03 – 0,06). Da mesma forma, Hernández et al. (2004) exibiram o sucesso de tratamento com voriconazol em camundongos neutropênicos infectados por inoculação intravenosa com leveduras desta espécie.

Em contrapartida, nossos resultados divergem com os dados observados por Pfaller et al. (2007^b), onde apenas 64,1% das cepas de *C. rugosa* avaliadas apresentaram-se sensíveis ao voriconazol. Estes autores também demonstraram a tendência dos isolados resistentes ao fluconazol em apresentar baixa sensibilidade ao voriconazol (21,7% SDD e 51,7% resistentes) pelo fenômeno da resistência cruzada.

Também foi observada divergência entre os nossos dados com os deste mesmo grupo, em outro estudo em que se verificou sensibilidade ao voriconazol em 55,8% dos 452 isolados de *C. rugosa* avaliados ao longo de 7 anos, o que enquadrou a América Latina como a região geográfica que apresenta uma das menores taxas de sensibilidade a esse antifúngico quando comparadas com as de países europeus (97%) e norte-americanos (100%) (Pfaller et al.,

2006^a). Sendo assim, variação regional de perfil de susceptibilidade a voriconazol também ocorre, semelhante ao observado com o fluconazol.

Na nossa investigação, o índice de sensibilidade *in vitro* da espécie *C. rugosa* para a caspofungina (CIM₅₀ e CIM₉₀ = 1) e anidulafungina (CIM₅₀ = 0,125 e CIM₉₀ = 0,25) foi de 100%, seguindo a tendência observada em outros estudos (Ostrosky-Zeichner et al., 2003). Novamente nos deparamos com a problemática da escassez de dados na literatura a respeito da susceptibilidade de *C. rugosa* frente às equinocandinas, o que dificulta a realização de uma análise comparativa.

As equinocandinas têm sido bastante utilizadas para tratamento de candidíase invasiva. Pfaller *et al.* (2008^a) investigaram a susceptibilidade *in vitro* de isolados de *Candida spp.* à anidulafungina, caspofungina e micafungina, durante 6 anos em estudo de vigilância global. Nesta casuística, as três equinocandinas avaliadas foram bastante ativas contra diversas espécies de *Candida*. Especificamente em relação à *C. rugosa*, das 5.346 cepas de *Candida spp.* avaliadas, somente três foram resistentes à caspofungina (CIM > 2 µg/mL), incluindo 1 isolado desta espécie que apresentou CIM = 8 µg/mL. Outro caso de resistência à caspofungina foi relatado por Kartsonis et al. (2005), onde 1 cepa isolada de sangue apresentou CIM = 8 µg/mL, em meio a 231 cepas de *Candida spp.* testadas, cuja casuística exibiu 96% de susceptibilidade à essa droga.

Um aspecto que chamou atenção em nossos resultados foi o valor de CIM₉₀ = 1 µg/mL para a caspofungina exibido por nossa população. Este valor assemelha-se aos que são verificados para *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (CIM₉₀ = 1 µg/mL), que são consideravelmente elevados quando comparados com

os valores de CIM das três espécies seguintes: *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (CIM₉₀= 0,06 µg/mL). Ao que parece, estas três espécies de *Candida* (*C. rugosa*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*), com elevado valor CIM₉₀, mesmo que sejam consideradas sensíveis à caspofungina, possuem tendência em apresentar susceptibilidade reduzida à esta droga (Pfaller et al., 2008^b).

Através da análise genotípica, foram observados dados bastante interessantes acerca do relacionamento genético entre as cepas de *C. rugosa* utilizadas neste estudo. De acordo com os dendrogramas gerados pelas técnicas de microssatélite e RAPD, utilizando-se os *primers* GAGA₄ e B14 respectivamente, demonstrou-se que as nossas cepas são 94% similares pela primeira técnica, e 90% pela segunda (figuras 7 e 9). O alto grau de relacionamento genético também foi observado na investigação conduzida por Colombo et al. (2003), que caracterizaram um surto com 6 isolados desta espécie no mesmo hospital em que nossas cepas foram coletadas. De acordo com Chong et al. (2003), na técnica de RADP, um grau de similaridade em torno de 80-99% representa cepas altamente similares, mas não idênticas, parecendo razoável inferir que estas infecções podem ter sido causadas por uma única cepa de *C. rugosa* bem adaptada ao ambiente hospitalar, a qual deve ter sofrido microevolução e se disseminou no hospital.

De fato, tanto a técnica de microssatélite quanto a de RAPD têm sido citadas na literatura como úteis na avaliação de variabilidade genética em fungos (Meyer & Mitchell, 1995). Shehata et al. (2008), demonstraram a habilidade do *primer* GACA₄ em evidenciar diferenças inter e intraespecíficas entre fungos dermatófitos. Walczak et al. (2007) utilizaram os *primers* GACA₄, GTG₅, GAC₅ e

M13 nas reações de microssatélite, a fim de discriminar 15 leveduras contaminantes isoladas de 2 tanques de fermentação de uma cervejaria holandesa. Com a utilização destes *primers*, o autor foi capaz de identificar, agrupar e evidenciar diferenças intraespecíficas em 7 isolados de *C. sake*, bem como diferenciá-las das outras espécies de leveduras, evidenciando a eficácia da técnica de microssatélite em estudos de genotipagem.

Pires-Gonçalves et al. (2007), realizaram estudos com a técnica de RAPD para determinar o relacionamento genético entre cepas comensais de *C. albicans* isoladas de pacientes com prótese dental. As 47 cepas submetidas à análise por RAPD com o *primer* OPJ6 exibiram 11 perfis diferentes, agrupando-se em 4 clusters principais. Pela observação do dendrograma gerado pelo método UPGMA, verificou-se que 40 (80%) cepas agruparam-se em um *cluster* principal apresentando 80% de similaridade entre si, bem como todos os isolados revelaram-se somente 50% similares, sugerindo variabilidade intraespecífica para *C. albicans*.

Curiosamente, o dendrograma gerado pela amplificação por RAPD com o *primer* B14 separou nossos isolados em dois principais *clusters*, designados como A e B, embora seja importante ressaltar que estas diferenças foram mínimas em virtude do alto grau de relacionamento genético entre todos os isolados. No *cluster* A, somente agruparam-se as cepas isoladas de pacientes que desenvolveram candidemia, o que correspondeu a 56% dos indivíduos dos grupos II e III (candidemia e alta e candidemia e óbito, respectivamente), sendo que no *cluster* B reuniram-se todas as cepas provenientes dos pacientes somente colonizados (grupo I) e algumas dos outros dois grupos. Ao que parece, este

primer não só apontou a grande similaridade entre as cepas, como teve a capacidade de diferenciá-las de acordo com propriedades referentes às suas patogenicidades.

Redkar et al. (1996) realizaram o maior estudo de tipagem molecular abrangendo isolados clínicos de *C. rugosa* existente na literatura, no qual 35 cepas provenientes de diversas fontes, sendo 23 delas de pacientes queimados de uma única instituição, 8 de diversos materiais clínicos (swab de ferimentos, sangue, urina, lavado brônquico e ponta de cateter) e 4 de diferentes animais (tartaruga, pingüim, baleia e golfinho). A metodologia utilizada foi a amplificação por PCR baseada em sequências repetitivas (rep-PCR), sendo elas *Care-2* e *RPS1*, de funções biológicas não conhecidas e que já foram previamente reportadas em *C. albicans*. Esta técnica exibiu 9 padrões de bandas diferentes, com os quais foi possível agrupar algumas cepas de acordo com suas fontes de isolamento, caracterizando o surto na instituição médica em questão, e inclusive discriminado esta levedura de outras *Candida* spp. testadas (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. keryr*, *C. lusitaniae* e *C. parapsilosis*). Infelizmente, como não houve a determinação do índice de similaridade determinado pela construção de dendrogramas entre as cepas deste estudo, não foi possível estabelecer uma comparação com os nossos resultados.

O sequenciamento gênico da região ITS do rDNA demonstrou que todas as cepas são altamente relacionadas entre si, com exceção da cepa de referência ATCC10571. A árvore filogenética construída pela análise das sequências agrupou a maioria dos isolados em um mesmo cluster (figura 11), revelando sequências idênticas entre si, e evidenciando a carência desta técnica

em realizar estudos de detecção de variabilidade intraespecífica, uma vez que é um método objetivo para a resolução dos problemas de taxonomia e identificação de fungos de interesse médico (Sugita et al., 2002).

A análise das sequências de ITS das nossas cepas revelou somente 89 a 91% de identidade com as sequências de *C. rugosa* depositadas no banco genômico do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), enquanto que a nossa cepa de referência ATCC10571 exibiu 99% de homologia com as sequências deste banco de dados (tabela 4). Ciardo et al. (2006) verificaram que as sequências da região ITS de 3 cepas de *C. rugosa* foram as que apresentam menor similaridade intraespecífica dentre todas as espécies de *Candida* avaliadas. A árvore filogenética gerada pelas sequências de diversas espécies de leveduras agrupou *C. rugosa* em um ramo juntamente com *C. pararugosa*, *C. lusitaniae* e *C. lipolytica*, sugerindo que estas espécies sejam filogeneticamente relacionadas entre si, separando-as drasticamente do cluster que continha as demais espécies de *Candida*.

De maneira geral, o conjunto de análises genotípicas evidenciou o caráter diferencial existente entre a cepa de referência ATCC10571 e a população em estudo. É marcante a posição em que a ATCC10571 ocupa nos dendrogramas gerados pelas técnicas de microssatélite e RAPD (figuras 7 e 9), bem como na árvore filogenética construída pelas sequências da região ITS dos nossos isolados (figura 11). Também é notável a baixa identidade exibida pelas nossas sequências da região ITS (89 a 91%) com as sequências de *C. rugosa* depositadas no GenBank, diferentemente da nossa ATCC que apresentou 99% de identidade com as mesmas (tabela 4). Surpreendentemente, outros autores já

relataram identidade interespecífica da região ITS com valores semelhantes ou até mesmo maiores daqueles obtidos por nós ao parear a sequência das nossas cepas com as de *C. rugosa* depositadas no GenBank. Ciardo et al (2006) verificou identidade de 91,2 a 94,4% entre *C. dubliniensis* e *C. albicans*, 86,4 a 90,2% entre *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*, 99% entre *C. guilliermondii* e *C. fermentati*. Tavanti et al. (2005) verificaram 95% de similaridade entre sequências da região ITS de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* e 93% entre *C. parapsilosis* e *C. metapsilosis*, hoje classificadas como sendo espécies distintas umas das outras.

Diante de todas as observações obtidas por meio da tipagem molecular, juntamente com algumas características fenotípicas que diferenciaram drasticamente a nossa cepa ATCC10571 das demais, como por exemplo, a alta produção de biofilme, baixa produção de lipase e a macromorfologia acentuadamente rugosa desta cepa, é razoável inferir que os nossos isolados não sejam da mesma espécie que a ATCC10571 de *C. rugosa*, ou que, pelo menos, o táxon *C. rugosa* seja extremamente diversificado, e possivelmente abre margem para classificar nossa população como um complexo desta espécie, uma vez que outra espécie fenotipicamente indistinguível de *C. rugosa* também foi recentemente descrita e denominada de *C. pseudorugosa* (Li et al., 2006). Contudo, para confirmação desta hipótese, mais estudos estão sendo realizados pelo nosso grupo.

A partir da junção de todos os resultados apresentados, podemos dizer que o presente trabalho contribuiu para o conhecimento dos aspectos de patogenicidade de *C. rugosa* em um cenário clínico pré-estabelecido, avaliando o impacto dos atributos de virulência na evolução clínica em eventos de candidíase.

Tendo em vista que *C. rugosa* é uma levedura oportunista, capaz de causar infecções invasivas e até mesmo matar pacientes internados e com a saúde comprometida, pudemos verificar que além do “status” imunológico do paciente, é possível que os aspectos intrínsecos de cada cepa sejam importantes determinantes do sucesso de sua trajetória como patógeno, especificamente a produção de lipase pelos nossos isolados. Adicionalmente, destacamos ferramentas moleculares capazes de analisar eficientemente a variabilidade genética das cepas de *C. rugosa*, bem como evidenciamos diferenças entre o perfil genotípico da ATCC10571 de *C. rugosa* e nossa população, abrindo espaço para a interpretação de que se tratam de espécies diferentes, bem como apontam a necessidade de se realizar mais estudos na investigação desta hipótese.

6.0 CONCLUSÕES

A presente investigação permite os seguintes comentários e conclusões:

I – De acordo com os resultados obtidos na primeira fase do projeto, aplicando duas diferentes metodologias de genotipagem para a avaliação do relacionamento genético dos isolados, mais a técnica de sequenciamento da região ITS (rDNA) para identificação e análise de similaridade, podemos concluir que:

A) O perfil genotípico das cepas de *C. rugosa* isoladas em um Hospital Terciário da cidade de São Paulo, obtido por meio de 3 diferentes métodos moleculares, sugere uma possível disseminação clonal e persistência das mesmas neste ambiente hospitalar por vários anos, uma vez que este estudo abrange isolados obtidos nos anos de 1995/96 e 2001/02. No entanto, existe uma pequena variabilidade genética entre esses isolados, como foi demonstrado pela genotipagem. Tais diferenças podem ser explicadas por provável ocorrência de microevoluções em função de adaptação das cepas de *C. rugosa* que habitam este nicho específico.

B) As diferenças genéticas encontradas entre os isolados clínicos e a cepa de referência ATCC10571, demonstradas pelas três metodologias moleculares, indicam a possibilidade de heterogeneidade do táxon *C. rugosa*, sugerindo uma provável especiação entre as cepas brasileiras. Este fator deve ser investigado mais profundamente por outras técnicas moleculares, tais como o sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal e de genes essenciais por meio do Multilocus Sequence Typing (MLST).

II – Podemos destacar importantes achados a partir da análise dos fatores fenotípicos avaliados, são eles:

- A) De maneira geral, a população de *C. rugosa* estudada demonstrou baixa expressão dos fatores de virulência testados, uma vez que apresentaram baixa atividade de proteinase, produção nula de fosfolipase e baixa e média produção de biofilme. O único suposto fator de virulência expresso de maneira considerável pelas cepas foi a produção de lipase, destacando-se a alta produção desta enzima por amostras clínicas isoladas de sangue, provenientes dos pacientes que desenvolveram candidemia e evoluíram tanto a óbito quanto à alta.
- B) A análise em conjunto de todos os fatores fenotípicos não revelou nenhuma diferença geral entre os grupos quando são considerados os desfechos clínicos dos pacientes em que essas cepas foram isoladas (colonização, candidemia e alta, e candidemia e óbito). Tais resultados indicam que os fatores ligados ao próprio hospedeiro, tais como a gravidade, as condições do sistema imunológico, a exposição a fatores de risco e o tratamento do paciente, apresentaram importante papel no desfecho clínico de cada paciente.
- C) Foi observada uma notável diferença em alguns caracteres fenotípicos da cepa de referência ATCC10571 com relação à população em estudo. Primeiro, esta cepa foi a única que se caracterizou como altamente produtora de biofilme e baixa produtora de lipase. Segundo, a cepa ATCC10571 exibiu macromorfologia acentuadamente mais rugosa do que as demais. Tais diferenças fenotípicas, aliadas às diferenças genotípicas constatadas pelos estudos de tipagem molecular, são

evidências consideráveis para sugerir a heterogeneidade no táxon *C. rugosa*.

- D) A população em estudo mostrou-se sensível para a maioria dos antifúngicos estudados, exceto para o fluconazol. Ao que parece, *C. rugosa* de fato possui sensibilidade reduzida a essa droga, tal como ocorre com outras espécies de *Candida*, desaconselhando-se a utilização desta droga como possível escolha de tratamento.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acar A, Oncul O, Kucukardali Y, et al. Epidemiological features of *Candida* infections detected in intensive care units and risk factors affecting mortality. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(3):451-61.

- Adam B, Baillie GS, Douglas LJ. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 2002; 51(4):344-9.

- Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4):1829-35.

- Banno Y, Yamada T, Nozawa Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia* 1985; 23(1):47-54.

- Bassetti M, Righi E, Costa A, et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 2006; 6:21.

- Blot S, Dimopoulos G, Rello J, et al. Is *Candida* really a threat in the ICU? *Curr Opin Crit Care* 2008; 14(5):600-4.

- Bouza E, Munoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32 Suppl 2:S87-91.

- Brito LR, Guimaraes T, Nucci M, et al. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol* 2006; 44(3):261-6.

- Brocca S, Schmidt-Dannert C, Lotti M, et al. Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Sci* 1998; 7(6):1415-22.

- Carrillo-Munoz AJ, Quindos G, Tur C, et al. In-vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44(3):397-401.

- Chong PP, Lee YL, Tan BC, et al. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. *J Med Microbiol* 2003; 52(Pt 8):657-66.

- Ciardo DE, Schar G, Bottger EC, et al. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 2006; 44(1):77-84.

- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard – third edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

- Colombo AL, Nucci M, Salomao R, et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34(4):281-6.

- Colombo AL, Guimaraes T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(5):599-607.

- Colombo AL, Melo AS, Crespo Rosas RF, et al. Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46(4):253-7.

- Colombo AL, Nucci M, Park BJ, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8):2816-23.

- Colombo AL, Guimarães T, Silva LR, et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28(5):570-6.

- Copping VM, Barelle CJ, Hube B, et al. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(5):645-54.

- da Costa KR, Ferreira JC, Komesu MC, et al. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. *Mycopathologia* 2009; 167(2):73-9.

- da Matta DA, de Almeida LP, Machado AM, et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57(4):399-404.

- Dalmau E, Montesinos JL, Lotti M, et al. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microb Technol* 2000; 26(9-10):657-63.

- de Maria PD, Sanchez-Montero JM, Alcantara AR, et al. Rational strategy for the production of new crude lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnol Lett* 2005; 27(7):499-503.

- Dewsnup DH, Stevens DA. Efficacy of oral amphotericin B in AIDS patients with thrush clinically resistant to fluconazole. *J Med Vet Mycol* 1994; 32(5):389-93.

- Dib JC, Dube M, Kelly C, et al. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a typing system for *Candida rugosa*: comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1996; 34(6):1494-6.

- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15(2):167-93.

- Doshi RK, Patel G, Mackay R, et al. Healthcare-associated Infections: epidemiology, prevention, and therapy. Mt Sinai J Med 2009; 76(1):84-94.
- dos Prazeres JN, Cruz JAB, Pastore GM. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactant and detergents on the enzyme activity. Braz. J. Microbiol. 2006; 37(4):505-9.

- Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. Rev Iberoam Micol 2002; 19(3):139-43.

- Drozdowska A. Morphological and biochemical features of fungi isolated from patients with renal failure. Wiad Parazytol 2007; 53(2):145-8.

- Dube MP, Heseltine PN, Rinaldi MG, et al. Fungemia and colonization with nystatin-resistant *Candida rugosa* in a burn unit. Clin Infect Dis 1994; 18(1):77-82.

- Fedorovskaia EA, Rybal'skaia AP, Skachkova NK, et al. Characteristic of the yeast isolated from patients with leukaemia. Mikrobiol Z. 2008; 70(4):18-24.

- Fu Y, Ibrahim AS, Fonzi W, et al. Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. Microbiology 1997; 143 (Pt 2):331-40.

- Gacser A, Stehr F, Kroger C, et al. Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. Infect Immun 2007^a; 75(10):4710-8.

- Gacser A, Trofa D, Schafer W, et al. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. J Clin Invest 2007^b; 117(10):3049-58.

- Garcia-Martos P, Dominguez I, Marin P, et al. Antifungal susceptibility of emerging yeast pathogens. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19(6):249-56.

- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(1):122-43, table of contents.

- Giorgi W, Genovez ME, Porto E, et al. Metrite purulenta em égua puro-sangue inglês por *Candida rugosa*. *Rev. Microbiol.* 1986;17(3):225-7.

- Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98(3):401-5.

- Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia* 2007; 164(6):265-9.

- Goldani LZ, Mario PS. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. *J Infect* 2003; 46(3):155-60.

- Gonzalez GM, Elizondo M, Ayala J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol* 2008; 46(9):2902-5.

- Goyard S, Knechtle P, Chauvel M, et al. The Yak1 kinase is involved in the initiation and maintenance of hyphal growth in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 2008; 19(5):2251-66.

- Hanzen J, Pevalova L, Benedekova M, et al. Susceptibility of 57 bloodstream and urinary isolates of *Candida* species from a single children's university hospital to 6 antifungals. *Chemotherapy* 2002; 48(1):57-8.

- Hasan F, Xess I, Wang X, et al. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect* 2009.

- Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* 2001; 9(12):591-6.

- Hernandez S, Gonzalez GM, McCarthy DI, et al. Alternatives to amphotericin B for *Candida rugosa* infection. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(2):477-80.

- Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, et al. Detection of simulated candidemia by the BACTEC 9240 system with plus aerobic/F and anaerobic/F blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2003; 41(10):4714-7.

- Hruskova-Heidingsfeldova O, Dostal J, Majer F, et al. Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. *Biol Chem* 2009; 390(3):259-68.

- Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 2001; 147(Pt 8):1997-2005.

- Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995; 63(5):1993-8.

- Jensen HE, Aalbaek B. Pathogenicity of yeasts and algae isolated from bovine mastitis secretions in a murine model. *Mycoses* 1994; 37(3-4):101-7.

- Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, et al. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7):2961-7.

- Kantarcioglu AS, Yucel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 2002; 45(5-6):160-5.

- Kartsonis N, Killar J, Mixson L, et al. Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(9):3616-23.

- Krcmery V, Jr., Mrazova M, Kunova A, et al. Nosocomial candidaemias due to species other than *Candida albicans* in cancer patients. Aetiology, risk factors, and outcome of 45 episodes within 10 years in a single cancer institution. *Support Care Cancer* 1999; 7(6):428-31.

- Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, et al. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 2002; 70(2):878-88.

- Kuriyama T, Williams DW, Lewis MA. In vitro secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(6):405-7.

- Lai CC, Tan CK, Huang YT, et al. Current challenges in the management of invasive fungal infections. *J Infect Chemother* 2008; 14(2):77-85.

- Li J, Xu YC, Bai FY. *Candida pseudorugosa* sp. nov., a novel yeast species from sputum. *J Clin Microbiol* 2006; 44(12):4486-90.

- Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* 2003; 149(Pt 2):353-62.

- Lunardi LW, Aquino VR, Zimmerman RA, et al. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis* 2006; 43(6):e60-3.

- Macoris SA, Sugizaki MF, Peracoli MT, et al. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(3):331-4.

- Maenza JR, Keruly JC, Moore RD, et al. Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1996; 173(1):219-25.

- Magill SS, Swoboda SM, Shields CE, et al. The epidemiology of *Candida* colonization and invasive candidiasis in a surgical intensive care unit where fluconazole prophylaxis is utilized: follow-up to a randomized clinical trial. *Ann Surg* 2009; 249(4):657-65.

- Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ, et al. Evaluation of Etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 2003; 41(3):1087-90.

- Mekha N, Sugita T, Ikeda R, et al. Real-time PCR assay to detect DNA in sera for the diagnosis of deep-seated trichosporonosis. *Microbiol Immunol* 2007; 51(6):633-5.

- Melo AS, Colombo AL, Arthington-Skaggs BA. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(9):3081-8.

- Melo NR, Taguchi H, Culhari VP, et al. Oral candidiasis of HIV-infected children undergoing sequential HIV therapies. *Med Mycol* 2009; 47(2):149-56.

- Meyer W, Mitchell TG. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis* 1995; 16(9): 1648-56.

- Mitt P, Adamson V, Loivukene K, et al. Epidemiology of nosocomial bloodstream infections in Estonia. *J Hosp Infect* 2009; 71(4):365-70.

- Mohan das V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. Rev Iberoam Micol 2008; 25(4):208-10.

- Mokaddas EM, Al-Sweih NA, Khan ZU. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study. J Med Microbiol 2007; 56(Pt 2):255-9.

- Monod M, Hube B, Hess D, et al. Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. Microbiology 1998; 144 (Pt 10):2731-7.

- Monod M, Togni G, Hube B, et al. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. Mol Microbiol 1994; 13(2):357-68.

- Moretti A, Piergili Fioretti D, Boncio L, et al. Isolation of *Candida rugosa* from turkeys. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2000; 47(6):433-9.

- Morgan J. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. Curr Infect Dis Rep 2005; 7(6):429-39.

- Mukherjee PK, Seshan KR, Leidich SD, et al. Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. Microbiology 2001; 147(Pt 9):2585-97.

- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard – second edition. NCCLS document M27- A2. Wayne, Pennsylvania: National Committee For Clinical Laboratory Standards. 2002; 22(15):1-51.

- Ng KP, Madasamy M, Saw TL, et al. *Candida* biotypes isolated from clinical specimens in Malaysia. Mycopathologia 1998; 144(3):135-40.

- Ng KP, Saw TL, Na SL, et al. Systemic *Candida* infection in University hospital 1997-1999: the distribution of *Candida* biotypes and antifungal susceptibility patterns. *Mycopathologia* 2001; 149(3):141-6.

- Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, et al. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J Infect Dis* 1998; 177(2):425-30.

- Nucci M, Marr KA. Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis* 2005; 41(4):521-6.

- Odds FC. *Candida* species and virulence. *ASM News* 1994; 60:313-18.

- Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, et al. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(10):3149-54.

- Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20(3):485-506.

- Park JY, Shin JH, Uh Y, et al. [In vitro amphotericin B susceptibility of Korean bloodstream yeast isolates assessed by the CLSI broth microdilution method, Etest, and Minimum fungicidal concentration test]. *Korean J Lab Med* 2008; 28(5):346-52.

- Passos XS, Costa CR, Araujo CR, et al. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathologia* 2007; 163(3):145-51.

- Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, et al. In Vitro Activities of Voriconazole, Posaconazole, and Four Licensed Systemic Antifungal Agents against *Candida* Species Infrequently Isolated from Blood. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1):78-83.

- Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 2004; 42(10):4419-31.

- Pfaller MA, Diekema DJ, Colombo AL, et al. *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. J Clin Microbiol 2006^a; 44(10):3578-82.

- Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, et al. Global surveillance of in vitro activity of micafungin against *Candida*: a comparison with caspofungin by CLSI-recommended methods. J Clin Microbiol 2006^b; 44(10):3533-8.

- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007^a; 20(1):133-63.

- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. J Clin Microbiol 2007^b; 45(6):1735-45.

- Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, et al. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. J Clin Microbiol 2008^a; 46(1):150-6.

- Pfaller MA, Diekema DJ, Ostrosky-Zeichner L, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. J Clin Microbiol 2008^b; 46(8):2620-9.

- Pires-Gonçalves RH, Miranda ET, Baeza LC, et al. Genetic relatedness of commensal strains of *Candida albicans* carried in the oral cavity of patients' dental prosthesis users in Brazil. Mycopathologia 2007; 164(6):255-63.

- Power EG. RAPD typing in microbiology--a technical review. J Hosp Infect 1996; 34(4):247-65.

- Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 1982; 20(1):7-14.

- Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res 2006; 6(7):979-86.

- Redkar RJ, Dube MP, McCleskey FK, et al. DNA fingerprinting of *Candida rugosa* via repetitive sequence-based PCR. J Clin Microbiol 1996; 34(7):1677-81.

- Reinhardt JF, Ruane PJ, Walker LJ, et al. Intravenous catheter-associated fungemia due to *Candida rugosa*. J Clin Microbiol 1985; 22(6):1056-7.

- Rex JH, Cooper CR, Jr., Merz WG, et al. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(4):906-9.

- Richard JL, McDonald JS, Fichtner RE, et al. Identification of yeasts from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. Am J Vet Res 1980; 41(12):1991-4.

- Rosas RFC. Caracterização de colonização e fungemias por espécies de *Candida* em pacientes internados em unidades de terapia intensiva. Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Doenças Infecciosas e Parasitárias. 2004.

- Rorig KC, Colacite J, Abegg MA. [Production of virulence factors in vitro by pathogenic species of the genus *Candida*]. Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42(2):225-7.

- Sader HS, Hollis RJ, Pfaller MA. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. Clin Lab Med 1995;15(2):407-31.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

- Sampaio P, Gusmao L, Correia A, et al. New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes. J Clin Microbiol 2005; 43(8):3869-76.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. Biotechnology 1992; 24:104-8.

- Sarvikivi E, Lyytikäinen O, Vaara M, et al. Nosocomial bloodstream infections in children: an 8-year experience at a tertiary-care hospital in Finland. Clin Microbiol Infect 2008;14(11):1072-5.

- Schaller M, Korting HC, Borelli C, et al. *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis. Infect Immun 2005;73(5):2758-65.

- Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Oral Dis 2008; 14(7):582-90.

- Shehata AS, Mukherjee PK, Aboulatta HN, et al. Single-step PCR using (GACA)₄ primer: utility for rapid identification of dermatophyte species and strains. J Clin Microbiol 2008; 46(8):2641-5.

- Shin JH, Kee SJ, Shin MG, et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 2002; 40(4):1244-8.

- Shorr AF, Lazarus DR, Sherner JH, et al. Do clinical features allow for accurate prediction of fungal pathogenesis in bloodstream infections? Potential implications of the increasing prevalence of non-albicans candidemia. *Crit Care Med* 2007; 35(4):1077-83.

- Silva WP, Santos DE, Leal E, et al. Reactivation of ancestral strains of HIV-1 in the gp120 V3 env region in patients failing antiretroviral therapy and subjected to structured treatment interruption. *Virology* 2006; 354(1):35-47.

- Sugar AM, Stevens DA. *Candida rugosa* in immunocompromised infection. Case reports, drug susceptibility, and review of the literature. *Cancer* 1985; 56(2):318-20.

- Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, et al. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5):1826-30.

- Szabo Z, Toth B, Kovacs M, et al. Evaluation of the new Micronaut-Candida system compared to the API ID32C method for yeast identification. *J Clin Microbiol* 2008; 46(5):1824-5.

- Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1):284-92.

- Tavanti A, Pardini G, Campa D, et al. Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (SAP1-10) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. *J Clin Microbiol* 2004;42(10): 4726-34.

- Testore GP, Falco F, Sarrecchia C, et al. Two-year surveillance on fluconazole susceptibility of *Candida* spp isolates in a general and university hospital in Rome. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 41(1-2):23-7.

- Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23(4):317-22.

- Tsuboi R, Komatsuzaki H, Ogawa H. Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infect Immun* 1996; 64(8):2936-40.

- Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 2007; 45(6):1843-50.

- Valenza G, Strasen J, Schafer F, et al. Evaluation of new colorimetric vitek 2 yeast identification card by use of different source media. *J Clin Microbiol* 2008; 46(11):3784-7.

- Vital MJS, Abranches J, Hagler AN, et al. Mycocinogenic yeasts isolated from amazon soils of the maracá ecological station, Roraima-Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2002; 33:230-235.

- Walczak E, Czaplinska A, Barszczewski W, et al. RAPD with microsatellite as a tool for differentiation of *Candida* genus yeasts isolated in brewing. *Food Microbiol* 2007; 24(3):305-12.

- Wash A, Pick H, Philppsen P. Procedures for isolating yeast DNA for different purposes. In: Johnston JR. *Molecular genetics of yeast*. Ed. IRL Press at Oxford University Press 1994; Oxford, 10-11.

- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis 2004; 39(3):309-17.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)