

**PATRÍCIA MONTEIRO RIBEIRO**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Candida dubliniensis* EM CEPAS DA  
MICOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE SÃO  
JOSÉ DOS CAMPOS/ UNESP**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, do Programa de Pós-graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Concentração em Biopatologia Bucal.

**PATRÍCIA MONTEIRO RIBEIRO**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Candida dubliniensis* EM CEPAS DA  
MICOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE SÃO  
JOSÉ DOS CAMPOS/ UNESP**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Concentração em Biopatologia Bucal.

Orientador: Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2007

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

BELLINI AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2006.

Ribeiro, Patrícia Monteiro  
Identificação de *Candida dubliniensis* em cepas da micoteca da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos / UNESP/  
Patrícia Monteiro Ribeiro; orientador Antonio Olavo Cardoso Jorge.  
\_São José dos Campos, 2007.  
114p.;IL

Tese (Programa de Pós- Graduação em Biopatologia bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2007

### AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio, convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 18/07/2007.

Assinatura:

E- mail:patriciamonteiroribeiro@yahoo.com.br

## FOLHA DE APROVAÇÃO

RIBEIRO, P. M. Identificação de *Candida dubliniensis* em cepas da micoteca da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP. 2007. [Tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2007.

São José dos Campos,

Banca Examinadora

1) Prof. (a). Dr. (a)

: REGINALDO BRUNO GONÇALVES

Titulação: PROFESSOR TITULAR FOP-UNICAMP

Julgamento: APROVADA

Assinatura

2) Prof. (a). Dr. (a)

: SILVANA CAI

Titulação: PROFESSORA DOUTORA

Julgamento: APROVADA

Assinatura

3) Prof. (a). Dr. (a)

: JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA

Titulação: PROFESSORA DOUTORA

Julgamento: APROVADA

Assinatura

4) Prof. (a). Dr. (a)

: CRISTIANE YUMI KOHA ITO

Titulação: Professora doutora

Julgamento: aprovada

Assinatura

5) Prof. (a). Dr. (a)

: Antonio Cleo Cardoso Jorge

Titulação: Professor Titular

Julgamento: aprovada

Assinatura

Este trabalho teve Auxílio à Pesquisa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - processo 05/55135-1

*Dedico este trabalho*

*ao meu marido CLÁUDIO HENRIQUE ROSA  
e aos nossos filhos, JOÃO PEDRO e GABRIEL*

*&*

*ao meu pai JOÃO PINTO RIBEIRO (saudades...)*

*e minha mãe DIDI MONTEIRO RIBEIRO*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Adj. Paulo Villela Santos Júnior e do vice-diretor Prof. Dr. José Roberto Rodrigues.

À Universidade do Vale Paraíba - UNIVAP, em especial ao Laboratório de Genética Molecular e Genomas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IPD, na pessoa do Prof. Dr. Francisco Gorgônio da Nóbrega.

Ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pela oportunidade da realização do curso, amizade e convivência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos equipamentos necessários para montagem do Laboratório de Biologia Molecular e materiais necessários para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. Rosilene Fernandes da Rocha.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, meu orientador, pelo exemplo, confiança, contribuição de minha formação profissional e por todos estes anos de agradável convivência.

À Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito, pela orientação referente a Biologia Molecular, pelas inúmeras contribuições durante a realização deste trabalho, pela boa vontade em ajudar, carinho e amizade de sempre.

Ao mestrando Adolfo José da Mota, da Universidade do Vale do Paraíba, pela disposição em ajudar, pelas palavras de incentivo, por buscar soluções para nossos problemas como se fossem dele, pela amizade e paciência.

À Profa. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho, pela disposição e carinho durante estes anos, e pelo auxílio nas fotografias de microscopia.

Ao Prof. Ivan Balducci, da Disciplina de Bioestatística do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/ UNESP, pela análise estatística.

À bibliotecária Ângela de Brito Bellini, da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pela revisão da estrutura do trabalho, pela atenção e boa vontade.

À assistente administrativa do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Sílvia Scarpel, pela atenção, boa vontade, carinho e paciência.

Ao Carlos Guedes, por toda ajuda e boa vontade, referente ao processo FAPESP.

Às secretárias da Secção de Pós-graduação, Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Maria Aparecida Consiglio de Souza e LÍlian Faria das Graças, pela atenção dispensada.

Ao técnico do Laboratório de Microbiologia, Sérgio Giovanni Alves, pela disposição e boa vontade em ajudar, por tornar nossa rotina no laboratório sempre melhor, pela amizade, carinho e boa vontade.

À Maria de Fátima Pires, funcionária do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pela amizade e boa vontade.

À Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira, companheira de curso e agora Professora, pela disposição em sempre ajudar, pela amizade e pelo carinho.

À Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira e ao Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho, pela amizade e carinho durante a realização deste trabalho.

À Graziela Nuernberg Back Brito, companheira de curso e de bancada desde que era só Back, pelo carinho e amizade, por iniciar comigo os caminhos da Biologia Molecular, sempre para o que der e vier, pela boa vontade e alegre companhia na Microbiologia, em todos os momentos.

À Silvia Maria Rodrigues Querido, companheira de curso e de bancada, por colorir nossa rotina no Laboratório de Microbiologia, por seu carinho e amizade, pela boa vontade e alegre companhia na Microbiologia, em todos os momentos.

À Claunencil de Fátima Pires Carreto, companheira de curso, pelos bons momentos que desfrutamos juntas no Laboratório, pela amizade e carinho durante a realização deste trabalho.

Ao Edson Yukio Komiyama, pela amizade, carinho e boa vontade de muitos anos.

A todos os colegas de Pós-graduação, pela companhia na jornada, por tornarem-na melhor.

Aos meus pais, João Pinto Ribeiro (*in memoriam*) e Didi Monteiro Ribeiro, pela dedicação e pelo empenho sempre com tanto amor, todos os dias de minha vida.

Ao meu marido, Cláudio Henrique Rosa, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo. Não teria conseguido sozinha, obrigada por todas as etapas.

Aos meus filhos João Pedro e Gabriel, por existirem, por tornarem minha vida encantadora, por nunca me permitirem esquecer o que realmente importa. E por me trazerem florzinhas todos os dias na volta da escola.

À minha irmã Tereza Monteiro Ribeiro Cardozo, pelo carinho, incentivo e boa vontade, durante a realização deste trabalho e sempre.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

À Deus. Sempre.

*“Tudo tem sua ocasião própria,  
e há tempo para todo propósito debaixo do céu.  
Há tempo de nascer, e tempo de morrer;  
tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;  
tempo de chorar, e tempo de rir;  
tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras;  
tempo de abraçar, e tempo de abster-se de abraçar;  
tempo de buscar, e tempo de perder;  
tempo de guardar, e tempo de jogar fora;  
tempo de estar calado, e tempo de falar;  
tempo de amar, e tempo de odiar.  
Há tempos de guerra,  
... e tempos de paz ”*

*(Ec 3: 1-8)*

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
RESUMO.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 <i>Candida dubliniensis</i> .....	18
2.2 Identificação Fenotípica.....	21
2.3 Identificação Genotípica.....	27
3 PROPOSIÇÃO.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Aspectos éticos.....	34
4.2 Origem das amostras.....	34
4.3 Identificação Fenotípica.....	35
4.3.1 Produção de tubo germinativo.....	35
4.3.2 Formação e arranjo estrutural de clamidoconídeos em ágar fubá...35	
4.3.3 Ágar Caseína.....	36
4.3.4 Ágar Tabaco.....	37
4.3.5 Ágar girassol (Meio Pal's Agar).....	38
4.3.6 Crescimento a temperatura de 45°C.....	39
4.4 Identificação Genotípica.....	40

4.4.1 Extração de DNA.....	40
4.4.2 Reação em cadeia da polimerase.(PCR).....	41
4.4.3 Eletroforese.....	42
4.5 Análise estatística.....	43
4.6 Análise de custos.....	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Identificação fenotípica.....	45
5.1.1 Formação de tubo germinativo.....	45
5.1.2 Formação e arranjo estrutural de clamidoconídeo em ágar fubá.....	45
5.1.3 Formação e arranjo estrutural em ágar caseína.....	46
5.1.4 Formação e arranjo estrutural em ágar tabaco.....	47
5.1.5 Formação e arranjo estrutural em ágar girassol.....	49
5.1.6 Crescimento a temperatura de 45°C.....	50
5.2 Identificação genotípica.....	55
5.3 Análise de Custos.....	57
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO.....	76
8 REFERÊNCIAS.....	77
ANEXOS.....	104
APÊNDICES.....	105
<i>ABSTRACT</i> .....	114

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	<i>american type culture collection</i>
C	citosina
°C	graus Celsius
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxinucleotídeos
DUBF	oligonucleotídeos específicos para <i>C. dubliniensis forward</i>
DUBR	oligonucleotídeos específicos para <i>C. dubliniensis reverse</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra acético
g	grama
G	guanina
h	horas
HIV	vírus de imunodeficiência humana
kb	kilo bases
M	molar
MB	megabyte
MEE	eletroforese de enzima com múltiplos locus
mM	milimolar
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
µL	microlitros
µg	microgramas
NCPF	<i>national collection of pathogenic fungi</i>
pb	pares de base

PCR	reação em cadeia da polimerase
PFGE	<i>pulsed field gel electrophoresis</i>
pH	potencial de hidrogênio iônico
RAPD	polimorfismo do DNA amplificado ao acaso
RFLP	polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição
RNA	ácido ribonucleico
RNAr	ácido ribonucléico ribossômico
r.p.m.	rotações por minuto
spp.	espécies
T	timina
Taq	enzima DNA polimerase <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris-Borato-EDTA
UV	ultravioleta
V	volts
Xg	vezes a gravidade
%	porcentagem

Ribeiro PM. Identificação de *Candida dubliniensis* em cepas da micoteca da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi identificar fenotipicamente e genotipicamente cepas de *Candida dubliniensis* entre os isolados e inicialmente identificados como *Candida albicans* pertencentes à coleção de amostras do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UNESP/ São José dos Campos. Duzentas cepas de leveduras do gênero *Candida*, provenientes de trabalhos anteriores, isoladas de pacientes transplantados cardíacos sob terapia com imunossuppressores, pacientes com tuberculose submetidos a antibioticoterapia prolongada, pacientes HIV positivos e indivíduos controle foram incluídas no estudo. As cepas foram submetidas aos seguintes testes fenotípicos: a) verificação da produção de tubo germinativo; b) formação e arranjo estrutural de clamidoconídeo em ágar fubá, em ágar tabaco, ágar girassol e ágar caseína; c) crescimento em temperatura de 45°C. Após a realização destes testes, todas as amostras foram submetidas à identificação genotípica por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), que demonstrou não haver *C. dubliniensis* entre as duzentas cepas testadas. Os resultados dos testes fenotípicos demonstraram que: a) todas as cepas produziram tubo germinativo; b) nos testes fenotípicos, o ágar fubá teve 76% de acordo de identificação com o método genotípico; o ágar tabaco, 92%; o ágar girassol, 92,5%; o ágar caseína, 85%; c) o crescimento a 45°C teve 86,5%. Concluiu-se que o ágar girassol foi o método fenotípico mais eficaz para diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*; nenhum dos métodos fenotípicos analisados se apresentou 100% eficaz; a identificação genotípica é necessária para diferenciação definitiva entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

Palavras-chave: *Candida albicans*; *Candida dubliniensis*; reação em cadeia da polimerase, boca.

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas, bem como a variedade de agentes fúngicos infecciosos, tem aumentado acentuadamente nas últimas duas décadas<sup>28, 52, 53, 108, 132, 136, 145</sup>.

Fatores predisponentes exógenos e endógenos tem tornado alguns pacientes vulneráveis a infecções por uma grande variedade de fungos oportunistas, principalmente por espécies do gênero *Candida*. Dentre estes fatores, apresentam relevância o uso de quimioterápicos, antibióticos de amplo espectro e corticóides, deficiência na imunidade celular, transplantes, uso de catéter venoso, respiração bucal, uso de próteses totais e aparelhos ortodônticos, entre outros<sup>4, 33, 63, 129, 140, 146</sup>.

*Candida dubliniensis* compartilha de muitas características fenotípicas com *Candida albicans*, como capacidade de produzir tubo germinativo e clamidoconídeos, capacidade de crescimento a 30 e 37°C em ágar Sabouraud e formação de colônias em cor verde quando submetidas a crescimento em CHROMágar<sup>28, 139, 149, 155, 161</sup>. Embora tenha sido isolada e identificada há 10 anos, relacionada a pacientes com AIDS ou portadores do HIV, sabe-se que está presente na comunidade há pelo menos 50 anos<sup>28</sup>.

Recentemente, *C. dubliniensis* vem sendo associada em diversas partes do mundo, com casos de candidose sistêmica em pacientes imunossuprimidos por outros motivos, como transplante de medula óssea, uso de quimioterapia, doenças terminais hematológicas, diabetes *mellitus*, lupus eritematoso sistêmico e infecções em população pediátrica<sup>2, 20, 58, 70, 90, 156</sup>.

A incidência de candidemia relacionada com *C. dubliniensis* não é conhecida, em grande parte devido à dificuldade em prontamente distinguir esta espécie de *C. albicans*<sup>20, 58, 94, 132, 152</sup>.

Testes fenotípicos são úteis para identificação presuntiva de *C. dubliniensis*, mas não fornecem identificação definitiva. Por outro lado, os métodos moleculares embora providenciem a identificação definitiva são trabalhosos, requerem equipamento especializado, e são onerosos<sup>37</sup>. Embora nenhum dos testes fenotípicos isoladamente seja suficiente para identificar definitivamente *C. dubliniensis*, há características relevantes que uma vez associadas, podem ser de grande utilidade em análises laboratoriais deste microrganismo<sup>6, 11, 12, 67, 68, 101, 115, 131, 140</sup>.

Para um melhor entendimento do significado clínico e epidemiológico de *C. dubliniensis* em candidose bucal e sistêmica, é essencial identificá-la acuradamente<sup>37, 152</sup>. O principal problema na seleção e identificação desta espécie é a falta de um marcador fenotípico discriminatório confiável<sup>22, 37, 161</sup>.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método molecular que se utiliza da amplificação exponencial de uma seqüência específica de DNA. Este método permite amplificar regiões específicas de DNA extraído de uma ou algumas células, e examinar a seqüência daquela região. É uma técnica extremamente rápida e segura<sup>34</sup>. A utilização da PCR permite identificar com segurança um isolado de *C. dubliniensis* em menos de 4 horas<sup>32</sup>.

Pesquisadores em diversas partes do mundo estão investigando atualmente, técnicas laboratoriais que permitam a distinção rápida, fácil e com menor custo, entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*<sup>6, 11, 22, 67, 68, 69, 101</sup>, visando deste modo diminuir o tempo entre diagnóstico e instituição de terapia antifúngica apropriada, principalmente nos casos de infecção sistêmica grave.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Candida dubliniensis*

O gênero *Candida* compreende mais de 200 espécies, porém somente cerca de 12 têm sido associadas com infecções em seres humanos<sup>110, 152</sup>. Embora *C. albicans* seja clinicamente a espécie mais prevalente do gênero *Candida* associada com infecção bucal, tanto em indivíduos imunocomprometidos como em indivíduos imunocompetentes, a incidência de infecções relacionadas com esta espécie tem diminuído, e outras espécies consideradas anteriormente menos virulentas, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* têm aumentado<sup>29, 52, 104, 107, 109, 110, 140, 151</sup>.

A razão para esta mudança epidemiológica não está esclarecida. O uso difundido de antifúngicos para suprimir candidose bucal em pacientes portadores do HIV, pode ter contribuído significativamente na seleção de patógenos oportunistas, assim como pode ter reduzido a susceptibilidade de *C. albicans* aos mesmos<sup>35, 61, 121, 148, 151</sup>.

Por volta de 1991, relatos provenientes da Irlanda, Austrália, Suíça e Inglaterra, descreveram isolados atípicos pertencentes ao gênero *Candida*, provenientes de indivíduos portadores do HIV e de indivíduos com AIDS, e que submetidos a testes micológicos clássicos, foram classificados como *C. albicans*<sup>17, 27, 28, 87, 88, 138, 148</sup>.

Sullivan e Colleman<sup>149</sup>, realizando pesquisas na cidade de Dublin, Irlanda, em população de pacientes portadores do HIV ou AIDS que apresentavam candidose bucal recorrente, sugeriram que os isolados atípicos pertencentes ao gênero *Candida*, poderiam corresponder tanto a

um subgrupo de *C. albicans*, intimamente relacionado com *C. stellatoidea* (considerada atualmente como variante de *C. albicans*), ou a uma espécie distinta ainda não descrita. Resultados de novos estudos demonstraram inequivocadamente, que estes isolados da Irlanda e Austrália formavam um grupo distinto pertencente ao gênero *Candida*, para o qual os autores propuseram classificação como *C. dubliniensis*.

Análises subseqüentes em colônias atípicas de *C. albicans* provenientes da cavidade bucal de pacientes HIV positivos da Suíça, Inglaterra e Argentina revelaram que se tratava de *C. dubliniensis*, o mesmo ocorrendo em diversas partes do mundo, como Bélgica, Canadá, França, Finlândia, Alemanha, Grécia, Espanha e Estados Unidos<sup>17, 19, 56, 88, 128, 149, 150</sup>.

Por serem similares fenotipicamente, acredita-se que *C. dubliniensis* tenha estado presente na comunidade por um longo período de tempo, sendo identificada anteriormente como *C. albicans* ou *C. stellatoidea*<sup>28, 140, 155</sup>.

O isolado mais antigo de *C. dubliniensis* foi anterior à epidemia da AIDS e foi originalmente identificado como *C. stellatoidea*, e estava incluído como cepa referência para esta espécie na Coleção Britânica Nacional de Fungos Patogênicos, sob o número de acesso NCPF 3108<sup>28</sup>. Este espécime foi recuperado *post mortem* de amostra clínica pulmonar proveniente de um paciente inglês, falecido em 1957<sup>155</sup>. Um outro isolado identificado como *C. albicans* em 1952, foi recentemente identificado como *C. dubliniensis* e estava depositado na Centraal Bureau voor Schimmelcultures na Holanda<sup>90, 153</sup>.

Os próximos isolados de *C. dubliniensis* só foram identificados no final da década de 1980 e início dos anos de 1990<sup>149</sup>.

Pesquisas retrospectivas multicêntricas em coleções de leveduras têm sido realizadas em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil, visando identificar entre as espécies de *C. albicans* e *C. stellatoidea*,

aquelas que seriam *C. dubliniensis* e desde quando estariam presente na comunidade<sup>46, 56, 66, 82, 94, 136</sup>.

Esta nova espécie vem sendo relacionada ultimamente com outros locais anatômicos, como vagina, pulmão, fígado e rim, sendo encontrada ainda em fezes, urina, escarro e feridas, e também em pacientes HIV negativos<sup>2, 20, 45, 66, 99, 102, 115, 140</sup>.

No Brasil, *C. dubliniensis* foi isolada pela primeira vez em dois pacientes com AIDS no estado de São Paulo, sendo que um deles era uma criança de 3 anos de idade com candidose orofaríngea<sup>25</sup>.

Numerosos estudos epidemiológicos têm sido realizados utilizando uma grande variedade de métodos, entretanto, os resultados variam consideravelmente<sup>152</sup>. A prevalência de *C. dubliniensis* encontrada na cavidade bucal de pacientes HIV positivos, varia de 1,5% a 32%<sup>39, 89, 94, 119, 152, 159, 161</sup>. Há também uma discordância em relação a prevalência encontrada em indivíduos saudáveis<sup>39, 97, 119, 152</sup>. Sullivan et al.<sup>152</sup>, sugerem que esta prevalência tenha sido subestimada devido ao uso de métodos de identificação e amostragem ineficientes, e também a erros na seleção de sítios anatômicos estudados; e que o habitat natural de *C. dubliniensis* seria a orofaringe e trato respiratório superior. Alguns autores acreditam que este possa ser um microrganismo comensal da cavidade bucal<sup>2, 28</sup>.

A ocorrência de *C. dubliniensis* relatada em pacientes portadores do HIV ou em pacientes com AIDS no Brasil (em torno de 2,8%) é menor do que a encontrada na Europa (18-32%) ou nos Estados Unidos (11,1-17,5%)<sup>25, 94</sup>.

Infecções orais causadas por *C. dubliniensis* têm sido observadas também em indivíduos saudáveis<sup>100</sup>, embora seja mais comum em indivíduos portadores do HIV com história de candidose bucal recorrente<sup>28, 46, 58, 71, 145, 154</sup>.

A importância clínica precisa deste microrganismo requer ainda estudos epidemiológicos, fenotípicos e genotípicos, sendo de particular

importância sua habilidade em desenvolver rapidamente resistência ao fluconazol<sup>57, 98, 99, 140, 149</sup>. Este fato não foi observado entretanto em alguns estudos<sup>2, 111, 123</sup>, onde a grande maioria dos isolados clínicos de *C. dubliniensis* pareceu ser susceptível aos vários antifúngicos como voriconazol, fluconazol, itraconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina<sup>112</sup>. Muitas pesquisas demonstraram que essa predisposição para resistência ao fluconazol depende da exposição a este agente *in vitro*<sup>57, 79, 98, 112</sup>.

De qualquer modo, *C. dubliniensis* é capaz de causar doença em pacientes imunocomprometidos, portadores ou não do HIV, seja ela superficial ou sistêmica<sup>20, 45, 51, 58, 91, 118, 142</sup>. Há relatos de casos extremos em que houve óbito por sepse fúngica, inclusive após o uso de terapia antifúngica apropriada com susceptibilidade estabelecida *in vitro*<sup>23, 24, 90, 94, 156</sup>.

Decorridos 12 anos de sua primeira identificação na Irlanda, isolados de *C. dubliniensis* já foram identificados em pacientes na África do Sul, Alemanha, Arábia Saudita, Argentina, Austrália, Bélgica, Brasil, Canadá, Egito, Espanha, Estados Unidos, Finlândia, França, Grécia, Inglaterra, Israel, Itália, Kuwait, Singapura, Suíça e Turquia<sup>2, 7, 16, 17, 19, 20, 46, 66, 72, 75, 84, 88, 89, 90, 91, 97, 104, 122, 136, 139, 147, 149, 150, 156</sup>.

## 2.2 Identificação fenotípica

No primeiro estudo de isolamento e identificação de *C. dubliniensis* realizado por Sullivan et al.<sup>155</sup>, os autores descreveram esta nova espécie baseados nos testes fenotípicos realizados. A seguinte caracterização fenotípica foi obtida: a) levedura dimórfica apresentando blastoconídeos ovóides ou esféricos; b) crescimento em colônias creme, convexas, quando semeadas em ágar Sabouraud dextrose e creme esbranquiçadas em ágar batata dextrose; c) produção de abundantes clamidoconídeos,

geralmente dispostos em trios ou aos pares, localizados terminalmente em uma única ramificação de pseudohifa (apresenta poucas hifas verdadeiras), quando semeados em microcultivo de ágar fubá adicionado de tween 80 e corante lactofenol azul de algodão; d) produção de tubo germinativo; e) bom crescimento entre 30°C e a 37°C, mas não a 42°C; f) capacidade de assimilação dos açúcares: galactose, glicose, maltose, sacarose, manitol, sorbitol, 2 cetogluconato e glicosamina, porém incapacidade de utilizar as outras 18 fontes de carbono e nitrogênio testadas pelo sistema de identificação API ID 32C; g) capacidade de crescimento na presença de ciclohexamide, mas não na de hidrolisado de esculina; h) pertence ao sorotipo A (aglutina com anticorpo policlonal formado contra o fator antigênico nº 6 de *Candida*); i) habilidade em assimilar palatinose e trealose.

Coleman et al.<sup>28</sup>, propuseram que isolados de *C. dubliniensis* pudessem ser rapidamente diferenciados de *C. albicans* com base na cor da colônia após crescimento no meio cromogênico CHROMágar Candida. Após incubação por 48h a 37°C, colônias de *C. dubliniensis* se apresentariam em cor verde escuro e *C. albicans* em verde claro, o que também foi verificado em estudos posteriores<sup>46, 90, 131, 140, 149, 162, 163</sup>. Vários outros autores, no entanto, alertaram que este meio só era eficaz em cultivo primário, uma vez que *C. dubliniensis* perdia a capacidade de produzir colônia verde escuro após estocagem ou subcultura<sup>46, 113, 139, 149</sup>.

A segurança do meio CHROMagar Candida como método de diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* é discutível. Embora este seja um meio eficaz de diferenciação para verificação de culturas mistas de leveduras e seja útil como método de identificação presuntiva, não deve ser utilizado isoladamente<sup>22, 46, 166</sup>. Há pesquisas em que ambas as espécies apresentaram diversos tons de verde, muitas vezes na mesma placa e pertencentes a uma única espécie<sup>18, 56, 126, 161, 163</sup>. Em outros estudos, cor verde escura da colônia foi obtida mesmo após estocagem<sup>56, 104</sup>. Ellepola et al.<sup>37</sup> encontraram resultados variáveis conforme a marca

comercial do meio cromogênico CHROMagar utilizado. Assim, *C. albicans* apresentou 100% das colônias em verde escuro quando semeadas sobre o meio produzido por Becton Dickinson e *C. dubliniensis*, 64%. Utilizando o meio produzido pela Hardy Diagnostics, tanto *C. albicans* como *C. dubliniensis* apresentaram 82% de colônias em verde escuro, concluindo que neste estudo, os meios não foram eficazes como métodos de diferenciação entre as espécies, independentemente das amostras analisadas serem obtidas por isolamento primário ou cultura secundária (após estocagem).

Muitos relatos demonstraram que os isolados de *C. dubliniensis* são mais sensíveis ao calor quando comparados a *C. albicans*<sup>43, 115, 155, 161</sup>.

A exposição a temperaturas de 42°C e a 45°C, por 48 horas, é considerada um teste fenotípico de diferenciação de fácil realização, no qual *C. albicans* apresenta bom crescimento quando submetida a esta temperatura e *C. dubliniensis* não cresce ou cresce pobremente<sup>28, 37, 58, 71, 115, 134, 149</sup>.

A exposição à temperatura de 45°C é considerada como um marcador fenotípico de diferenciação, embora haja alguns relatos de *C. albicans* que foram incapazes de crescer a esta temperatura<sup>37, 46</sup>. Já a temperatura de 42°C, grande parte de *C. albicans* testadas apresentaram bom crescimento, enquanto que *C. dubliniensis* pobre ou nenhum. No entanto, há relatos de cepas de *C. dubliniensis* que apresentaram bom crescimento a esta temperatura<sup>71, 79</sup> e *C. albicans*, nenhum<sup>43, 79</sup>, o que sugere ser este um método de baixa especificidade<sup>22, 51, 68</sup>. Alguns autores utilizam os testes de exposição a temperaturas diferenciadas como triagem para identificar, entre as cepas de *C. albicans*, aquelas que seriam sugestivas de *C. dubliniensis* e submetidas a novos testes fenotípicos ou bioquímicos, mais caros e trabalhosos<sup>82</sup>. A grande maioria dos autores utiliza este método em associação com outros testes<sup>2, 6, 43, 46, 58, 65, 134</sup>.

Discriminações mais específicas entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* são obtidas por meio da utilização de testes bioquímicos de assimilação de carboidratos<sup>113, 131, 149</sup>.

Os testes de assimilação de carboidratos verificam a habilidade da levedura em utilizar determinado substrato como única fonte de energia. O crescimento da levedura pode ser em meio líquido ou ao redor de uma fonte de carbono quando em meio sólido. Falha no crescimento indica falta de enzimas para utilização dos carboidratos<sup>135</sup>.

O perfil da reação de assimilação fornece um código numérico, o qual sugere uma lista de espécies em ordem de probabilidades, por comparação de perfil com uma base de dados, o APILAB<sup>131, 140, 149</sup>.

Muitos estudos demonstraram que a assimilação de glicerol, D-xilose, metil- $\alpha$ -D-glicosídeo e D-trealose poderia ser utilizado para distinção entre as duas espécies, uma vez que *C. albicans* apresenta inabilidade em assimilar glicerol e, *C. dubliniensis* apresenta inabilidade em assimilar os outros três carboidratos<sup>2, 22, 43, 113</sup>. Foi verificado, no entanto, assimilação de D-trealose e em menor proporção de metil- $\alpha$ -D-glicosídeo por *C. dubliniensis*<sup>37</sup>. Vários autores concordam que capacidade de assimilação de D-xilose parece ser mais seguro como método de diferenciação entre ambas as espécies<sup>22, 37, 41, 43</sup>.

Existem comercialmente vários sistemas de assimilação de carboidratos, desenvolvidos inicialmente para identificação de *C. albicans*<sup>43, 113, 165</sup>. Sullivan et al.<sup>155</sup>, quando isolaram pela primeira vez *C. dubliniensis* em 1995, utilizaram o sistema de identificação de leveduras API ID 32 (bioMérieux), no qual as leveduras atípicas não tiveram correspondência exata com nenhum perfil do banco de dados do APILAB, ou seja, o perfil das cepas atípicas não correspondeu ao de nenhuma levedura conhecida até o momento.

O API 20 C (bioMérieux) surgiu em seguida, sendo utilizado para identificar os primeiros isolados clínicos de *C. dubliniensis* dos EUA<sup>131</sup>. Posteriormente, outros estudos verificaram erro de identificação utilizando

este sistema<sup>57, 165</sup>. O API 20 AUX (bioMérieux) surgiu em substituição ao modelo antigo e incluiu *C. dubliniensis* em sua base de dados<sup>113</sup>. Devido ao alto custo, foi lançado o sistema de identificação Vitek Yeast Biochemical Card (bioMérieux)<sup>162</sup>, e posteriormente o Vitek 2 ID-YST, completamente automatizado, que também incluiu *C. dubliniensis* em sua base de dados, cujo perfil de identificação é similar aos outros sistemas comerciais. Esse sistema apresenta como vantagem, o fato de que se as características morfológicas das leveduras a serem testadas também forem avaliadas, erros ou incapacidade de identificação podem ser reduzidos<sup>48</sup>. Pincus et al.<sup>113</sup> avaliaram sistemas comerciais de assimilação de carboidratos para *C. dubliniensis*, e o Vitek 2 ID-YST foi o que apresentou resultados mais encorajadores.

O aumento da produção de clamidoconídeos e seu arranjo estrutural em pares, trios ou cachos, foram verificados desde a identificação inicial de *C. dubliniensis* por Sullivan et al.<sup>152</sup>, quando as amostras atípicas foram semeadas em microcultivo no ágar fubá adicionado de tween 80. Este fato também é considerado um fator de diferenciação entre as espécies por alguns autores, pois *C. albicans* produz, na maioria das vezes, clamidoconídeos isolados, ao longo ou no final de hifas e pseudohifas. *C. dubliniensis* produz abundantes clamidoconídeos, geralmente arranjados em pares contíguos ou em trios e algumas vezes em grandes cachos<sup>28, 122, 140</sup>. Alguns autores não consideram esta diferença significativa e acreditam que a diferenciação entre as espécies não pode ser baseada numa eventual formação e disposição de clamidoconídeos<sup>37, 161</sup>.

A verificação da formação de tubo germinativo é simples, eficiente e econômica, sendo realizada rotineiramente para identificação de *C. albicans*, mas não na diferenciação entre espécies. Aproximadamente 95% a 97% de *C. albicans* produzem tubo germinativo quando incubadas em soro a 37°C, durante 2 - 4 horas. Contudo, nas mesmas condições *C.*

*dublinskiensis*, *C. stellatoidea* e *C. tropicalis* são também capazes de produzir tubo germinativo<sup>22</sup>.

A aplicação de análises baseadas na morfologia das colônias de *C. dublinskiensis* e *C. albicans*, bem como verificação da capacidade em produzir abundantes clamidoconídeos quando semeadas em meios de cultura suplementados com extratos de plantas, tem sido utilizada pelos pesquisadores na busca de um meio de cultura que seja rápido, tenha baixo custo e possa ser aplicado com segurança à rotina de um laboratório de microbiologia<sup>67, 68, 69, 79, 152</sup>.

Muitas pesquisas surgiram nos últimos anos com a utilização de meios de cultura específicos para diferenciação entre *C. albicans* e *C. dublinskiensis*, como ágar girassol que utiliza sementes de girassol pulverizadas em sua constituição e que inicialmente foi desenvolvido para identificação de *Cryptococcus neoformans*, (também chamado de ágar Pal's), o ágar caseína, que utiliza leite desnatado, o ágar tabaco, que utiliza fumo, e mais recentemente o ágar suco de tomate, que utiliza suco de tomate industrializado (também chamado de ágar V8). Todos estes meios apresentam sua base de diferenciação na ausência ou presença de abundantes clamidoconídeos, quando forem semeados com *C. albicans* ou *C. dublinskiensis*, respectivamente. Com exceção do ágar caseína, os outros meios também se baseiam na aparência macroscópica do crescimento da levedura, sendo que *C. dublinskiensis* apresenta aparência rugosa com formação de franja hifal ao redor da colônia, devido a abundante produção de pseudohifas. *C. albicans* apresenta colônias lisas e sem franja<sup>6, 11, 68, 101, 144, 145</sup>.

Alguns autores acreditam que estes meios, embora altamente específicos, não devem ser utilizados isoladamente, porém dois ou mais meios conjuntamente, para se obter uma diferenciação significativa entre as espécies. Estes meios apresentam como desvantagens o período de incubação, que em alguns casos chega a 96 horas, e o fato de não serem meios prontamente disponíveis em laboratórios de microbiologia<sup>22, 152</sup>.

Outros testes fenotípicos são descritos na literatura visando o marcador fenotípico ideal para identificação de *C. dubliniensis*, como a atividade de  $\beta$ -D-glucosidase, fluorescência em ágar Sabouraud dextrose azul de metileno; verificação da produção de proteinase extracelular; habilidade para redução do sal tetrazólio; inabilidade de crescimento em caldo de Sabouraud hipertônico, entre outros<sup>22, 25, 46, 74, 139, 140, 152, 167</sup>.

### 2.3 Identificação genotípica

Técnicas moleculares como a caracterização do DNA mitocondrial, o polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em campo pulsátil (PFGE) são ferramentas que vêm sendo empregadas na obtenção de conclusões fidedignas sobre a relação filogenética entre as espécies de fungos<sup>73, 80, 106, 116, 153</sup>.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método *in vitro* que se utiliza de enzimas sintéticas ou iniciadores (*primers*) para amplificar, exponencialmente, seqüências específicas de ácido desoxirribonucléico (DNA) ou de ácido ribonucléico (RNA), extraído de uma célula ou de um grupo de células<sup>93</sup>. Este método só foi possível graças à introdução de uma enzima termoestável, similar a extraída de uma bactéria que vive em fontes térmicas (*Thermus aquaticus*), a *Taq* polimerase, a qual permanece ativa mesmo em altas temperaturas. É uma técnica rápida, levando cerca de duas horas para completar seu ciclo. A reação em cadeia da polimerase consiste dos seguintes estágios: o aquecimento a 95°C desnatura o DNA de fita dupla, a seguir o resfriamento a 60°C permite que ocorra o anelamento dos *primers* em excesso com suas seqüências complementares no DNA alvo, então ocorre à extensão ou alongamento de cada *primer* gerando fitas recém sintetizadas do fragmento de restrição

que funcionou como molde, ou seja, a Taq polimerase vai associando os nucleotídeos presentes na reação à extremidade 5' por polarização de desoxinucleotídeos (dNTPs) até a extremidade 3' do fragmento de restrição. A Taq polimerase pode estender os *primers* em temperatura de até 72°C. Quando a síntese se completou, toda a mistura é aquecida ainda mais (até 95°C), para a desnaturação dos dúplices de DNA recém-formados. A temperatura é novamente reduzida, ocorre outro ciclo de síntese, porque ainda está presente um excesso do *primer*. A repetição dos ciclos de síntese (resfriamento) e desnaturação (aquecimento) amplifica rapidamente a seqüência de interesse e faz com que ela aumente exponencialmente. Os produtos do PCR são geralmente visualizados por eletroforese em gel de agarose acrescido de brometo de etídeo e podem ser visualizados sob luz ultravioleta<sup>34, 77</sup>. A característica mais importante da PCR é a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de DNA a partir de pouca quantidade de material<sup>55, 93</sup>.

A separação de moléculas de ácidos nucléicos em laboratório de biologia molecular é realizada com o auxílio da técnica de eletroforese. Esta técnica se baseia na movimentação das moléculas através de uma matriz tamponada, feita de amido, agarose ou acrilamida. A matriz funciona como um filtro, separando as moléculas de acordo com o tamanho e carga elétrica. No caso dos ácidos nucléicos, o grupo fosfato é responsável pela forte carga negativa em condições de pH neutro, fazendo com que os fragmentos migrem para o pólo positivo durante a eletroforese. Como a carga elétrica dos fragmentos é negativa, a separação ocorrerá com base no comprimento dos fragmentos de DNA. Assim, fragmentos menores migrarão mais rapidamente na direção do pólo positivo, enquanto os maiores migrarão mais lentamente. Desta forma, fragmentos de diferentes tamanhos são separados ao longo dos dois pólos no gel de agarose<sup>5, 124, 141</sup>.

A agarose é uma forma pura de ágar, obtida de algas marinhas. A eletroforese em gel de agarose utiliza além da agarose, uma solução

tampão de tris, ácido bórico e EDTA (TBE) e o brometo de etídeo. O brometo de etídeo é um corante fluorescente de alta toxicidade e mutagenicidade, que revela os ácidos nucleicos ao ser excitado por luz ultravioleta, e se intercala entre as fitas de DNA ou entre a fita de RNA, e deve ser utilizado em baixas concentrações<sup>34, 124</sup>.

Os ácidos nucleicos são visualizados colocando-se o gel em um aparelho que emite luz ultravioleta, o transiluminador. Cada banda individual no gel é constituída por milhões de fragmentos de DNA do mesmo tamanho<sup>5, 77</sup>.

O polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD) foi uma grande inovação na área dos marcadores moleculares baseados em PCR, pois utiliza um único *primer* de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos do segmento do DNA a ser amplificado, também de seqüência arbitrária. A freqüência de amplificação de um segmento depende da probabilidade do *primer* utilizado encontrar duas seqüências complementares (sítios de iniciação) em orientação oposta ao longo do DNA e a uma distância amplificável, no máximo de alguns milhares de pares de base. Após este processo obtêm-se fragmentos anônimos do genoma, que não necessariamente codificam proteínas específicas e cuja seqüência de bases não é conhecida<sup>5, 116, 141, 164</sup>.

As primeiras evidências de que os isolados de *C. dubliniensis* representavam um grupo de microrganismos distintos de *C. albicans* resultaram dos estudos genéticos<sup>152</sup>. Quando o DNA genômico das amostras consideradas atípicas eram digeridos com a enzima *EcoRI* e submetidos a sonda 27A, descrita por Scherer & Stevens<sup>137</sup>, os padrões obtidos foram constituídos por menor número e por bandas mais fracas do que normalmente esperado para *C. albicans*.

Isolados de *C. dubliniensis* produzem distintos comprimentos de fragmentos quando o DNA genômico é digerido pela enzima de restrição

*Hinfl*, a qual cliva DNA em maior número de fragmentos em relação à *EcoRI*<sup>28, 140, 149, 155</sup>. O polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD) também resulta em um perfil totalmente distinto para *C. dubliniensis*, confirmando se tratar de uma nova espécie<sup>28, 148, 149, 155</sup>.

A restrição do DNA genômico de *C. dubliniensis* por *Hinfl* gera um fragmento de massa molecular muito grande, o qual é indetectável em isolados de *C. albicans* e *C. stellatoidea*<sup>140</sup>.

Informações adicionais confirmaram a organização única do genoma de *C. dubliniensis* utilizando sondas de oligonucleotídeos contendo uma seqüência repetida modificada: (GGAT)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub>, (GATA)<sub>4</sub>, (GT)<sub>8</sub> e (GTG)<sub>5</sub><sup>28, 155</sup>.

Isolados de *C. dubliniensis* também possuem um cariótipo padrão de 10 ou mais bandas de cromossomos de DNA, que podem ser obtidas após separação por eletroforese, com uma ou mais bandas menores que 1MB em tamanho, o que também é encontrado em *C. stellatoidea*<sup>28, 36, 140, 149, 155</sup>. Em *C. albicans*, sete ou oito bandas são encontradas, embora pequenos cromossomos supranumerários ou fragmentos cromossomais tenham sido observados<sup>28, 40, 149, 155</sup>.

O método mais adequado para determinar a relação genética entre espécies individuais, envolve a comparação da seqüência de nucleotídeos dos genes decodificados do RNA ribossômico. Os genes do RNA ribossômico são evolutivamente mais conservados e estão presentes no genoma eucariótico em múltiplas cópias. A análise da seqüência do nucleotídeo da região variável V3 da subunidade de RNA ribossômico também foi realizada nas cepas de *C. dubliniensis* recuperadas de indivíduos infectados pelo HIV e em cepas referências de *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. kefyr* e *C. krusei*, comprovando que os isolados atípicos estudados formavam um grupo homogêneo com 100% de similaridade, significativamente diferente das outras espécies analisadas<sup>28, 149, 155</sup>.

Boerlin et al.<sup>17</sup>, desenvolveu uma técnica molecular de eletroforese de enzima com múltiplos locus (MEE), para diferenciar *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Esta técnica detecta diferenças genéticas em populações de microrganismos, resultante de divergências evolutivas. MEE detectou o gene alelo de *C. dubliniensis* claramente distinto de *C. albicans* ou *C. stellatoidea*, porém verificou pouca divergência entre as espécies, sendo que geneticamente *C. albicans* foi a espécie mais próxima de *C. dubliniensis*.

A comparação da seqüência da subunidade menor do RNAr de *C. dubliniensis* com a seqüência previamente obtida de outras espécies do gênero *Candida*, demonstrou divergência entre *C. dubliniensis* e *C. albicans* de 1,4%, que correspondeu a 25 pb<sup>47</sup>.

Dados filogenéticos baseados na análise da seqüência genética de RNAr demonstraram que *C. albicans* e *C. dubliniensis* são intimamente relacionadas e que aparentemente elas divergiram em um tempo de evolução relativamente recente<sup>47</sup>. A forte relação entre estas duas espécies concorda com suas similaridades fenotípicas<sup>152</sup>.

Embora possa haver similaridades entre pares de genes homólogos, o genoma de *C. albicans* e *C. dubliniensis* difere significativamente. Joly et al.<sup>62</sup> demonstraram que o genoma de *C. dubliniensis* contém duas vezes o número de cópias de seqüência repetida RPS quando comparado ao genoma de *C. albicans* e que esta reorganização duas vezes mais freqüente, pode resultar em alto nível de instabilidade cariotípica frequentemente observada em *C. dubliniensis*. O alto nível de homozigose observada no pareamento do locus MTL fornece evidências para os níveis aumentados de recombinação mitótica dentro do genoma de *C. dubliniensis*, o que talvez explique a rápida adaptação a mudanças de condições ambientais<sup>152</sup>.

Donnelly et al.<sup>32</sup> verificou que as outras técnicas moleculares para diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* não eram adequadas para o alto número de amostras na rotina de um laboratório de

diagnóstico, e que as principais diferenças entre as espécies são mais evidentes ao nível genético e deveriam servir de base para um teste de identificação específico e rápido. Para os autores, a reação em cadeia da polimerase (PCR), pareceu representar a técnica molecular mais adequada, por ser rápida, reprodutível e com capacidade de aplicação em grande volume de amostras clínicas.

Os *primers* inicialmente utilizados nas reações de PCR eram *primers* homólogos para seqüência específica de *C. albicans*, tais como o OREN e o CARE-2, os quais produziam produtos distintos após amplificação por PCR com DNA de cepa referência de *C. dubliniensis*<sup>149</sup>. Donnelly et al.<sup>32</sup> descreveram uma reação padrão de PCR, utilizando pela primeira vez, um par de *primers* de oligonucleotídeos específicos para *C. dubliniensis*, o DUBF/DUBR.

A identificação de *C. dubliniensis* em coleção fúngica brasileira, feita por Mariano et al.<sup>82</sup> em 2003, utilizou o RAPD realizado com três diferentes *primers*, o CDU (o qual produziu 7 fortes bandas para *C. dubliniensis* e 6 para *C. albicans*, com tamanhos moleculares variando de 300 a 1300 pb), o B-14 (produziu 6 fortes bandas para *C. dubliniensis* e 5 para *C. albicans*, com tamanho molecular variando de 400 a 2000 pb) e o M-2 (produziu 8 fortes bandas para *C. dubliniensis* e 5 para *C. albicans*, com tamanhos moleculares variando de 300 a 1600 pb). Todos os *primers* utilizados exibiram bandas de alta densidade e permitiram uma interpretação visual segura dos padrões de *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

A extração do DNA para ser utilizado em PCR apresenta várias metodologias descritas na literatura, podendo ser realizada por métodos físicos (fervura ou sonicação) ou químicos (enzimas que visam eliminar as macromoléculas contaminantes, como proteínas e RNA que estejam acopladas ao ácido nucléico)<sup>49, 79, 93, 117, 134</sup>.

### 3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo identificar cepas de *Candida dubliniensis* entre as espécies isoladas e inicialmente identificadas como *Candida albicans*, provenientes da cavidade bucal de: pacientes transplantados cardíacos sob terapia com imunossupressores, pacientes com tuberculose submetidos a antibioticoterapia prolongada, pacientes HIV positivos e indivíduos saudáveis, presentes em coleção de espécies do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UNESP/ São José dos Campos.

As cepas isoladas foram submetidas as seguintes avaliações fenotípicas: a) verificação da produção de tubo germinativo; b) formação e arranjo estrutural de clamidoconídeo em ágar fubá, ágar caseína, ágar tabaco e ágar girassol; c) crescimento a temperatura de 45°C.

Após a realização destes testes, as amostras foram submetidas a identificação genotípica pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/ UNESP, sob protocolo n° n° 096/ 2004-PH/CEP (Anexo A).

### **4.2 Origem das amostras**

Duzentas cepas de leveduras do gênero *Candida*, provenientes de coleção de amostras, do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/ UNESP, inicialmente classificadas como *C. albicans*, foram incluídas no presente estudo. Estas cepas foram provenientes de estudos anteriores e foram isoladas de pacientes transplantados cardíacos sob terapia com imunossupressores, pacientes com tuberculose submetidos à antibioticoterapia prolongada, pacientes HIV positivos e indivíduos saudáveis. Cada um dos 4 grupos incluiu cinquenta cepas analisadas. As cepas foram semeadas em placas contendo ágar Sabouraud dextrose e após crescimento de colônias características foram submetidas a coloração de Gram. A seguir, as colônias foram transferidas para ágar Sabouraud dextrose inclinado e submetidas aos testes descritos a seguir, para identificação fenotípica e genotípica de *C. dubliniensis*.

### 4.3 Identificação fenotípica

Em todos os testes fenotípicos foram incluídas uma cepa referência de *C. albicans* (ATCC 18804) e uma cepa referência de *C. dubliniensis* (NCPF 3108).

#### 4.3.1 Produção de tubo germinativo

Foi adicionada uma alçada de cultura pura de 24 h da cepa a ser testada em tubo de ensaio (13x17 mm) contendo 0,5 ml de soro estéril humano. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C, pelo tempo mínimo de 2 e máximo de 3 horas. A formação de tubo germinativo foi observada em microscopia de luz (aumento de 400 vezes), colocando-se uma gota da suspensão entre lâmina e lamínula. Esta prova é positiva para *C. albicans* e *C. dubliniensis* e negativa para as demais espécies<sup>140</sup>.

#### 4.3.2 Formação e arranjo estrutural de clamidoconídeos em ágar fubá

Foi utilizado o meio Corn Meal Ágar (Difco) adicionado de 1% de Tween 80, na seguinte proporção: 0,85 g de ágar fubá; 0,5 ml de Tween 80 e 50 ml de água destilada. Para a execução da prova o ágar previamente fundido foi distribuído em lâminas de vidro, colocadas no interior de placas de Petri esterilizadas. Após a solidificação do ágar, cada cepa de levedura a ser testada foi semeada em estria única na superfície do meio e colocada uma lamínula esterilizada no centro da lâmina. Após incubação por 48 a 72 horas em temperatura ambiente, a leitura foi

realizada com microscopia de luz (aumento de 400 vezes), observando-se presença de clamidoconídeos. *C. albicans* produz clamidoconídeos únicos no final ou ao longo de hifas e pseudohifas<sup>117, 140</sup>. *C. dubliniensis* produz abundantes clamidoconídeos, geralmente arranjados em pares contíguos ou em trios e algumas vezes em grandes cachos<sup>28, 128</sup>. Foram observadas também a presença de hifas/ pseudohifas e leveduras.

#### 4.3.3 Ágar Caseína

Todas as cepas estudadas foram inicialmente semeadas por 48 horas a 30°C em ágar Sabouraud. O meio de cultura utilizado foi baseado em Mosca et al.<sup>101</sup>, conforme Quadro 1.

Quadro 1- Ágar Caseína segundo Mosca et al.<sup>101</sup>

Ágar Caseína
<ul style="list-style-type: none"><li>◆ dissolver 10 g de leite desnatado em 90 ml de água destilada;</li><li>◆ dissolver 3 g de ágar em 97 ml de água destilada;</li><li>◆ autoclavar ambas soluções separadamente a 121°C por 15 minutos;</li><li>◆ resfriar as soluções a 45- 50°C, misturar e verter 25 ml em placas de Petri (90 mm de diâmetro).</li><li>◆ Incubar a 24°C por 48 horas.</li></ul>

Após incubação, amostras do crescimento das culturas foram coradas com lactofenol azul de algodão, e examinadas em microscopia de luz, com aumento de 100 e 400X para verificação da produção de clamidoconídeos. Clamidoconídeos abundantes se apresentavam corados de azul escuro, e arranjados em grupos ao redor de crescimento pseudomicelial.

#### 4.3.4 Ágar Tabaco

Todas as cepas estudadas foram provenientes de subcultura de 24 horas em ágar Sabouraud, incubadas a 37°C. O meio foi realizado segundo proposto por Khan et al.<sup>68</sup>, conforme Quadro 2.

Quadro 2 – Ágar Tabaco segundo Khan et al.<sup>68</sup>

Ágar Tabaco
<ul style="list-style-type: none"><li>◆ misturar 50 g de tabaco proveniente de cigarros (Malboro; alcatrão 8 mg; nicotina 0,6 mg; Philips Morris Products SA) em 1 litro de água destilada;</li><li>◆ ferver a mistura por 30 minutos;</li><li>◆ filtrar em várias camadas de gaze;</li><li>◆ adicionar 20 g de ágar e ajustar o volume para um litro;</li><li>◆ ajustar o pH da solução para 5,4.</li><li>◆ autoclavar a 121°C por 15 minutos,</li><li>◆ verter 20 ml do meio em placas de Petri (90 mm de diâmetro);</li><li>◆ semear uma pequena porção (coletada com alça de platina) do inóculo proveniente de colônias isoladas;</li><li>◆ incubar a 28°C e observar diariamente até período de 96 h.</li></ul>

*C. dubliniensis* produziu crescimento irregular, alaranjado e com franja hifal periférica, após incubação a 28°C por 48/72h. Formou abundantes clamidoconídeos sob a franja hifal periférica quando uma amostra desse crescimento foi corada com lactofenol azul de algodão, e examinada em microscopia de luz, com aumentos de 100 e 400X. As colônias também foram observadas diretamente em lupa estereoscópica (Zeiss- Stemi 2000-C) com aumentos de 10 e 40X. *C. albicans* se

apresentou branco-creme, lisa e sem franja hifal ou clamidoconídeos, mesmo após observação por mais de 10 dias.

#### 4.3.5 Ágar Girassol (Meio Pal's Agar)

Todas as cepas estudadas foram provenientes de subcultura de 24 horas em ágar Sabouraud, incubadas a 37°C. O meio de cultura foi preparado de acordo com Al Mosaid et al.<sup>6</sup>, conforme Quadro 3

Quadro 3 – Ágar Girassol segundo Al Mosaid et al.<sup>6</sup>

Ágar Girassol
<ul style="list-style-type: none"><li>◆ utilizar 50 gramas de semente de girassol não salgado processado em liquidificador/ processador caseiro até virar pó durante 5 minutos, permite estocar até no máximo 5 dias;</li><li>◆ adicionar 1 litro de água destilada, ferver por 30 minutos. Esperar esfriar e filtrar em várias camadas de gaze num funil de vidro;</li><li>◆ adicionar 1 g de glicose; 1 g de fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); e 1 g de creatinina;</li><li>◆ ajustar o pH da solução para 5,5. O volume é completado para 1 litro;</li><li>◆ adicionar 15 g de ágar puro;</li><li>◆ autoclavar a 110°C durante 20 minutos;</li><li>◆ verter 25 ml de meio por placa (90 mm de diâmetro);</li><li>◆ semear pequenas porções (coletada com alça de platina) do inóculo proveniente de colônias isoladas;</li><li>◆ incubar a 30°C e observar diariamente até período de 10 dias.</li></ul>

*C. dubliniensis* e *C. albicans* apresentavam colônias creme acinzentadas lisas e regulares.

*C. dubliniensis* apresentou macroscopicamente, franja hifal periférica, e microscopicamente formava clamidoconídeos em 48 a 72 horas, visualizados em microscopia de luz, com aumentos de 100 e 400X.

*C. albicans* não deveria apresentar franja hifal inicialmente, somente após 10 dias de incubação e não produzir clamidoconídeos neste meio.

#### 4.3.6 Crescimento a temperatura de 45°C

Todas as cepas estudadas foram inicialmente semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco), e incubadas a 37°C por 24 h. Uma pequena porção do crescimento foi novamente semeada, por esgotamento, em ágar Sabouraud dextrose e incubada a 45°C. O crescimento foi verificado visualmente em 24 e 48 h da incubação. Todas as cepas que apresentaram crescimento negativo a 45°C, foram novamente semeadas e incubadas a esta temperatura para confirmação dos resultados<sup>28, 107, 128</sup>.

Para chegarmos a classificação de bom ou pobre crescimento, a placa de Petri foi dividida em 4 quadrantes, e considerou-se um bom crescimento quando no mínimo 2 quadrantes apresentavam crescimento de colônias após ser submetido a temperatura de 45°C e, crescimento pobre foi considerado quando apenas um quadrante apresentou crescimento de colônias<sup>79, 161</sup>.

#### 4.4 Identificação genotípica

A identificação genotípica foi realizada em três etapas: extração do DNA das cepas estudadas e das cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 18804) e *C. dubliniensis* (NCPF 3108); reação em cadeia da polimerase (PCR); e, visualização dos produtos obtidos no PCR por eletroforese em gel de agarose.

##### 4.4.1 Extração do DNA

As cepas estudadas foram inicialmente semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco), e incubadas a 37°C por 24 h.

A extração do DNA foi realizada pela técnica da fervura segundo o proposto por Mähniß et al.<sup>79</sup>.

A coleta do crescimento da cepa testada foi realizada com palitos de madeira esterilizados. Esses palitos eram previamente colocados no interior de uma placa de Petri e autoclavados a 120°C durante 15 minutos.

Uma pequena porção da cepa de *Candida* a ser testada foi transferida, com o auxílio do palito de madeira esterilizado, para um tubo Eppendorf contendo 75 µL de água destilada estéril.

Os tubos Eppendorf foram então submetidos à um pulso em centrifuga a 14.000 Xg. para que todo material fosse retirado das paredes e misturado. A seguir, foram incubados em banho-maria a 95°C por 10 minutos. Após este período, as amostras foram novamente centrifugadas, desta vez a 15.000 Xg. por 15 minutos, em centrifuga refrigerada, a 0°C.

As amostras foram armazenadas em congelador a 20°C negativo.

O volume de 2 µL do material obtido foi utilizado para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

#### 4.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A identificação de *C. dubliniensis* foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com o método proposto por Mähniß et al.<sup>79</sup> com modificações, pois utilizamos o PCR Master MIX (Promega), que já inclui a Taq DNA Polimerase, os trifosfatos de desoxinucleosídeos (dNTPs) e o cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), ao invés dos componentes em separado.

A mistura para PCR teve um volume total final de 25 µL e foi composta por:

- 2 µL da amostra de DNA;
- 1 µL de cada *primer* (IDT) - foram utilizados dois pares para esta amplificação; o primeiro par inclui os universais:
  - Uni-f: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
  - Uni-r: 5'-GGTCCGTGTTCAAGACG-3'e o segundo par é específico para *C. dubliniensis*:
  - DUBF Act-f: 5'-GTATTTGTCGTTCCCCTTTC-3'
  - DUBR Act-r: 5'-GTGTTGTGTGCACTAACGTC-3'
- 12,5 µL de PCR Master Mix
- 6,5 µL de água para biologia molecular desmineralizada (Invitrogen);

A seguir as amostras foram para o termociclador automático (Mastercycler- Eppendorf) aonde foram submetidas as seguintes condições:

- desnaturação a 95°C por 3 minutos;
- anelamento dos *primers* a 58°C por 30 segundos;
- extensão a 72°C por 60 segundos seguida por uma extensão final de 10 minutos a 72°C no último ciclo.

A partir do 2º ciclo, a desnaturação passou a ter duração de 30 segundos ao invés de 3 minutos, na temperatura de 95°C. A amplificação foi realizada durante 30 ciclos, e teve duração aproximada de 2 horas.

#### 4.4.3 Eletroforese

Os produtos da PCR foram separados em gel de 1,5% de agarose adicionado de 1,0 µl de solução de brometo de etídio. A migração foi feita a 80V por um período de aproximadamente 30 minutos. O tampão de corrida utilizado foi o TBE (0,89 M Tris-Base, 0,89 M ácido bórico, 20 mM EDTA, pH 8,0).

O gel de agarose foi colocado no interior de um recipiente ainda em forma líquida e nele foram introduzidos pentes; após a solidificação, o gel foi colocado no interior do aparelho de eletroforese. Uma solução tampão de TBE foi vertida sobre o gel para conduzir a eletricidade e impedir o gel de secar; os pentes foram removidos para obtenção de orifícios ou poços.

Para visualização dos produtos de amplificação e para localizarmos o andamento da corrida da eletroforese a olho nu, foi acrescentado o corante azul de bromofenol.

O DNA amplificado e o corante foram colocados nos poços nas seguintes proporções:

- 3 µl de azul de bromofenol;
- 3 µl da amostra de DNA amplificado.

Ao final de cada fileira foi colocado um marcador de peso molecular (Ladder 100 pb Gilco) adicionado do azul de bromofenol na mesma proporção utilizada (3 µl de azul de bromofenol e 3 µl do Ladder).

A corrente elétrica de 80 V foi aplicada aos eletrodos do aparelho de eletroforese, criando um campo elétrico ao longo do gel.

Após 30 minutos a eletroforese foi desligada, quando o azul de bromofenol tinha percorrido 2/3 do gel ou mais.

Os produtos foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta UV (marca UVP, modelo M-20, comprimento de onda de 302 nm).

#### **4.5 Análise estatística**

Os resultados obtidos na identificação fenotípica e genotípica foram submetidos ao teste t de *student*, para análise de concordância entre os métodos de identificação. A identificação genotípica serviu como padrão ouro de eficiência para análise de cada método fenotípico realizado.

#### **4.6 Análise de custos**

Os custos dos métodos fenotípicos e genotípico foram analisados considerando-se os valores específicos gastos para cada prova realizada, sem se levar em conta os gastos gerais, como ágar Sabouraud, placas de Petri descartáveis, pessoal técnico e equipamentos necessários em todos os laboratórios de microbiologia.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Identificação fenotípica

#### 5.1.1 Formação de tubo germinativo

A formação do tubo germinativo estava presente em 100% das duzentas cepas testadas, uma vez ser esta uma característica tanto de *C. albicans* como de *C. dubliniensis*. Neste caso, a formação de tubo germinativo serviu para confirmar se tratar de uma destas duas espécies.

#### 5.1.2 Formação e arranjo estrutural de clamidoconídeos em ágar fubá

A formação e arranjo estrutural de clamidoconídeos quando a cepa foi semeada em ágar fubá Tween 80, apresentou-se diferente para as duas espécies. A cepa padrão de *C. albicans* produziu clamidoconídeos únicos no final ou ao longo de hifas e pseudohifas<sup>117, 140</sup>, e cepa padrão de *C. dubliniensis* produziu abundantes clamidoconídeos arranjados aos pares, trios ou grandes cachos<sup>28, 128</sup>. Todas as cepas deveriam apresentar formação desta estrutura, por ser uma característica das duas espécies.

As leveduras do gênero *Candida* que apresentaram clamidoconídeos únicos correspondeu a 129 (64,5%) das 200 cepas testadas. O grupo que apresentou clamidoconídeos arranjados em cachos correspondeu a 48 (24%) cepas e, o grupo que se apresentou em estágio intermediário correspondeu a 23 (11,5%) cepas, conforme pode ser observado na Tabela 1. Nas Figuras 1A e 1B podemos observar cepa sugestiva de *C. albicans* e cepa padrão de *C. dubliniensis*. As cepas

chamadas intermediárias foram consideradas sugestivas de *C. albicans* por apresentarem a maioria das estruturas únicas e alguns pares, porém foram discriminadas na tabela para fins de fidelidade aos resultados obtidos.

Tabela 1 - Número e porcentagem de cepas que produziram clamidoconídeos únicos, em cachos e intermediários quando semeadas em ágar fubá

<i>Clamidoconídeos</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>Identificação sugestiva</i>
Únicos	129	64,5	<i>C. albicans</i>
Cachos	48	24	<i>C. dubliniensis</i>
Intermediários	23	11,5	<i>C. albicans</i>

### 5.1.3 Formação e arranjo estrutural de clamidoconídeos em ágar caseína

*C. dubliniensis* apresentou capacidade de formação de clamidoconídeos quando semeada neste meio, e estes se apresentavam corados de azul escuro, arranjados ao redor de crescimento pseudomicelial, enquanto *C. albicans* apresentou raros ou ausentes clamidoconídeos<sup>101</sup>. Este meio de cultura não forneceu leitura visual de formação de franja hifal, apenas microscópica.

Das cepas testadas 135 (67,5%) apresentaram ausência de clamidoconídeos; 35 (17,5%) apresentaram poucos clamidoconídeos e 30 (15%) apresentaram clamidoconídeos abundantes e/ou em cachos conforme pode ser observado na Tabela 2.

Nas Figuras 2A e 2B podemos observar cepa sugestiva de *C. albicans* e cepa padrão de *C. dubliniensis* com ausência e presença de clamidoconídeos, respectivamente.

Tabela 2 - Número e porcentagem de cepas clamidoconídeos ausentes (sem capacidade de formação de clamidoconídeos), raros e em cachos (ou abundantes) quando semeadas em ágar caseína

<i>Clamidoconídeos</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>Identificação sugestiva</i>
Ausentes	135	67,5	<i>C. albicans</i>
Raros	35	17,5	<i>C. albicans</i>
Cachos	30	15	<i>C. dubliniensis</i>

#### 5.1.4 Formação e arranjo estrutural de clamidoconídeos em ágar tabaco

A cepa padrão de *C. dubliniensis* produziu crescimento irregular, alaranjado, com franja hifal periférica e formou abundantes clamidoconídeos de cor azul escuro sob esta franja, quando uma amostra do crescimento foi corada com lactofenol azul de algodão, conforme pode ser observado na Figura 3B. As colônias de *C. albicans* deveriam se apresentar apenas em cor branca ou creme, lisas e sem franja hifal ou clamidoconídeos, mesmo após observação por mais de 10 dias<sup>68</sup>, conforme pode ser visualizado na Figura 3A.

Esses dados não foram encontrados em nossos resultados, onde pudemos visualizar colônias brancas, irregulares com franja e clamidoconídeos, e também algumas colônias laranja com faixas brancas em seu interior, conforme pode ser visualizado nas Figuras 4A e 4B.

Das cepas testadas 161 (80,5%) apresentaram ausência de clamidoconídeos quando semeadas neste meio; 23 (11,5%) apresentaram poucos clamidoconídeos e 16 (8%) apresentaram clamidoconídeos abundantes e/ou em cachos, conforme pode ser observado na Tabela 3. A presença ou não de franja hifal periférica pode ser observada na Tabela 4.

Nas Figuras 5A e 5B, podemos observar o aspecto microscópico da formação de clamidoconídeos em ágar tabaco, onde se observou respectivamente cepa sugestiva de *C. albicans* com ausência de clamidoconídeos e cepa padrão de *C. dubliniensis*, com numerosos clamidoconídeos.

Tabela 3 - Número e porcentagem de cepas clamidoconídeos ausentes, raros e em cachos quando semeadas em ágar tabaco

<i>Clamidoconídeos</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>Identificação sugestiva</i>
Ausentes	161	80,5	<i>C. albicans</i>
Raros	23	11,5	<i>C. albicans</i>
Cachos	16	8	<i>C. dubliniensis</i>

Tabela 4 - Número e porcentagem de cepas positivas e negativas para franja hifal periférica quando semeadas em ágar tabaco

<i>Franja Hifal Periférica</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>Identificação sugestiva</i>
Presente	24	12	<i>C. dubliniensis</i>
Ausente	176	88	<i>C. albicans</i>

### 5.1.5 Formação e arranjo estrutural de clamidoconídeos em ágar girassol

*C. albicans* e *C. dubliniensis* deveriam apresentar colônias creme acinzentadas lisas e regulares quando semeadas em ágar girassol. *C. dubliniensis* apresentou franja hifal e clamidoconídeos em 48 a 72 horas da incubação, já *C. albicans* somente deveria apresentar franja hifal após 10 dias de incubação e não produzir clamidoconídeos neste meio, mesmo após este período<sup>6</sup>, conforme pode ser visualizado nas Figuras 6A, 6B e 7A, 7B, respectivamente.

Esses dados foram encontrados na maioria, mas não em todos os nossos resultados.

Das cepas testadas, 17 (8,5%) apresentaram clamidoconídeos quando semeadas neste meio; 178 (89%) apresentaram ausência e 5 (2,5%) apresentaram poucos clamidoconídeos, conforme pode ser observado na Tabela 5.

A presença de franja hifal periférica foi examinada microscópica e visualmente durante 10 dias. Os resultados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 5 - Número e porcentagem de cepas clamidoconídeos presentes, ausentes e raros quando semeadas em ágar girassol

<i>Clamidoconídeos</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>Identificação sugestiva</i>
Presentes	17	8,5	<i>C. dubliniensis</i>
Ausentes	178	89	<i>C. albicans</i>
Raros	5	2,5	<i>C. albicans</i>

Tabela 6 - Número e porcentagem de cepas positivas para franja hifal periférica quando semeadas em ágar girassol

<i>Franja Hifal Periférica</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>Identificação sugestiva</i>
Presente	15	7.5	<i>C. dubliniensis</i>
Ausente	185	92.5	<i>C. albicans</i>

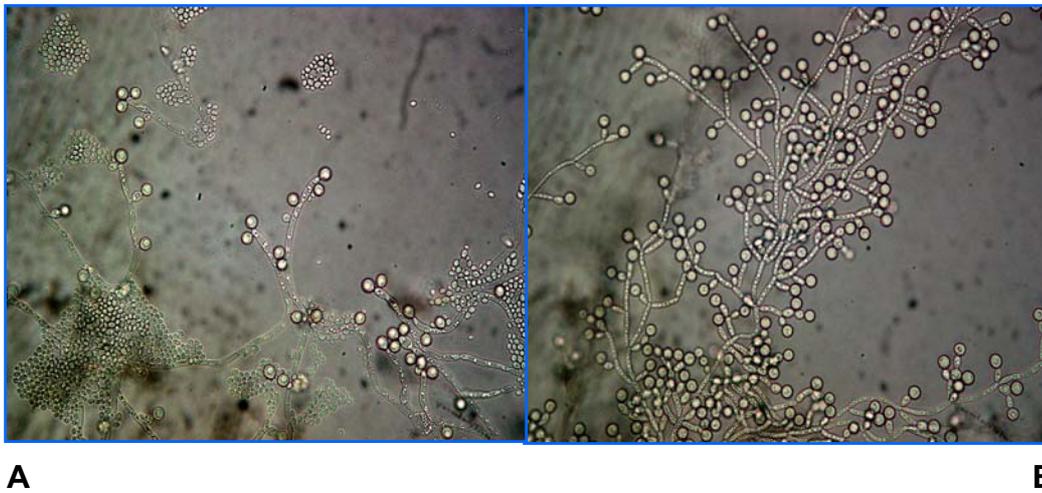
### 5.1.6 Crescimento a temperatura de 45°C

*C. albicans* apresentou bom crescimento quando submetida a esta temperatura e *C. dubliniensis* por ser mais sensível a temperaturas elevadas não cresceu ou cresceu pobremente<sup>28, 37, 58, 71, 115, 134, 149</sup>, conforme pode ser visualizado nas Figuras 8A e 8B, respectivamente.

Todas as cepas foram submetidas à temperatura de 45°C. Das 200 cepas testadas, apresentaram bom crescimento a esta temperatura 86,5% (173 amostras), crescimento pobre 5% (10 amostras) e ausência de crescimento 8,5% (17 amostras) das cepas testadas. Estes dados podem ser observados na Tabela 7.

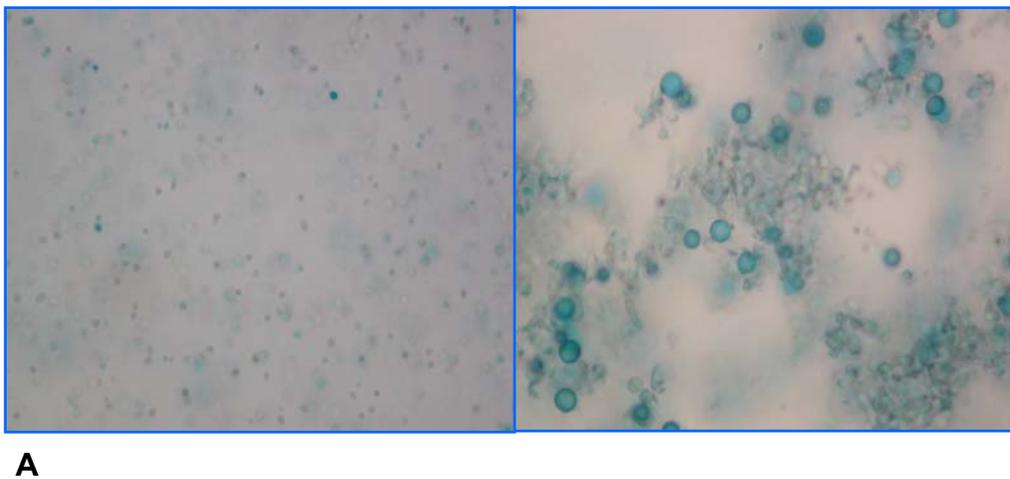
Tabela 7 - Número e porcentagem de amostras positivas para crescimento a 45°C, com crescimento pobre e sem crescimento

<i>Crescimento</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>Identificação sugestiva</i>
Presente	173	86,5	<i>C. albicans</i>
Pobre	10	5	<i>C. dubliniensis</i>
Ausente	17	8,5	<i>C. dubliniensis</i>



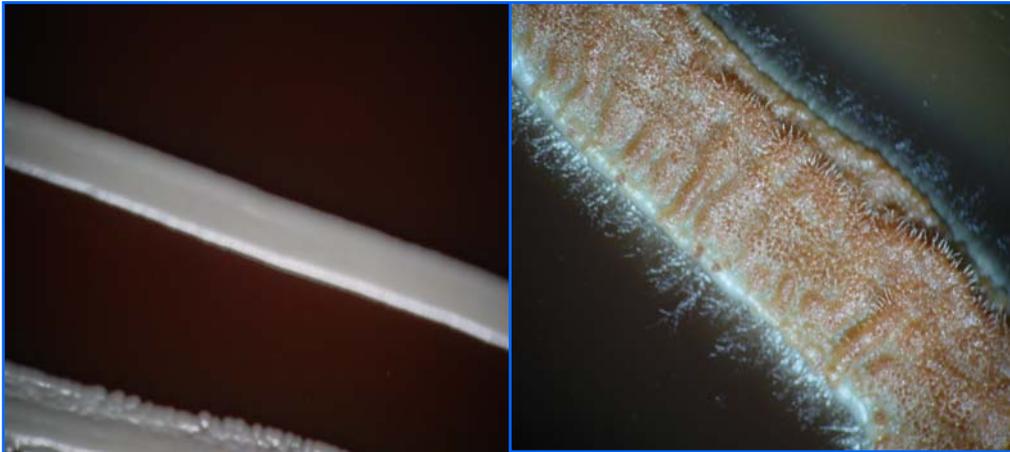
**A** **B**

FIGURA 1 – Aspecto microscópico da formação de clamidoconídeos em ágar fubá Tween 80. Observa-se cepa sugestiva de *C. albicans* em A, com clamidoconídeos duplos ou isolados e cepa padrão de *C. dubliniensis* em B, com numerosos clamidoconídeos em cachos. Aumento de 100 X.



**A** **B**

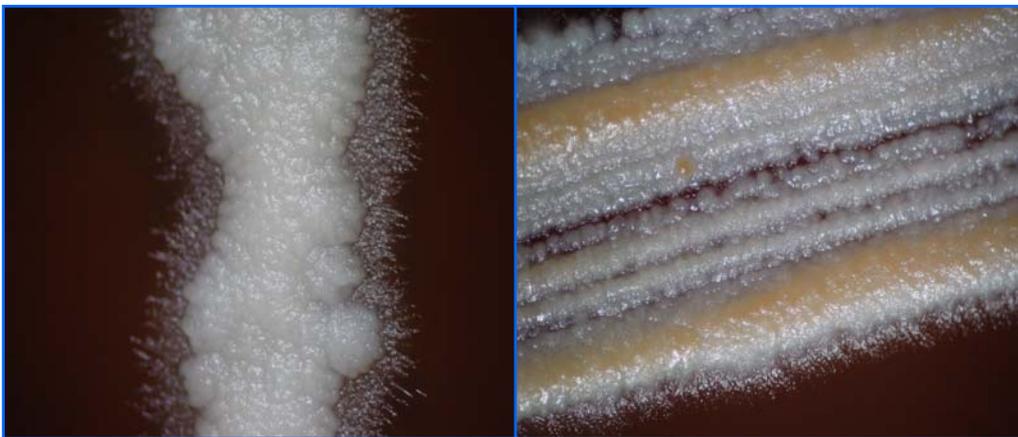
FIGURA 2 – Aspecto microscópico da formação de clamidoconídeos em ágar caseína. Observa-se cepa sugestiva de *C. albicans* em A, com ausência de clamidoconídeos e cepa padrão de *C. dubliniensis* em B, com numerosos clamidoconídeos em cachos. Aumento de 100 X e 400 X respectivamente.



**A**

**B**

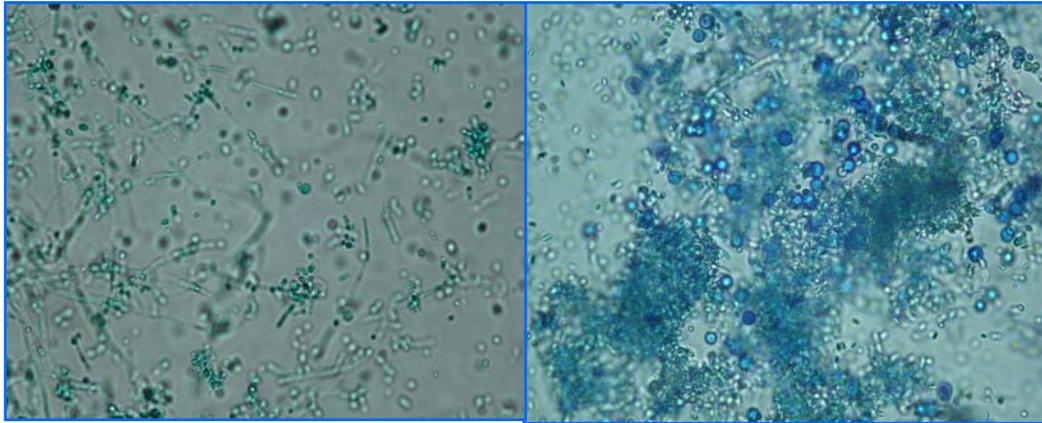
FIGURA 3 – Aspecto macroscópico de crescimento de cepa sugestiva de *C. albicans* (A) e de cepa padrão de *C. dubliniensis* (B) em ágar tabaco. Observa-se cor branca e bordos lisos para *C. albicans* (A) e cor alaranjada com numerosas franjas, aspecto rugoso e irregular para *C. dubliniensis* (B). Aumento em lupa com aumento original de 10 X.



**A**

**B**

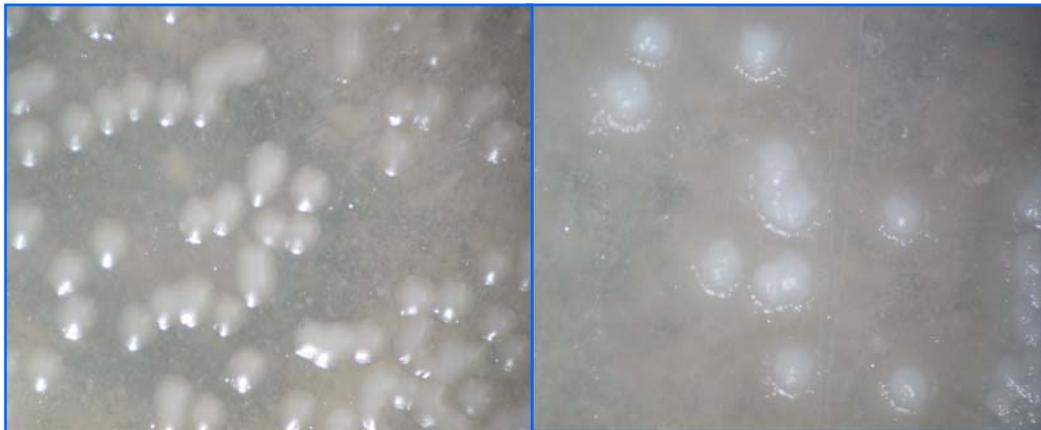
FIGURA 4 – Aspecto macroscópico de crescimento atípico de cepa sugestiva de *C. albicans* (A) e de cepa sugestiva de *C. dubliniensis* (B) em ágar tabaco. Observa-se cor branca e bordos irregulares com franjas para cepa sugestiva de *C. albicans* (A) e cor branca e alaranjada com franjas, aspecto rugoso e irregular para cepa sugestiva de *C. dubliniensis* (B). Visualização em lupa com aumento original de 40 X.



**A**

**B**

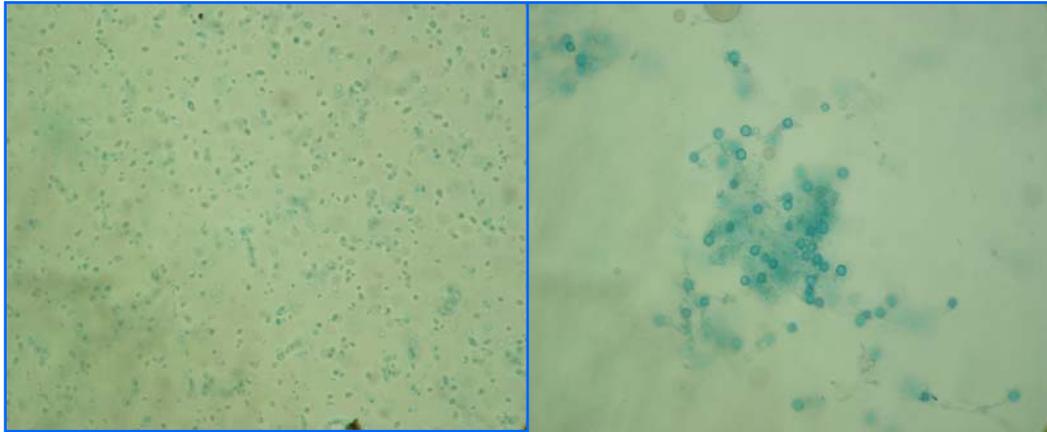
FIGURA 5 – Aspecto microscópico da formação de clamidoconídeos em ágar tabaco. Observa-se cepa sugestiva de *C. albicans* em A, com ausência de clamidoconídeos e cepa padrão de *C. dubliniensis* em B, com numerosos clamidoconídeos em cachos. Aumento de 100 X.



**A**

**B**

FIGURA 6 – Aspecto macroscópico de crescimento de cepa sugestiva de *C. albicans* (A) e de cepa padrão de *C. dubliniensis* (B) em ágar girassol. Observa-se cor branca e bordos lisos para *C. albicans* (A) e cor branca com numerosas franjas, aspecto irregular para *C. dubliniensis*. Visualização em lupa com aumento original de 10 X.



**A**

**B**

FIGURA 7 – Aspecto microscópico da formação de clamidoconídeos em ágar girassol. Observa-se cepa sugestiva de *C. albicans* em A, com ausência de clamidoconídeos e cepa padrão de *C. dubliniensis* em B, com numerosos clamidoconídeos em cachos. Aumento de 40 X.



**A**

**B**

FIGURA 8 – Aspecto do crescimento das colônias quando as cepas foram submetidas a temperatura de 45°C. Observa-se cepa sugestiva de *C. albicans* em A, com bom crescimento e cepa padrão de *C. dubliniensis* em B, com crescimento considerado pobre.

## 5.2 Identificação genotípica

A reação em cadeia da polimerase contém um par de *primers* universal que resultou em um fragmento de aproximadamente 614 pb e serviu como controle positivo para todas as espécies fúngicas, isto é, todas as amostras fúngicas resultaram em um produto de aproximadamente 614 pb, inclusive o DNA genômico de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, sendo esta banda visualizada em ambas as espécies<sup>32, 79</sup>.

O par de *primers* específico para *C. dubliniensis* resultou em fragmentos de 288 pb, observando-se duas bandas apenas nas cepas que pertenciam a esta espécie, conforme pode ser visualizado nas figuras 9A e 9B, marcados pelas setas brancas, pertencentes a cepa padrão de *C. dubliniensis*<sup>32, 79</sup>. Todas as amostras testadas (100%) foram identificadas como *C. albicans* pelo PCR.

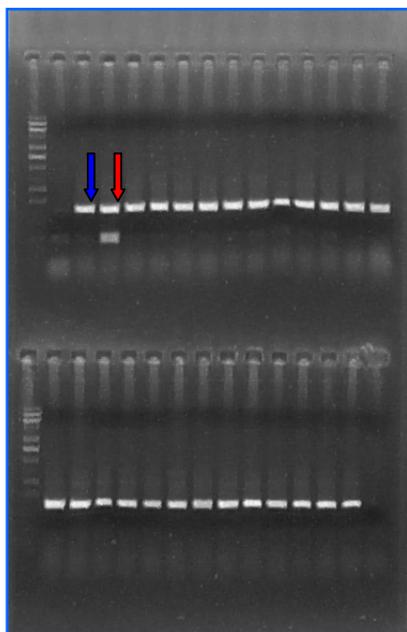


FIGURA 9 – Fotografia dos produtos obtidos após eletroforese em gel de agarose visualizados por luz ultravioleta. Seta azul evidencia cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 18804) e seta vermelha cepa padrão de *C. dubliniensis* (NCPF 3108).

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo acordo de identificação entre os métodos fenotípicos e genotípico, sendo a identificação genotípica considerada o padrão ouro de eficiência. Como os resultados do teste genotípico comprovaram que todas as cepas eram *C. albicans*, foi considerado positivo o número de cepas identificadas como *C. albicans* pelos métodos fenotípicos analisados, conforme pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8 – Acordo de identificação entre os testes fenotípicos e o teste genotípico (padrão ouro de eficiência)

Teste Fenotípico	<i>C. albicans</i>		<i>C. dubliniensis</i>		% de acordo de Identificação
	Fenotípico	PCR	Fenotípico	PCR	
Ágar Fubá	152	200	48	0	76
Ágar Caseína	170	200	30	0	85
Ágar Tabaco	184	200	16	0	92
Agar Girassol	185	200	15	0	92,5
Temperatura 45°C	173	200	27	0	86,5

### 5.3 Análise de custos

Os custos dos métodos fenotípicos e genotípico foram analisados e os resultados podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9 – Custo aproximado do material de consumo utilizado para a identificação de *C. dubliniensis*.

<i>Protocolo de identificação</i>	<i>Custo por 200 cepas testadas</i>	<i>Custo por cepa testada</i>
Ágar Fubá	R\$ 48,00	R\$ 0,24
Ágar Caseína	R\$ 40,00	R\$ 0,20
Ágar Tabaco	R\$ 188,00	R\$ 0,95
Ágar Girassol	R\$ 92,00	R\$ 0,46
45°C	R\$ 45,00	R\$ 0,22
PCR	R\$ 2.232,00	R\$11,00

A identificação por PCR necessitou de equipamentos para biologia molecular, como termociclador, transiluminador, centrífuga refrigerada, equipamento de fotodocumentação e pipetas automáticas de alta precisão, com custo de R\$ 73.544,97 em 2006.

## 6. DISCUSSÃO

Os laboratórios de diagnóstico em microbiologia utilizam técnicas fenotípicas para caracterizar o perfil morfológico e bioquímico das leveduras, e os métodos disponíveis atualmente para identificação de espécies do gênero *Candida* são numerosos, sendo a escolha de um deles determinada pelo nível de identificação requerida e recursos disponíveis nos laboratórios<sup>81</sup>.

Um dos métodos que vem sendo largamente utilizado nos últimos anos é a verificação do comportamento da levedura sob determinadas condições, e em determinados meios de cultura<sup>11, 12, 31, 38, 46, 54, 67, 68, 69, 74, 78, 79, 96, 133, 168</sup>.

A discriminação rotineira entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* tem sido problemática em laboratórios microbiológicos de diagnóstico e nos últimos dez anos tem havido uma proliferação de testes fenotípicos descritos na literatura para diferenciação entre estas duas espécies<sup>6, 10, 25, 79, 144</sup>.

*C. dubliniensis*, inicialmente isolada em Dublin na Irlanda em pacientes com AIDS ou portadores do HIV que apresentavam candidose bucal recorrente<sup>155</sup>, tem sido isolada nos últimos anos de vários sítios anatômicos, e encontrada nos mais diversos tipos de pacientes, como em imunossuprimidos e imunocompetentes, em pacientes com candidose bucal e nos que não apresentavam qualquer evidência clínica da doença<sup>2, 20, 28, 58, 70, 90, 156</sup>, o que tem motivado vários autores a pesquisarem a presença deste microrganismo em diversas populações<sup>9, 30, 142, 158</sup>.

Embora *C. dubliniensis* apresente similaridades fenotípicas com *C. albicans*, este parece ser um constituinte mais raro da microbiota bucal normal<sup>114</sup>.

Os 200 isolados examinados em nosso estudo foram inicialmente classificados como *C. albicans* e eram provenientes de pacientes transplantados cardíacos sob terapia com imunossupressores, pacientes com tuberculose e submetidos à antibioticoterapia prolongada, pacientes HIV positivos e indivíduos saudáveis. Nenhum deles no momento da coleta apresentava evidência clínica de candidose bucal ou havia feito uso de antifúngicos durante pelo menos os seis últimos meses anteriores à coleta. Embora 3/4 da população estudada pertencesse ao grupo com maior probabilidade em apresentar *C. dubliniensis*, a análise genética feita por PCR verificou que nenhum dos isolados pertencia a esta espécie, e todas as amostras foram identificadas com *C. albicans*.

A prevalência de *C. dubliniensis* é muito discutida em toda a literatura em diversas partes do mundo, e apresenta resultados muito variáveis.

Mariano et al.<sup>82</sup> investigando a presença de *C. dubliniensis* entre os 548 isolados previamente identificados como *C. albicans* em coleção brasileira de leveduras do ano 1994 até 2000, encontraram 11 cepas de *C. dubliniensis* (2%) identificadas por genotipagem utilizando a técnica de RAPD. Das 11 amostras obtidas, 9 eram provenientes de pacientes portadores do HIV e 2 de pacientes saudáveis; todas as 11 amostras foram coletadas da região orofaríngea. Esses achados concordam com Coleman et al.<sup>28</sup> que relataram ser este um organismo comensal da cavidade bucal humana, o que portanto explicava a presença da levedura nos 2 indivíduos saudáveis. Sullivan et al.<sup>152</sup> acredita ser a orofaringe o habitat natural de *C. dubliniensis*.

Milan et al.<sup>94</sup> encontraram 3 (2,8%) amostras de *C. dubliniensis* entre as 108 investigadas provenientes de pacientes brasileiros, aids ou portadores do HIV, com candidose orofaríngea.

Chavasco et al.<sup>25</sup> identificaram a presença de *C. dubliniensis* dentre 37 amostras isoladas de candidose oral eritematosa provenientes de

pacientes HIV positivos e HIV negativos identificadas anteriormente como *C. albicans* e encontraram 2 (5,4%) isolados de *C. dubliniensis*.

Na América do Sul, a prevalência dos isolados de *C. dubliniensis* parece ser mais baixa do que a encontrada em outros países da Europa e EUA<sup>13, 30, 44, 82, 94</sup>, embora na Argentina, Binolfi et al.<sup>15</sup> tenham encontrado 12,96% de *C. dubliniensis* entre os isolados da região orofaríngea de pacientes HIV positivos. Os autores consideraram seus resultados similares aos encontrados na Irlanda (18- 32%), mas não aos do Brasil (2,8%). Na Venezuela a prevalência de *C. dubliniensis* encontrada foi de 2,5%<sup>44</sup>.

Na Itália, Faggi et al.<sup>39</sup> encontraram 1,5% de *C. dubliniensis* na cavidade bucal de 132 pacientes HIV positivos e nenhum isolado desta espécie na cavidade bucal de 89 pacientes HIV negativos.

O uso da terapia antiretroviral parece diminuir o isolamento de *C. dubliniensis* na cavidade bucal de portadores do HIV<sup>103</sup>.

Costa et al.<sup>30</sup> investigaram a colonização por leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes soropositivos, 78% dos quais em uso de terapia retroviral. Dos 99 pacientes investigados, *C. albicans* foi a espécie mais prevalente (50%) e nenhum isolado de *C. dubliniensis* foi encontrado. Melo et al.<sup>92</sup>, também não encontraram *C. dubliniensis* na cavidade bucal de 114 pacientes soropositivos brasileiros em uso de terapia retroviral, e *C. albicans* também foi a espécie mais prevalente (57,8%).

No hospital maternidade do Kuwait, de 1644 isolados de *Candida* positivos para tubo germinativo, somente 3 foram identificados como *C. dubliniensis*, com uma prevalência de 0,2%, porém nenhum dos pacientes era portador do HIV e nenhuma amostra foi coletada da cavidade bucal<sup>9</sup>. Em estudos que verificaram esta prevalência em outros sítios anatômicos, verificaram-se dados como 0,17% de *C. dubliniensis* em região vaginal de mulheres imunocompetentes na Turquia<sup>1</sup> e 2%, entre 974 isolados positivos para tubo germinativo, provenientes de diferentes sítios

anatômicos como sangue, bile, catarro, urina e secreções bucais em pacientes com câncer<sup>142</sup>. Em 1998, Oliveira et al.<sup>105</sup> não encontraram *C. dubliniensis* em 44 amostras coletadas de lesões pseudomembranosas esbranquiçadas em mucosa bucal de pacientes com câncer.

Tekeli et al.<sup>158</sup> investigando a prevalência de *C. dubliniensis* na cavidade bucal de 230 pacientes portadores de diabetes tipo 1, não encontraram nenhuma cepa desta espécie e *C. albicans* foi a espécie mais freqüentemente encontrada (58%). Em outro estudo realizado por Tekeli et al.<sup>157</sup> sobre a presença de *C. dubliniensis* entre os 67 isolados positivos para o gênero *Candida* provenientes de hemocultura de pacientes HIV negativos na Turquia, entre 2001 e 2004, encontraram 55,2% de *C. albicans* e 1,4% de *C. dubliniensis*. Os mesmos autores<sup>159</sup> investigando a presença *C. dubliniensis* em amostras provenientes de orofaringe em pacientes HIV positivos, encontraram prevalência de 11,4%.

Na Índia, a prevalência de *C. dubliniensis* encontrada na cavidade bucal de 150 pacientes com AIDS, correspondeu a 0,7%<sup>50</sup>.

Em um estudo retrospectivo feito na Arábia Saudita envolvendo leveduras causadoras de fungemia, entre os anos de 1991 a 2000, a prevalência encontrada em pacientes imunossuprimidos por outros motivos que não o HIV, foi de 5 casos em 189 pacientes, dos quais foram isoladas 366 cepas de leveduras, o que correspondeu a 1,44%<sup>3</sup>.

Pfaller et al.<sup>110</sup> determinando a variação de espécies do gênero *Candida* em 6.082 isolados, coletados de infecções sangüíneas provenientes de 250 centros médicos em 32 nações, incluindo a América Latina, num período de 10 anos, encontrou 3.401 *C. albicans*, 984 *C. glabrata*, 796 *C. parapsilosis*, 585 *C. tropicalis*, 153 *C. krusei*, 67 *C. lusitaniae*, 48 *C. guilliermondii*, 10 *C. famata*, 10 *C. kefyr*, 6 *C. pelliculosa*, 5 *C. rugosa*, 4 *C. lipolytica*, 3 *C. dubliniensis*, 3 *C. inconspicua*, 2 *C. sake*, e um isolado das seguintes espécies: *C. lambica*, *C. norvegensis* e *C. zeylanoides*. A espécie mais prevalente em todas as regiões, que

incluiram além da América Latina os países da Ásia, Europa e Estados Unidos foi *C. albicans*. *C. dubliniensis* foi considerada sob a forma de “outras”, por ter sido encontrada em baixo número.

A prevalência de *C. dubliniensis* descrita na literatura apresenta grande variação, desde índices nulos<sup>30, 92, 105, 143, 158</sup>, baixos (0,2% até 5,0%)<sup>3, 9, 39, 74, 82, 94, 103, 157</sup>, médios (5% até 18%)<sup>15, 25, 41, 42, 60, 128, 159</sup> e altos<sup>59, 89, 120</sup>, chegando até a 32% em pacientes com AIDS e candidose bucal na população irlandesa<sup>153</sup>. Segundo Sullivan et al.<sup>152</sup>, seu habitat natural é a orofaringe, região onde esta espécie foi mais frequentemente encontrada, sugerindo que talvez esse possa ser um microrganismo transitório da cavidade bucal, o que concorda com os achados de Alves et al.<sup>14</sup> onde *C. dubliniensis* foi isolada de uma paciente com AIDS, sem lesões orais, e que recebia atendimento no Hospital Universitário de Santa Maria. A coleta positiva para *C. dubliniensis* foi feita na consulta de janeiro de 1999, porém o acompanhamento da paciente com repetidas coletas não permitiram novo isolamento, assim como não se verificou o desenvolvimento de candidose bucal.

Estudos sobre a incidência de *C. dubliniensis* são necessários para um melhor entendimento sobre sua epidemiologia, especialmente na América do Sul, onde sua frequência ainda não é bem conhecida<sup>25</sup>.

Os testes fenotípicos fornecem identificação sugestiva da espécie a ser testada, baseados em seu comportamento sob determinadas condições.

Todos os testes fenotípicos realizados em nosso estudo apresentaram identificação sugestiva de *C. dubliniensis* entre as amostras estudadas, porém pela reação em cadeia polimerase (PCR), as amostras foram identificadas como *C. albicans*.

A prova do tubo germinativo é utilizada rotineiramente em laboratórios microbiológicos para identificação de *C. albicans*, porém *C. dubliniensis* também produz tubo germinativo. Antes do reconhecimento de *C. dubliniensis* como uma nova espécie, este teste era considerado um

dos marcadores fenotípicos para *C. albicans*<sup>22, 74, 140, 149, 155, 156, 162</sup>. Campanha et al.<sup>22</sup> afirmaram que aproximadamente 95 a 97% de *C. albicans* tenha capacidade de produzir tubo germinativo quando incubada em soro à 37°C por um período entre 2- 4 horas.

Alguns autores relataram que, sob as mesmas condições, além de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, algumas cepas de *C. stellatoidea* e *C. tropicalis* também são capazes de produzir tubo germinativo<sup>22, 90, 162</sup>.

Lees & Barton<sup>74</sup> relatam que embora *C. dubliniensis* possa produzir tubo germinativo, o faz com resultado fraco, o que não foi verificado em nosso estudo, onde não houve diferença entre a produção de tubo germinativo entre as 200 amostras testadas e as amostras padrão para *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

Sullivan et al.<sup>155</sup> quando descreveram pela primeira vez esta nova espécie, consideraram que ao ser semeado em ágar fubá, ela produzia abundantes clamidoconídeos em pares ou trios, em posição terminal de pequenas pseudohifas. Muitos outros autores descreveram os mesmos resultados<sup>8, 22, 68, 134, 149, 162</sup>.

Schoofs et al.<sup>139</sup> não encontraram esta formação característica de clamidoconídeos em pares ou trios em isolados de *C. dubliniensis*, mas sim clamidoconídeos isolados. Binolfi et al.<sup>15</sup> estudando o comportamento de *C. dubliniensis* e *C. albicans* quando semeadas em corn meal ágar com Tween 80 (Sigma, USA) encontraram que 71,43% de *C. dubliniensis* produziram abundantes clamidoconídeos em pares e trios neste meio e que 39,28% de *C. albicans* também se comportaram do mesmo modo.

Na prova de formação e arranjo estrutural de clamidoconídeo, quando as amostras foram semeadas em ágar fubá Tween 80, quase um quarto das amostras testadas (24%) foram sugestivas para *C. dubliniensis*. Uma vez que não havia *C. dubliniensis* em nossas amostras, 24% de *C. albicans* apresentaram abundantes clamidoconídeos em pares e trios, assim como a amostra padrão de *C. dubliniensis*, o que consideramos um valor muito alto, concordamos com os autores que

consideram que uma eventual disposição de clamidoconídeos não fornece uma diferenciação significativa entre as espécies<sup>37, 161</sup>.

Vários autores<sup>56, 57, 71, 96, 161</sup> encontraram em seus resultados, amostras de *C. albicans* que apresentaram comportamento similar ao de *C. dubliniensis* quando semeadas em ágar fubá adicionado de Tween 80, concordando com nossos resultados. Schoofs et al.<sup>139</sup> ao contrário, encontraram cepas de *C. dubliniensis* que não produziram abundantes ou triplos clamidoconídeos neste meio, e estas espécies foram confirmadas pelo teste genético do DNA *fingerprinting* (impressões digitais de DNA).

Pinjon et al.<sup>115</sup> descreveram o teste de crescimento a temperatura de 42°C e 45°C como um método reprodutível, simples e barato de diferenciação entre as espécies em questão, e considerou a temperatura de 45°C mais eficiente. Kirkpatrick et al.<sup>71</sup>, considerou o método ineficiente, pois encontrou 10 entre 28 *C. albicans* que também foram incapazes de crescer a esta temperatura.

O teste de crescimento a temperatura de 45°C durante 48 horas, embora considerado de baixa especificidade por alguns autores<sup>22, 51, 68</sup>, é considerado de fácil realização e freqüentemente utilizado em associação com outros testes fenotípicos<sup>2, 6, 43, 46, 58, 65, 134</sup>.

Mähnß et al.<sup>79</sup> testando 8 amostras de *C. dubliniensis* sendo duas delas cepas de referência (CBS 7987 e CBS 8501), encontraram que a 42°C, somente uma amostra foi incapaz de crescer e duas cresceram pobremente; as outras cinco, incluindo as duas cepas referências de *C. dubliniensis*, cresceram bem a 42°C. Quando submetidas a 45°C, sete amostras, incluindo as duas cepas referências, não apresentaram crescimento, porém uma das amostras apresentou bom crescimento. Em relação a *C. albicans* os autores encontraram que uma entre 94 amostras não cresceu a 42°C e cinco foram incapazes de crescer em 45°C.

Schoofs et al.<sup>139</sup>, também encontraram em seus estudos, algumas cepas de *C. dubliniensis* que cresceram bem na temperatura de 42°C, incluindo a cepa padrão para *C. dubliniensis* utilizada (NCPF CD36).

Mosca et al.<sup>101</sup> não encontraram nenhuma amostra entre seus isolados que se comportasse de maneira atípica. Das 109 *C. dubliniensis* testadas a temperatura de 45°C, nenhuma apresentou crescimento, e das 120 *C. albicans* testadas, todas cresceram bem.

Alguns autores sugerem que embora *C. dubliniensis* seja mais sensível à temperatura de 45°C, existem cepas de *C. albicans* que também são incapazes de crescer a esta temperatura<sup>15, 22, 39, 41, 43, 46, 94, 96, 161</sup>. Nossos resultados concordam com os autores anteriores, uma vez que encontramos 8,5% de *C. albicans* que não foram capazes de crescer a temperatura de 45°C e 5% que apresentaram pobre crescimento quando submetidas a esta temperatura. Não descartamos sua utilidade como método de triagem para um grande número de amostras por ser facilmente reprodutível, uma vez que embora *C. albicans* possa ser erroneamente classificada como *C. dubliniensis*, o contrário raramente acontece. Em nosso estudo, a cepa referência de *C. dubliniensis* não apresentou crescimento quando submetida a esta temperatura.

Uma das principais descrições fenotípicas de *C. dubliniensis*, é sua habilidade em produzir abundantes clamidoconídeos quando semeadas nos mais diversos meios de cultura, principalmente os que utilizaram extratos de planta e proteína do leite em sua constituição.

A procura de um meio de cultura que fosse um marcador fenotípico ideal de diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*, fez com que recentemente houvesse uma proliferação de publicações sobre os extratos de plantas e sementes utilizados, como o ágar niger (*Guizotia abyssinica*), ágar nabo (*Brassica napus*), ágar milheto (*Panicum miliaceum*), ágar alpiste (*Phalaris canariensis*), ágar linhaça (*Linum usitatissimum*), ágar girassol (*Helianthus annuus*), ágar suco de tomate, ágar tabaco, e o ágar caseína (proteína derivada do leite)<sup>6, 11, 68, 74, 78, 101</sup>.

O ágar niger ou verbesina da Índia e o ágar girassol, embora sejam derivados de plantas da mesma família (oleaginosas não leguminosas) derivam de espécies diferentes, sendo que tanto o ágar niger ou ágar

Staib e o ágar girassol ou ágar Pal's foram originalmente desenvolvidos para identificação precoce de *Cryptococcus neoformans* em população de pacientes com AIDS, a primeira população onde *C. dubliniensis* foi inicialmente identificada<sup>6, 68, 145</sup>. Al Mosaid, et al.<sup>6</sup> estudaram o efeito em trocar as sementes de *Guizotia abyssinica* do ágar niger por *Helianthus annuus* do ágar girassol e utilizá-lo para diferenciação em culturas mistas, entre *Cryptococcus neoformans*, *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Em seus resultados os pesquisadores encontraram que em 72 horas de incubação a 30°C, todas as 128 cepas de *C. dubliniensis* testadas produziram franja hifal ao redor do crescimento das colônias; nenhuma das 124 cepas de *C. albicans* produziram franja hifal e 93,75% das cepas de *C. dubliniensis* produziram clamidoconídeo. Após 10 dias de incubação a 30°C, 29% de *C. albicans* produziram franja hifal; nenhuma cepa de *C. albicans* produziu clamidoconídeo e 6,25% das cepas de *C. dubliniensis* continuaram negativas para produção de clamidoconídeo. Os autores consideraram em seu artigo, que este foi um método de diferenciação entre as espécies 100% eficaz, e que a discriminação baseada no aspecto morfológico das colônias (com ou sem franja hifal), é mais precisa do que a produção de clamidoconídeos. Quando estas mesmas amostras foram incubadas a temperatura de 37°C, os autores não encontraram bons resultados.

Khan et al.<sup>67</sup> sugeriram a utilização do ágar girassol simplificado, preparado da mesma forma que o original, sem a utilização de creatinina e de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , apenas utilizando sementes de girassol, glicose e ágar simples. Ao comparar os dois meios de cultura (ágar girassol original e o ágar girassol simplificado) encontraram os mesmos resultados. A exclusão destes componentes não afetou a habilidade da *C. dubliniensis* em produzir abundantes clamidoconídeos. Os autores consideraram ser este o meio ideal para produção em larga escala para estudos epidemiológicos, principalmente em pacientes portadores do HIV, onde *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *Cryptococcus neoformans* podem ocorrer concomitantemente. Khan et al.<sup>69</sup> prepararam o ágar girassol com extrato

da casca da semente de girassol ao invés de utilizar toda a semente, sem comprometer a eficácia do meio na diferenciação das duas espécies.

Sahand et al.<sup>130</sup> combiram ágar girassol com CHROMágar Candida para melhorar a eficácia obtida por cada meio individualmente, e concluíram que a diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* pode ser melhorada. Neste meio, 100% de *C. albicans* se apresentaram verde claro, 96% de *C. dubliniensis* se apresentaram verde azulado e os outros 4% de *C. dubliniensis* se apresentaram verde azulado claro. Nenhuma *C. albicans* foi capaz de produzir clamidoconídeo neste meio, enquanto 92% de *C. dubliniensis* produziram. Os autores consideraram este meio com 100% de especificidade, pois os 8% remanescentes de *C. dubliniensis* puderam ser facilmente identificados pelo aspecto irregular e de cor verde azulado de suas colônias.

Em nossas 200 amostras semeadas em ágar girassol, 89% não produziram e 2,5% apresentaram raros clamidoconídeos; 8,5% das amostras apresentaram abundantes clamidoconídeos; franja hifal periférica esteve presente em 7,5% das amostras. Consideramos as duas características: franja e clamidoconídeos em cachos ou numerosos para a cepa ser sugestiva de *C. dubliniensis*, o que ocorreu em 15 cepas.

O ágar girassol apresentou alguma dificuldade em relação ao tempo de duração do pó da semente de girassol, o qual consideramos curto por ter uma validade de no máximo de 5 dias e apresenta como desvantagem a duração do teste, 10 dias, sendo que ao final deste período, muitas placas se apresentavam contaminadas. Após este período, nossos resultados não variaram dos obtidos nas primeiras 72 horas da semeadura das amostras. Os resultados são de fácil leitura visual e em microscopia de luz. Este meio foi o mais eficaz na diferenciação das nossas amostras, pois apresentou o menor número de amostras sugestivas para *C. dubliniensis*, já que o nosso padrão ouro de verificação de identificação comprovou que não havia *C. dubliniensis*

entre as amostras testadas. O grau de eficiência de identificação deste meio foi de 92,5%.

A avaliação das características morfológicas das colônias foi mais eficaz do que a avaliação microscópica, o que concorda com os achados descritos na literatura<sup>6, 67, 130</sup>.

O ágar tabaco foi originalmente descrito na Índia, onde uma grande parcela da população é habituada a mascar tabaco. Foi inicialmente desenvolvido para diferenciação entre *Cryptococcus neoformans* e outros tipos de leveduras, como *C. albicans*. A fórmula original era feita com 50 g de tabaco em rolo (fumo de corda) e este meio foi considerado por seu autor como sendo muito econômico<sup>160</sup>. Khan et al.<sup>68</sup> resolveram testar o ágar tabaco para diferenciar *C. albicans* e *C. dubliniensis*, porém ao invés de utilizar tabaco em rolo, utilizou cigarros “Marlboro light”, e outras duas marcas comerciais de cigarros provenientes da Índia, para comparação. Não encontraram diferença entre as marcas comerciais dos cigarros utilizados. Os autores concluíram que este é um meio 100% eficaz, pois todos os 30 isolados de *C. dubliniensis* testados produziram colônias irregulares com franja hifal periférica, e abundantes clamidoconídeos após incubação por 48- 72 horas à 28°C. Todos os 50 isolados de *C. albicans* produziram colônias brancas e lisas, sem franja hifal periférica e clamidoconídeos, mesmo após 10 dias de incubação a 28°C. Nenhuma alteração fenotípica foi observada quando as amostras foram incubadas a 30°C, porém os autores não obtiveram bons resultados quando as amostras foram incubadas a 37°C.

Nossos resultados consideraram o ágar tabaco satisfatório, com resultados bem próximos aos obtidos pelo ágar girassol, que em nosso estudo foi o que apresentou o menor número de identificações incorretas, porém não foi possível considerar nenhum dos métodos fenotípicos analisados como “100% eficaz”. O ágar tabaco considerou 8% das cepas sugestivas para *C. dubliniensis*, embora morfológicamente 12% das cepas tenham apresentado franja hifal periférica, consideramos positivas

somente as amostras com clamidoconídeos em cachos ou numerosos e franja hifal ao redor das colônias. Em nossos resultados, a franja hifal periférica esteve presente neste meio em maior número (12%) do que a capacidade de formação de clamidoconídeos (8%), o que não é muito comum em meios suplementados com extratos de plantas em sua constituição, onde os aspectos morfológicos costumam ser mais eficazes<sup>6, 67, 68, 130</sup>.

O grau de eficiência de identificação do ágar tabaco em nossos resultados foi de 92%.

Mosca et al.<sup>101</sup> utilizaram uma proteína do leite, a caseína, para suplementar o meio de cultura para diferenciar *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Neste estudo os autores encontraram que todas as 109 *C. dubliniensis* testadas produziram abundantes clamidoconídeos arranjados em grupos, ao redor de crescimento pseudomicelial quando semeadas em ágar caseína e 111 de 120 (92,5%) *C. albicans* testadas, não produziram.

Alves et al.<sup>12</sup> compararam o ágar suco de tomate com ágar niger, ágar caseína e ágar girassol, e encontraram que 100% das *C. dubliniensis* testadas apresentaram clamidoconídeos em todos os meios analisados. O ágar caseína foi o que apresentou o maior número de *C. albicans* capazes de produzir clamidoconídeo, 8,61%; o ágar suco de tomate, 7,53%; o ágar niger e ágar girassol, 3,3%.

Em nossas amostras o ágar caseína apresentou 15% de isolados sugestivos de *C. dubliniensis*, sendo portanto seu grau de eficiência de identificação de 85%. O meio é de fácil realização e o que apresentou leitura mais fácil em microscopia de luz. Os aspectos morfológicos das colônias não são utilizados como parâmetro para diferenciação entre as espécies, uma vez que ambas crescem de forma semelhante neste meio, não havendo produção de franja hifal periférica.

Os resultados de nossos testes fenotípicos demonstraram que a formação e arranjo estrutural de clamidoconídeos em ágar fubá foi o

método mais inespecífico, com falsas identificações de *C. dubliniensis* em 24% dos casos. O ágar caseína veio em seguida, com 15% das amostras, ficando atrás inclusive do diferencial de temperatura que apresentou 13,5% de amostras sugestivas para *C. dubliniensis*. O ágar tabaco apresentou apenas 8% de falsas identificações, seguido bem de perto do método fenotípico que apresentou melhores resultados, o ágar girassol, 7,5%. Nossos achados concordam com Loreto et al<sup>78</sup>, que consideraram o ágar girassol como o método fenotípico mais eficiente para diferenciação entre as espécies.

Das 200 amostras estudadas, apenas 4 (2%) foram sugestivas para *Candida dubliniensis* em todos os testes fenotípicos realizados, sendo duas amostras pertencentes ao grupo de pacientes tuberculosos e duas amostras provenientes de pacientes portadores do HIV, o que concorda com a literatura a qual associa infecção por *C. dubliniensis* em pacientes imunossuprimidos por diversos motivos<sup>2, 20, 58, 70, 90, 145, 156</sup> e o que nos levou a acreditar num primeiro momento, se tratar de amostras de *C. dubliniensis*. Não sabemos explicar porque estas amostras de *C. albicans* se comportaram como *C. dubliniensis* sob todas as condições estudadas.

Em todos os métodos anteriores analisados, incluindo nosso estudo, verificamos comportamentos atípicos em cepas de *C. albicans*, em maior número, e em cepas de *C. dubliniensis*<sup>6, 11, 12, 22, 46, 68, 74, 78, 101, 139</sup>, concordando com os autores que referem a necessidade de métodos moleculares para diferenciação precisa entre estas espécies.

Sancak et al.<sup>133</sup> sugeriram que a temperatura de incubação de *C. dubliniensis* poderia ser o fator de indução da produção de abundantes clamidoconídeos por esta espécie, independente dos componentes dos meios de cultura, pois uma condição comum requerida para formação de clamidoconídeos nos diversos meios utilizados, é a incubação entre 26 a 30°C. Para esta proposta os autores testaram 100 cepas de *C. albicans* e 24 de *C. dubliniensis* à temperatura de 37°C e 26°C, semeadas em ágar

azul de metileno eosina, ágar nutriente, caldo nutriente e ágar vermelho de fenol, encontrando os seguintes resultados: a 37°C nenhum dos isolados produziram clamidoconídeos em todos os meios testados; a 26°C todas as *C. dubliniensis* produziram abundantes clamidoconídeos em todos os meios testados; 2 *C. albicans* produziram poucos clamidoconídeos em ágar vermelho de fenol; todas as *C. dubliniensis* testadas sobre o ágar azul de metileno eosina e ágar vermelho de fenol produziram colônias irregulares com franja hifal periférica e nenhuma *C. albicans* apresentou esta propriedade. Este estudo concluiu que a temperatura de 26°C parece ser um fator indutor da produção de abundantes clamidoconídeos por *C. dubliniensis*.

Loreto et al.<sup>78</sup> também notaram que a temperatura entre 25 e 28°C é um importante fator de formação de clamidoconídeo, e que variações nas concentrações dos componentes dos meios e na natureza do extrato utilizado, podem ou não alterar o resultado final. Estes achados concordam com Khan et al.<sup>69</sup>, que encontraram a mesma capacidade de diferenciação entre o ágar girassol feito com toda a semente e o feito apenas com a casca da semente de girassol, ambos utilizando a temperatura de incubação de 28°C.

Concordamos com estas observações, mas ressaltamos que embora a temperatura entre 24- 30°C, tenha tido ação sobre todas as amostras de *C. dubliniensis* analisadas nos diversos estudos<sup>67, 68, 69, 78, 133</sup> algumas cepas de *C. albicans* de nosso trabalho se comportaram como a amostra padrão de *C. dubliniensis* e produziram abundantes clamidoconídeos quando semeadas a temperatura de 24°C em ágar caseína, 28°C em ágar tabaco e 30°C em ágar girassol.

Os resultados obtidos em nossos estudos, concordam com Zavalza-Stiker et al.<sup>168</sup>, que objetivando uma produção mais rápida de clamidoconídeos por *C. albicans*, adicionou 5% de leite ao caldo de ágar fubá ao invés de Tween 80. Embora não tenham testado em *C. dubliniensis*, observaram uma produção abundante de clamidoconídeos

por *C. albicans*, em um período de tempo menor dos que os relatados na literatura, quando as amostras foram incubadas a 28°C. A temperatura de 37°C os autores não encontraram bons resultados. Neste caso em particular, a temperatura estimulou *C. albicans* de maneira semelhante a que tem sido relatado para *C. dubliniensis*<sup>78, 133</sup>.

A questão da temperatura é particularmente interessante, uma vez que a do corpo humano varia em torno de 36°C, e nos diversos meios de cultura testados, tanto *C. dubliniensis* como *C. albicans* não foram capazes de produzir clamidoconídeos quando incubadas a 37°C, levando-nos a supor que quando presentes em nosso organismo, estas espécies embora possam provocar doenças, não apresentem sua forma de resistência característica.

Schoofs et al.<sup>139</sup> consideraram em seus estudos que a caracterização fenotípica é controversa.

Devido a grande variabilidade das características fenotípicas, e da evidência da presença, principalmente de cepas de *C. albicans* atípicas, concordamos com os vários autores sobre a necessidade da utilização dos métodos moleculares para diferenciação entre estas duas espécies, uma vez que a identificação baseada em métodos tradicionais parece ser menos confiável<sup>22, 78, 165</sup>.

A maioria dos autores acredita que para exata diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* é preciso que a identificação genotípica seja realizada, pois nenhum dos métodos fenotípicos testados até o momento, realizados isoladamente, se mostrou totalmente eficaz, livre de resultados ambíguos<sup>22, 25, 43, 46, 49, 79, 82, 84, 101, 161, 165</sup> o que concorda com nossos achados laboratoriais.

O método mais eficiente para identificação de *C. dubliniensis* e sua diferenciação com *C. albicans*, requer testes baseados em PCR<sup>11, 25, 49, 64, 73, 79, 83, 101, 165</sup>, porém muitos outros métodos moleculares têm sido citados com a mesma finalidade<sup>76, 83, 86, 95, 127</sup>.

A extração do DNA fúngico para ser utilizado no PCR, pode ser realizada das mais diversas maneiras, com a utilização de “kits” de purificação de DNA<sup>64</sup>, ou pelos mais variados métodos tradicionais descritos na literatura, como fervura<sup>79</sup>, utilização de fenol-clorofórmio<sup>21, 26, 85, 117, 125, 127</sup>, digestão por zimoliase<sup>83</sup> e outras enzimas líticas<sup>76</sup>. Em nosso trabalho utilizamos o método da fervura por sua simplicidade de execução associada a resultados satisfatórios. Notamos a necessidade em se utilizar o material extraído em menor espaço de tempo possível, o que aconteceu em nossa pesquisa, já que o DNA obtido desta forma se degrada mais rapidamente. Quando houve necessidade e a técnica foi repetida, o DNA foi prontamente utilizado e não tivemos problemas durante a reação em cadeia da polimerase.

O DNA extraído foi mantido a temperatura de -20°C até sua utilização, como citado em outros trabalhos<sup>26, 64, 81, 125</sup>.

A reação em cadeia da polimerase foi feita segundo Mähniß et al.<sup>79</sup> com modificações, pois utilizamos o PCR Master MIX (Promega), que já inclui Taq DNA Polimerase, trifosfatos de desoxinucleosídeos (dNTPs) e cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), ao invés dos componentes em separado. O PCR Máster Mix se mostrou com uma boa relação custo benefício, otimizando o trabalho de laboratório para um grande volume de amostras. Os “primers” utilizados, tanto os universais para o gênero *Candida*, como os específicos para *C. dubliniensis*, e os tempos para cada etapa no termociclador também foram realizadas segundo Mähniß et al.<sup>79</sup>.

Os seis protocolos de identificação (ágar fubá adicionado de Tween 80, ágar caseína, ágar tabaco, ágar girassol, temperatura de 45°C e PCR) foram comparados. Não consideramos a verificação da formação de tubo germinativo por não se tratar de um teste de diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

Os resultados de comparação de custos foram baseados no preço comercial dos materiais comprados no Brasil, no ano de 2006.

Os custos dos métodos fenotípicos e genotípico foram analisados considerando-se os valores específicos gastos para cada prova realizada, sem se levar em conta os gastos gerais como ágar Sabouraud utilizados para semeadura inicial das amostras, placas de Petri descartáveis, água destilada, e pessoal técnico do laboratório, comuns a todas as provas realizadas. Estes dados podem ser observados na Tabela 9.

O ágar caseína e a temperatura a 45°C foram os que apresentaram menor custo entre os métodos fenotípicos analisados, R\$ 0,20 e R\$ 0,22 por amostra, com um grau de eficiência de 85% e 86,5% respectivamente, o que consideramos uma boa relação custo benefício. Já o ágar fubá adicionado de Tween 80, apresentou um custo de R\$ 0,24 por amostra com um grau de eficiência de 76%, portanto não consideramos um método de diferenciação satisfatório.

Na prova da temperatura consideramos o custo do ágar Sabouraud utilizado para que a amostra fosse submetida a 45°C.

O ágar tabaco embora tenha um grau de eficiência de 92%, teve o custo mais elevado entre os métodos fenotípicos analisados, R\$ 0,95 por amostra. Consideramos que ao trocar o tabaco em rolo pelo cigarro “light”<sup>68</sup> o meio ficou sensivelmente mais caro do que o original idealizado por Tendolkar<sup>160</sup> em 2003.

O ágar girassol foi o melhor método fenotípico analisado para diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Teve um grau de eficiência de 92,5%, com um custo de R\$ 0,46 por amostra, bem inferior ao ágar tabaco que apresentou eficiência similar. É importante salientar que o ágar girassol simplificado, tem apresentado os mesmos resultados satisfatórios que a fórmula original<sup>68</sup>, porém como não utiliza creatinina, glicose e fosfato de potássio, tem um custo de R\$ 0,23 por amostra, ou seja, alto custo benefício.

Nenhum dos métodos fenotípicos realizados em nosso estudo apresentou-se 100% eficaz.

Embora os testes baseados no PCR ofereçam o método mais seguro para identificação definitiva de *C. dubliniensis*, são trabalhosos e podem não estar disponíveis para todos os laboratórios de micologia<sup>11, 25, 49, 64, 68, 69, 73, 79, 83, 101, 165</sup>.

O custo da montagem do Laboratório de Biologia Molecular de Leveduras foi de R\$ 73.544,97, e o custo da identificação utilizando PCR foi de R\$ 11,00 por amostra. Embora o valor seja mais do que 10 vezes o gasto na prova fenotípica mais cara, o ágar tabaco, consideramos um valor baixo, pois a identificação precisa da cepa responsável por uma fungemia em um paciente, seja ele imunossuprimido ou não, e a pronta instituição da terapia antifúngica adequada, se faz necessário. O custo benefício da identificação genotípica de um microrganismo capaz de causar doenças, tem valor inestimável sendo este um dos grandes avanços dos tempos atuais.

Os testes fenotípicos realizados apresentaram resultados satisfatórios, com grau de eficiência entre 76% e 92,5%, porém a identificação definitiva entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* ainda requer técnicas genotípicas.

## 7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos permitiu as seguintes conclusões:

- a) não foram encontradas cepas de *C. dubliniensis* entre os 200 isolados provenientes da cavidade bucal de: pacientes transplantados cardíacos sob terapia com imunossupressores, pacientes com tuberculose submetidos a antibioticoterapia prolongada, pacientes HIV positivos e indivíduos saudáveis, presentes em coleção de espécies do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UNESP/ São José dos Campos;
- b) o ágar girassol foi o método fenotípico com maior acordo de identificação com o método genotípico, entre os analisados, para diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*;
- c) nenhum dos métodos fenotípicos analisados apresentou 100% de acordo de identificação com o método genotípico.
- d) a identificação genotípica é necessária para identificação definitiva entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

## 8 REFERÊNCIAS

- 1 Acikgoz ZC, Sancak B, Gamberzade S, Misirlioglu M. Prevalence of *Candida dubliniensis* among the stored vaginal *Candida* isolates in a Turkish hospital. *Mycoses*. 2004; 47:393-6.
- 2 Ahmad S, Khan Z, Mokaddas E, Khan ZU. Isolation and molecular identification of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus infected patients in Kuwait. *J Med Microbiol*. 2004; 53:633-7.
- 3 Al-Hedaithy SSA. The yeast species causing fungemia at a university hospital in Riyadh, Saudi Arabia, during a 10-year period. *Mycoses*. 2003; 46:275-80.
- 4 Allen CM, Saffer A, Meister RK, Beck FM, Bradway S. Comparison of a lesion-inducing isolate and a non-lesional isolate of *Candida albicans* in an immunosuppression model of oral candidiasis. *J Oral Pathol Med*. 1994;23(3):133-9.

---

\* Baseado em:

International Comitê of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referentes [homepage na internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

- 5 Almeida RBA. Caracterização molecular da variabilidade genética de uma população de *Eucalyptus grandis* hill ex maiden destinada a serraria [dissertação]. Botucatu: Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 1998.
- 6 Al-Mosaid A, Sullivan DJ, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar. J Clin Microbiol. 2003 Oct.; 41:4787-9.
- 7 Al-Mosaid A, Sullivan DJ, Polacheck I, Shaheen FA, Soliman O, Al-Hedaithy S, et al. Novel 5-flucytosine-resistant clade of *Candida dubliniensis* from Saudi Arabia and Egypt identified by Cd25 fingerprinting. J Clin Microbiol. 2005 Aug.; 43(8):4026-36.
- 8 Al-Mosaid A, Sullivan DJ, Salkin IF, Shanley D, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar. J Clin Microbiol. 2001 Jan.; 39(1):323-7.
- 9 Al-Sweih N, Ahmad S, Khan ZU, Khan S, Chandy R. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive *Candida* isolates in a maternity hospital in Kuwait. Mycoses. 2005; 48:347-51.
- 10 Alves SH, Horta JA, Milan EP, Scheid LA, Vainstein MH, Santurio JM et al. Carbohydrate assimilation profiles of Brazilian *Candida dubliniensis* isolates based on ID 32C system. Rev Inst Med Trop. 2005; 47(2):109-11.

- 11 Alves SH, Linares CE, Loreto ES, Rodrigues M, Thomazi DI, Souza F, et al. Utilização do ágar suco de tomate (ágar V8) na identificação presuntiva de *Candida dubliniensis*. Comunicação. Rev Bras Med Trop. 2006 jan./fev.; 39(1):92-3.
- 12 Alves SH, Loreto ES, Linares CE, Silveira CP, Scheid LA, Pereira DIB et al. Comparison among tomato juice agar with other three media for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. Rev Inst Med Trop. 2006 May/June; 48(3): 119-21.
- 13 Alves SH, Milan EP, Moretti-Branchini ML, Nishimura K, Fukushima K, Oliveira LO et al. First isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2001; 39:165-8.
- 14 Alves SH, Silva GM, Scopel PA, Oliveira LTO, Costa JM, Milan EP et al. Isolamento de *Candida dubliniensis* da mucosa oral de um paciente com SIDA, no Rio Grande do Sul. AMRIGS. 2000 jul./dez.; 44 (3,4): 185-7.
- 15 Binolfi A, Biasoli MS, Luque AG, Tosello ME, Magaró HM. High prevalence of oral colonization by *Candida dubliniensis* in HIV-positive patients in Argentina. Medical Mycology. 2005 Aug.; 43: 431-7.
- 16 Blignaut E, Pujol C, Joly S, Soll DR. Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. J Clin Microbiol. 2003 May; 41(5):1838-42.

- 17 Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Durussel C, Addo M, Pagani JL, Chave JP et al. Cluster of oral atypical *Candida* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. *J Clin Microbiol.* 1995 May; 33(5):1129-35.
- 18 Borst A, Theelen B, Reindeers E, Boekhout T, Fluit AC, Savelkoul PHM. Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *C. dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 2003 Apr.; 41(4):1357-62.
- 19 Boucher H, Mercure S, Montplaisir S, Lemay G. A novel group I intron in *Candida dubliniensis* is homologous to a *Candida albicans* intron. *Gene.* 1996; 180:189-96.
- 20 Brandt ME, Harrison LH, Pass M, Sofair AN, Huie S, Li RK, et al. *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. *Emerg Infect Dis.* 2000 Jan./Feb.; 6(1):46-9.
- 21 Caligiorne RB, Resende MA, Dias-Neto E, Oliveira SC, Azevedo V. Dematiaceous fungal pathogens: analysis of ribosomal DNA gene polymorphism by polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism. *Mycoses.* 1999; 42:609-14.
- 22 Campanha NH, Neppelenbroek KH, Spolidorio DMP, Spolidorio LC, Pavarina AC. Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis.* 2005; 11:392-8.
- 23 Carr MJ, Clarke S, O'Connell F, Sullivan DJ, Coleman DC, O'Connell B. First reported case of endocarditis caused by *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 2005 June; 43(6):3023-26.

- 24 Chan-Tack KM. Fatal *Candida dubliniensis* septicemia in a patient with AIDS. Clin Infect Dis. 2005; 40:1208-9.
- 25 Chavasco JK, Paula CR, Hirata MH, Aleva NA, Melo CE, Gambale W, et al. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med trop. 2006 Jan./Feb.; 48(1):21-6.
- 26 Cirak MY, Kalkanci A, Kustimur S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003 Dec.; 98(8):1027-32.
- 27 Coleman DC, Bennett DE, Sullivan DJ, Gallagher PJ, Henman MC, Shanley DB, et al. Oral *Candida* in HIV infection and AIDS: News perspectives/ new approaches. Crit Rev Microbiol. 1993; 19(2):61-82.
- 28 Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB, et al. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. AIDS. 1997 Apr.; 11(5):557-67.
- 29 Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Rev Soc Bras Med Trop. 2003 set./out.; 36(5):599-607.
- 30 Costa CR, Lemos JA, Passos XS, Araújo CR, Cohen AJ, Souza LKH, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of oral *Candida* isolates from HIV-infect patients in the antiretroviral therapy era. Mycopathologia. 2006; 162:45-50.

- 31 Davis LE, Shields CE, Merz WG. Use of a commercial reagent leads to reduced germ tube production by *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol. 2005 May; 43(5):2465-6.
- 32 Donnelly SM, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. Microbiology. 1999; 145:1871-82.
- 33 Dubus JC, Marguet C, Deschildre A, Mely L, Le Roux P, Brouard J, et al. Local side-effects of inhaled corticosteroids in asthmatics children: influence of drug, dose, age and device. Allergy. 2001; 56(10):944-8.
- 34 Eeles RA, Warren W, Stamps A. The PCR revolution. Eur J Cancer. 1992; 28(1):289-93.
- 35 Eisenstein BI. New opportunistic infections- more opportunities. N Engl J Med. 1990; 323(23):1625-7.
- 36 Elie CM, Timothy JL, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species-specific DNA probes. J Clin Microbiol. 1998 Nov.; 36(11): 3260-5.
- 37 Ellepola ANB, Hurst SF, Elie CM, Morrison CJ. Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. Oral Microbiol Immunol. 2003 Dec.; 18(6):379-88.

- 38 Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González-Gómez N, Pontón J et al. Evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. J Clin Microbiol. 2006 Sept.; 44(9):3340-5.
- 39 Faggi E, Pini G, Campisi E, Martinelli C, Difonzo E. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus infected and non-infected patients and in a yeast culture collection. Mycoses. 2005; 48:211-15.
- 40 Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, Butler G. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. BMC Evolutionary Biology. 2006 Nov.; 6:99.
- 41 Fotedar R, Al-Hedaithy SSA. *Candida dubliniensis* at a university hospital in Arabia Saudita. J Clin Microbiol. 2003 May; 41(5):1907-11.
- 42 Fotedar R, Al-Hedaithy SSA. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive yeasts recovered from the respiratory specimens in HIV-negative patients. Mycoses. 2004; 47: 150-5.
- 43 Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and methyl- $\alpha$ -D-glucose as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC Systems. J Clin Microbiol. 1999 Dec.; 37(12): 3804-8.

- 44 Gamboa AB, Mendoza M, Fernández A, Díaz E. Detection of *Candida dubliniensis* in patients with candidiasis in Caracas, Venezuela. Rev Iberoam Micol. 2006; 23:81-4.
- 45 Gee SF, Joly S, Soll DR, Meis JFGM, Verweij PE, Polacheck I, et al. Identification of four distinct genotypes of *Candida dubliniensis* and detection of microevolution in vitro and in vivo. J Clin Microbiol. 2002; 40:556-74.
- 46 Giammanco GM, Pizzo G, Pecorella S, Distefano S, Pecoraro V, Milici ME. Identification of *Candida dubliniensis* among oral yeast isolates from an Italian population of human immunodeficiency virus-infected (HIV+) subjects. Oral Microbiol Immunol. 2002; 17:89-94.
- 47 Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NAR. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. Microbiology. 1998; 144:829-38.
- 48 Graf B, Adam T, Zill E, Göbel UB. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. J Clin Microbiol. 2000 May; 38(5): 1782-5.
- 49 Graf B, Trost A, Eucker J, Göbel UB, Adam T. Rapid and simple differentiation of *C. dubliniensis* from *C. albicans*. Diag Microbiol Infect Dis. 2004; 48:149-51.
- 50 Gugnani HC, Becker K, Fegeler W, Basu S, Chattopadhyaya D, Baveja U et al. Oropharyngeal carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in India. 2003. Mycoses. 2003; 46:281-8.

- 51 Gutierrez J, Morales P, Gonzalez MA, Quindós G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. J Basic Microbiol. 2002; 42(3): 207-27.
- 52 Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. Clin Microbiol Rev. 1995 Oct.; 8(4):462-78.
- 53 Holmberg K, Meyer RD. Fungal infections in patients with AIDS and AIDS- related complex. Scand J Infect Dis. 1986; 18:179-92.
- 54 Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KI, Horvath LL, Murray CK. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar Candida. Ann Clin Microbiol Antimicrobials [journal on line]. 2006 [20/12/2006]. Disponível em: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/5/1/1>.
- 55 Iwen PC, Freifeld AG, Bruening TA, Hinrichs SH. Use of a panfungal PCR assay for detection of fungal pathogens in a commercial blood culture system. J Clin Microbiol. 2004 May; 42(5): 2292-3.
- 56 Jabra-Rizk MA, Baqui AA, Kelley JI, Falkler WA Jr, Merz WG, Meiller TF. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. J Clin Microbiol. 1999 Feb.; 37(2):321-6.
- 57 Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr, Merz WG, Kelley JI, Baqui AAMA, Meiller TF. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. J Clin Microbiol. 1999 May; 37(5):1464-8.

- 58 Jabra-Rizk MA, Falkler WAJr, Merz WG, Baqui AAMA, Kelley JI, Meiller TF. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from immunodeficiency virus (HIV) infected and non-HIV-infected individuals. J Clin Microbiol. 2000 June; 38(6):2423-6.
- 59 Jabra-Rizk MA, Ferreira SMS, Sabet M, Falkler WA, Merz WG, Meiller TF. Recovery of *Candida dubliniensis* and other yeasts from human immunodeficiency virus-associated periodontal lesion. J Clin Microbiol. 2001 Dec.; 39(12):4520-2.
- 60 Jabra-Rizk MA, Johnson JK, Forrest G, Mankes K, Meiller TF, Venezia RA. Prevalence of *Candida dubliniensis* fungemia at a large teaching hospital. Clin Infect Dis. 2005; 41:1064-7.
- 61 Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. J Antimicrob Chemother. 1995; 35:103-14.
- 62 Joly S, Pujol C, Soll DR. Microevolutionary changes and chromosomal translocations are more frequent at RPS loci in *Candida dubliniensis* than in *Candida albicans*. Infect Genet Evol. 2002; 2:19-37.
- 63 Jorge AOC, Koga-Ito CY, Gonçalves CR, Fantinato V, Unterkircher CS. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. Rev Odontol Univ São Paulo. 1997 out./dez.; 11(4): 279-85.

- 64 Kanbe T, Kurimoto K, Hattori H, Iwata T, Kikuchi A. Rapid identification of *Candida albicans* and its related species *Candida stellatoidea* and *Candida dubliniensis* by a single PCR amplification using primers specific for the repetitive sequence (RPS) of *Candida albicans*. J Dermatol Sci. 2005; 40:43-50.
- 65 Kalkanci A, Kokturk N, Senol E, Acar K, Guzel O, Sancak B et al. Could *Candida dubliniensis* be involved in lung fungal balls? Rev Iberoam Micol. 2005; 22:157-9.
- 66 Kantarcioglu AS, Yücel A. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains among *Candida albicans* isolates from immunocompromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. Rev Iberoam Micol. 2002; 19: 44-8.
- 67 Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandi R. Simplified sunflower (*Helianthus annuus*) seed agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. Clin Microbiol Infect. 2004 June; 10(6):590-2.
- 68 Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2004 Oct.; 42(10): 4796-8.
- 69 Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandi R. Sunflower seed husk Agar: a new medium for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. Indian J Med Microbiol. 2005; 23(3):182-5.

- 70 Kim JO, Garofalo L, Blecker-Shelly D, McGowan KL. *Candida dubliniensis* infections in a pediatric population: retrospective identification from clinical laboratory isolates of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2003 July; 41(7):3354-7.
- 71 Kirkpatrick WR, Revankar SG, McAtee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, et al. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar Candida screening and susceptibility testing of isolates. J Clin Microbiol. 1998 Oct.; 36(10): 3007-12.
- 72 Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. J Clin Microbiol. 1997 May; 35(5):1216-23.
- 73 Kurzai O, Heinz WJ, Sullivan DJ, Coleman DC, Frosch M, Mühlischlegel FA. Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH-regulated *PHR1* e *PHR2* genes of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1999 May; 37(5):1587-90.
- 74 Lees E, Barton RC. The use of niger seed agar to screen for *Candida dubliniensis* in the clinical microbiology laboratory. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 46:13-7.

- 75 Le Guennec R, Reynes J, Mallie M, Pujol C, Janbon F, Bastide JM. Fluconazole and itraconazole-resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients: multilocus enzyme electrophoresis analysis and antifungal susceptibilities. J Clin Microbiol. 1995 Oct.;33(10):2732-7.
- 76 Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, Bachmann TT. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasived mycoses. J Clin Microbiol. 2005 Oct.; 43(10):4943-53.
- 77 Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. DNA recombinante e genômico. In: Biologia celular e molecular. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. Cap.7, p.246-7.
- 78 Loreto ES, Bolzan AR, Linares CEB, Boff E, Santurio JM, Alves SA. Evaluation of 5 new media containing extracts of seeds applied to *Candida dubliniensis* screening. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006; 55:191-3.
- 79 Mähnß B, Stehr F, Schäfer W, Neuber K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. Mycoses. 2005; 48:55-61.
- 80 Mannarelli BM, Kurtzman CP. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. J Clin Microbiol. 1998 June; 36(6):1634-41.

- 81 Mariano PLS. Diferentes processos de armazenamento de leveduras; estudos sobre a variabilidade fenotípica e genotípica [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Universidade Estadual de Campinas; 2006.
- 82 Mariano PLS, Milan EP, Matta DA, Colombo AL. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian Yeast Stock Collection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003 June; 98(4): 533-8.
- 83 Marot-Leblond A, Beucher B, David S, Nail-Billaud S, Robert R. Development and evaluation of a rapid latex agglutination test using a monoclonal antibody to identify *Candida dubliniensis* colonies. J Clin Microbiol. 2006 Jan.; 44(1):138-42.
- 84 Marot-Leblond A, Grimaud L, David S, Sullivan DJ, Coleman DC, Ponton J, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for identification of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol. 2004 Nov.; 42(11):4956-60.
- 85 Martin C, Roberts D, Weide M, Rossau R, Jannes G, Smith T, et al. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. J Clin Microbiol. 2000 Oct.; 38(10):3735-42.
- 86 McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. J Clin Microbiol. 1999 Feb.; 37(2):417-21.

- 87 McCullough MJ, Ross BC, Dwyer BD, Reade PC. Genotype and phenotype of oral *Candida albicans* from patients infected with the human immunodeficiency virus. *Microbiology*. 1994; 140:1195-202.
- 88 McCullough M, Ross B, Reade P. Characterization of genetically distinct subgroup of *Candida albicans* strains isolated from oral cavities of patients infect with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol*. 1995 Mar.; 33(3):696-700.
- 89 Meiller TF, Jabra-Rizk MA, Baqui AAMA, Kelley JI, Meeks VI, Merz WG, et al. Oral *Candida dubliniensis* as a clinically important species in HIV-seropositive patients in the United States. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999 Nov; 88(5):573-80.
- 90 Meis JFGM, Ruhnke M, Pauw BED, Odds FC, Siegert W, Verweij PE. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy- induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerg Infect Dis*. 1999 Mar; 5(1):150-3.
- 91 Melo NR, Taguchi H, Culhari VVP, Sano A, Fukushima K, Makoto M et al. *Candida dubliniensis* in a brazilian family with an HIV 1- infected child: identification, antifungal susceptibility, drug accumulation and sterol composition. *Braz J Microbiol*. 2006; 37:237-43.
- 92 Melo NR, Taguchi H, Jorge J, Pedro RJ, Almeida OP, Fukushima K, et al. Oral *Candida* flora from brazilian human immunodeficiency virus-infect patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 June; 99(4):425-31.

- 93 Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesqui Odontol Bras.* 2001 out./dez.; 15(4):314-9.
- 94 Milan EP, Sant'Ana PL, Melo ASA, Sullivan DJ, Coleman DC, Lewi D, et al. Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001; 41:29-35.
- 95 Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Maeda N, Ohshima T, Yamaguchi H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. *Jpn J Infect Dis.* 2005; 58:235-7.
- 96 Momani OM, Qaddoomi. Identification of *Candida dubliniensis* in a diagnostic microbiology laboratory. *East Mediterr Health J.* 2005; 11(3):366-71.
- 97 Montour L, Tey R, Xu J. Isolation of *Candida dubliniensis* in an aboriginal community in Ontario, Canada. *J Clin Microbiol.* 2003 July; 41 (7):3423-6.
- 98 Moran GP, Sanglard D, Donnelly SM, Shanley DB, Sullivan DJ, Coleman DC. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 July; 42(7):1819-30.

- 99 Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Shanley DB, et al. Antifungal drug susceptibility of oral *Candida dubliniensis* isolates from HIV- infected and non-HIV- infected subjects and generation of stable fluconazole- resistant derivatives *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Mar; 41(3):617-23.
- 100 Mosca CO, Moragues MD, Brena S, Rosa AC, Ponton J. Isolation of *Candida dubliniensis* in a teenager with denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005; 10:28-31.
- 101 Mosca CO, Moragues MD, Llovo J, Mosaid AA, Coleman DC, Pontón J. Casein agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 2003 Mar.; 41(3): 1259-62.
- 102 Mubareka S, Vinh DC, Sanche SE. *Candida dubliniensis* bloodstream infection: a fatal case in a lung transplant recipient. *Transpl Infect Dis*. 2005; 7:146-9.
- 103 Navazesh M, Mulligan R, Pogoda J, Greenspan D, Alves M, Phelan J, et al. The effect of HAART on salivary microbiota in the women's interagency HIV study (WIHS). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Dec; 100(6):701-8.
- 104 Odds FC, Van Nuffel L, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J Clin Microbiol*. 1998 Oct.; 36(10):2869-73.

- 105 Oliveira EE, Silva SC, Soares AJ, Attux C, Cruvinel B, Silva MRRS. Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. Rev Soc Bras Med Trop. 1998 nov./dez.; 31(6): 523-7.
- 106 Park S, Wong M, Marras SAE, Cross EW, Kiehn TE, Chaturvedi V, et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. J Clin Microbiol. 2000 Aug; 38(6):2829-36.
- 107 Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. Clin Infect Dis. 1996; 22(Suppl 2):S112-8.
- 108 Pfaller MA. Epidemiology and control of fungal infections. Clin Infect Dis. 1994; 19(Suppl 1):S8-13.
- 109 Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. Clin Infect Dis. 1996; 22(Suppl 2):S89-94.
- 110 Pfaller MA, Diekema DJ. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. Clin Microbiol Infect. 2004; 10 (Suppl.1):11-23.
- 111 Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Huynh H, Hollis RJ, Diekema DJ. In vitro activities of 5-fluorocytosine against 8,803 clinical isolates of *Candida* spp.: global assessment of primary resistance using National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility testing methods. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Nov.; 46(11):3518-21.

- 112 Pfaller MA, Messer SA, Gee S, Joly S, Pujol C, Sullivan DJ, et al. In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. J Clin Microbiol. 1999 Mar.; 37(3):870-2.
- 113 Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye AA, Salkin IF, Geimer M, et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. J Clin Microbiol. 1999 Nov.; 37(11):3533-9.
- 114 Pinjon E, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. Biochem Soc Trans. 2005; 33(Pt 5):1210-4.
- 115 Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1998 July; 36(7):2093-5.
- 116 Pinto PM, Resende MA, Koga-Ito CY, Tendler M. Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. isolates using random amplified polymorphic DNA. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004 Mar.; 99(2):147-52.
- 117 Pinto PM, Resende MA, Koga-Ito CY, Ferreira JAG, Tendler M. rDNA-RFLP identification of *Candida* species in immunocompromised and seriously diseased patients. Can J Microbiol. 2004; 50:514-20.

- 118 Polacheck I, Strahilevitz J, Sullivan D, Donnelly S, Salkin IF, Coleman DC. Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel. J.Clin Microbiol. 2000 Jan.; 38(1):170-4.
- 119 Ponton J, Rùchel R, Clemons KV, Coleman DC, Grillot R, Guarro J, et al. Emerging pathogens. Med Mycol. 2000; 38 (Suppl. 1):225-36.
- 120 Portela MB, Souza IPR, Costa EMMB, Hagler NA, Soares RMA, Santos ALS. Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in human immunodeficiency virus-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol. 2004; 42(12):5925-27.
- 121 Powderly WG. Mucosal candidiasis caused by non- albicans species of *Candida* in HIV- positive patients, [letter]. AIDS. 1992; 6(6): 604-5.
- 122 Pujol C, Renaud F, Mallie M, Meeus T, Bastide JM. Atypical strains of *Candida albicans*, recovered from AIDS patients. J Med Vet Mycol. 1997; 35:115-21.
- 123 Quindós G, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP, Salgado J, Alonso-Vargas R, Rodrigo JM, et al. *In vitro* susceptibility of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents. Chemotherapy. 2000; 46:395-401.
- 124 Reiniger LRS, Anthonisen D, Choer E, Sepel LMN. Reciclagem de agarose em laboratórios de biologia molecular. Cienc Rural. 2004 set./out.; 34(5): 1603-5.

- 125 Ribeiro MA, Paula CR. Up-regulation of *ERG11* gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated in vitro: is there any clinical implication? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 57:71-5.
- 126 Ribeiro PM. Presença de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de receptores de transplante cardíaco [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2003.
- 127 Romeo O, Racco C, Criseo G. Amplification of the hyphal wall protein 1 gene to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. 2006 July; 44(7):2590-2.
- 128 Ruhnke M, Grosch-Wörner I, Steinmüller A, Neubauer A. Molekulare epidemiologie von *Candida*-Infektionen bei HIV-infizierten und ihren kindern [abstract]. *Wien Med Wschr*. 1997; 147:446-9.
- 129 Ruskin JD, Wood RP, Bailey MR, Whitmore CK, Shaw BW. Comparative trial of oral clotrimazole and nystatin for oropharyngeal candidiasis prophylaxis in orthotopic liver transplant patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992 Nov.; 74(5):567-71.
- 130 Sahand IH, Moragues MD, Eraso E, Villar-Vidal M, Quindós G, Pontón J. Supplementation of CHROMagar *Candida* medium with Pal's medium for rapid identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. 2005 Nov.; 43(11):5768-70.

- 131 Salkin IF, Pruitt WR, Padhye AA, Sullivan D, Coleman D, Pincus DH. Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolates of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. J Clin Microbiol. 1998 May; 36(5):1467.
- 132 Samaranayake LP, Holmstrup P. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. J Oral Pathol Med. 1989; 18:554-64.
- 133 Sancak B, Colakoglu S, Acikgoz ZC, Arikan S. Incubation at room temperature may be an independent factor that induces chlamydospore production in *Candida dubliniensis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 52:305-9.
- 134 Sancak B, Rex JH, Paetznick V, Chen E, Rodriguez J. Evaluation of a method for identification of *Candida dubliniensis* bloodstream isolates. J Clin Microbiol. 2003 Jan.; 41(1):489-91.
- 135 Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. Acta Odontol Scand. 1990; 48:27-36.
- 136 Sant'Ana PL, Milan EP, Martinez R, Queiroz- Telles F, Ferreira MS, Alcântara AP, et al. Multicenter Brazilian Study of Oral *Candida* species isolated from AIDS patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Mar.; 97(2):253-7.
- 137 Scherer S, Stevens DA. A *Candida albicans* dispersed repeated gene family and its epidemiologic applications. Proc Natl Acad Sci USA. 1988 Mar.; 85(5):1452-6.

- 138 Schmid J, Odds FC, Wiselka MJ, Nicholson KG, Soll DR. Genetic similarity and maintenance of *Candida albicans* strains from a group of AIDS patients, demonstrated by DNA fingerprinting. J Clin Microbiol. 1992 Apr.; 30(4):935-41.
- 139 Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Goossens H. Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997; 16(4):296-300.
- 140 Schorling SR, Kortinga HC, Froschb M, Mühlischlegel FA. The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected individuals. Crit Rev Microbiol. 2000; 26(1):59-68.
- 141 Sebbenn AM. Análises de genética de populações em espécies arbóreas [apostila]. Piracicaba: Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz, Universidade São Paulo; 2005.
- 142 Sebti A, Kiehn TE, Perlin D, Chaturvedi V, Wong M, Doney A, et al. *Candida dubliniensis* at a cancer center. Clin Infect Dis. 2001; 32:1034-8.
- 143 Silva JO, Franceschini SA, Candido RC. Presença de leveduras em mucosas e fezes de indivíduos aparentemente saudáveis e de pessoas com sintomas de infecção fúngica. Rev Inst Adolfo Lutz. 2002; 61(2):113-20.
- 144 Staib F, Arastéh K. Chlamydospore formation on Staib agar: observations made before *Candida dubliniensis* was described. Mycoses. 2001; 44:23-7.

- 145 Staib P, Morschhäuser J. Chlamyospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses*. 1999; 42:521-4.
- 146 Stenderup A. Oral mycology [review]. *Acta Odontol Scand*. 1990; 48(1):3-10.
- 147 Stevens DA. First report of *Candida dubliniensis* in Middle East. *J Clin Microbiol*. 2001 Jan.; 39(1):416.
- 148 Sullivan D, Bennett D, Henman M, Harwood P, Flint S, Mulcahy F, et al. Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus- positive and AIDS patients. *J Clin Microbiol*. 1993 Aug.; 31(8):2124-33.
- 149 Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol*. 1998 Feb.; 36(2):329-34.
- 150 Sullivan D, Haynes K, Bille J, Boerlin P, Rodero L, Lloyd S et al. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus- infected individuals. *J Clin Microbiol*. 1997 Apr.; 35(4):960-4.
- 151 Sullivan DJ, Henman MC, Moran GP, O'Neill LC, Bennett DE, Shanley DB et al. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-albicans *Candida* species. *J Med Microbiol*. 1996; 44: 399-408.
- 152 Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol Letters*. 2005; 253:9-17.

- 153 Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S, Gee S, Pinjon E, McCartan B, et al. *Candida dubliniensis*: an update. *Rev Iberoamer Micol.* 1999; 16:72-6.
- 154 Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2004; 4:369-76.
- 155 Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. Nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology.* 1995; 141:1507-21.
- 156 Tan AL, Wang GCY, Chiu YW. *Candida dubliniensis* infection, Singapore [letter]. *Emerg Infect Dis.* 2002 Apr.; 8(4):445-6.
- 157 Tekeli A, Akan OA, Koyuncu E, Dolapci I, Uysal S. Initial *Candida dubliniensis* isolate in *Candida* spp. positive haemocultures in Turkey between 2001 and 2004. *Mycoses.* 2006; 49:60-4.
- 158 Tekeli A, Dolapci I, Emral R, Cesur S. *Candida* carriage and *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. *Mycoses.* 2004; 47:315-8.
- 159 Tekeli A, Koyuncu E, Dolapci I, Guven GS, Sahin GO, Uzun O. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of Turkish HIV-positive patients. *Mycoses.* 2005; 48:197-201.

- 160 Tendolkar U, Tainwala S, Jog S, Mathur M. Use a new medium: tobacco agar, for pigment production of *Cryptococcus neoformans*. Ind J Med Microbiol. 2003; 21(4): 277-9.
- 161 Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, et al. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol. 2000 Apr.; 38(4):1599-608.
- 162 Williams DW, Lewis MAO. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. Oral Dis. 2000; 6:3-11.
- 163 Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B, Manafi M. Performance of Candida ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar Candida. J Clin Microbiol. 2001 Oct.; 39(10): 3793-5.
- 164 Xavier GR, Martins LMV, Rumjanek NG, Freire Filho FR. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores de RAPD. Pesq Agropec Bras; 2005 abr.; 40(4):353-9.
- 165 Xu J, Millar BC, Moore JE, McClurg R, Walker MJ, Evans J, et al. Comparison of API 20C with molecular identification of *Candida* spp. Isolated from bloodstream infections. J Clin Pathol. 2002; 55:774-7.
- 166 Yera H, Poulain D, Lefebvre A, Camus D, Sendid B. Polymicrobial candidaemia revealed by peripheral blood smear and chromogenic medium. J Clin Pathol. 2004 Feb.; 57(2):196-8.

- 167 Yücesoy M, Esen N, Yulug N. Use of chromogenic tube and methyl blue-Sabouraud agar for the identification of *Candida albicans* strains. Kobe J Med Sci. 2001 Aug.; 47:161-7.
- 168 Zavalza-Stiker A, Ortiz-Saldivar B, García-Hernández M, Castillo-Casanova M, Bonifaz A. Rapid production of *Candida albicans* chlamydospores in liquid media under various incubation conditions. Jpn J Med Mycol. 2006; 47:231-4.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.



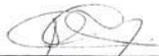
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

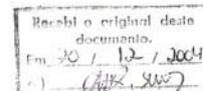
## CERTIFICADO

Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 096/2004-PH/CEP, sobre "Identificação de *Candida dubliniensis* em coleção de amostras do gênero *Candida*", sob a responsabilidade de **PATRICIA MONTEIRO RIBEIRO**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa

São José dos Campos, 07 de dezembro de 2004.

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local



Apêndice A – Quadro demonstrativo das Provas Realizadas  
 Quadro 4 - Dados referentes às Provas Fenotípicas e Genotípicas (continua)\*

nº	*Tubo Germ	Agar Fubá/ *Cl.	Agar Caseína *Cl	Agar Tabaco/Cl	Franja Hifal Tabaco	Agar Girassol/CL	Franja Hifal Girassol	Temperatura 45°C	*PCR
1	positivo	raros trincas	*neg	neg	neg	neg	neg	*pos	C. albicans
2	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
3	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
4	positivo	alguns duplos	pos	neg	neg	poucos cl	neg	pos	C. albicans
5	positivo	únicos	neg	poucos cl	pos	neg	neg	pos	C. albicans
6	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
7	positivo	alguns duplos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
8	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
9	positivo	duplos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	C. albicans
10	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	C. albicans
11	positivo	duplos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
12	positivo	duplos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
13	positivo	trincas	pos	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
14	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
15	positivo	únicos	poucos cl	neg	neg	poucos cl	neg	pos	C. albicans
16	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	C. albicans
17	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
18	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
19	positivo	trincas	poucos cl	neg	neg	poucos cl	neg	pos	C. albicans
20	positivo	duplos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
21	positivo	duplos/trincas	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
22	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
23	positivo	únicos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
24	positivo	duplos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	C. albicans
25	positivo	únicos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	C. albicans

\*Tubo Germ= tubo germinativo; Cl.=clamidoconídeo; PCR= reação em cadeia da polimerase; neg= negativo; pos= positivo.

Quadro 4 - Dados referentes às Provas Fenotípicas e Genotípicas (continua)

n°	Tubo Germ	Agar Fubá/ Cl.	Agar Caseína Cl	Ágar Tabaco/Cl	Franja Hifal Tabaco	Agar Girassol/CL	Franja Hifal Girassol	Temperatura 45°C	PCR
26	positivo	duplos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
27	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
28	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
29	positivo	duplos/trincas	cachos	neg	neg	pos	pos	pos	C. albicans
30	positivo	únicos	cachos	neg	neg	pos	pos	neg	C. albicans
31	positivo	duplos/trincas	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
32	positivo	alguns duplos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
33	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
34	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
35	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
36	positivo	únicos	poucos cl	neg	neg	pos	pos	pos	C. albicans
37	positivo	únicos	neg	poucos cl	pos	neg	neg	pos	C. albicans
38	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
39	positivo	duplos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	C. albicans
40	positivo	duplos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
41	positivo	duplos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
42	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
43	positivo	duplos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
44	positivo	duplos/trincas	cachos	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
45	positivo	duplos/trincas	cachos	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
46	positivo	duplos/trincas	pos	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
47	positivo	duplos	pos	neg	neg	poucos cl	neg	pos	C. albicans
48	positivo	únicos	neg	neg	neg	poucos cl	neg	pos	C. albicans
49	positivo	duplos/trincas	neg	neg	neg	neg	neg	pos	C. albicans
50	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	C. albicans

Quadro 4 - Dados referentes às Provas Fenotípicas e Genotípicas (continua)

n°	Tubo Germ	Agar Fubá/ Cl.	Agar Caseína Cl	Agar Tabaco/Cl	Franja Hifal	Agar Girasso/CL	Franja Hifal	Temperatura 45°C	PCR
51	positivo	alguns duplos únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
52	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
53	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
54	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
55	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
56	positivo	únicos	poucos cl	poucos cl	pos	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
57	positivo	únicos	neg	neg	pos	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
58	positivo	únicos	poucos cl	poucos cl	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
59	positivo	duplos/trincas	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
60	positivo	únicos	poucos cl	poucos cl	pos	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
61	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
62	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
63	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
64	positivo	únicos	neg	poucos cl	pos	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
65	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
66	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
67	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
68	positivo	únicos	neg	poucos cl	pos	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
69	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
70	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
71	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
72	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
73	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
74	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
75	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>

Quadro 4 - Dados referentes as Provas Fenotípicas e Genotípica (continua)

n°	Tubo Germ	Agar Fubá/ Cl.	Agar Caseína Cl	Agar Tabaco/Cl	Franja Hifal	Agar Girasso/CL	Franja Hifal	Temperatura 45°C	PCR
76	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
77	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
78	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
79	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
80	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
81	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
82	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
83	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
84	positivo	únicos	neg	neg	neg	pos	neg	pos	<i>C. albicans</i>
85	positivo	únicos	neg	poucos cl	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
86	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
87	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
88	positivo	duplos/trincas	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
89	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
90	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
91	positivo	cachos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
92	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
93	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
94	positivo	únicos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
95	positivo	cachos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	<i>C. albicans</i>
96	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
97	positivo	únicos	neg	poucos cl	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
98	positivo	cachos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
99	positivo	alguns duplos	neg	poucos cl	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
100	positivo	cachos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>

Quadro 4 - Dados referentes as Provas Fenotípicas e Genotípica (continua)

nº	Tubo Germ	Agar Fubá/ Cl.	Agar Caseína Cl	Agar Tabaco/Cl	Franja Hifal	Agar Girasso/CL	Franja Hifal	Temperatura 45°C	PCR
101	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
102	positivo	cachos	pos	cachos	pos	pos	pos	neg	<i>C. albicans</i>
103	positivo	cachos	pos	cachos	pos	pos	pos	neg	<i>C. albicans</i>
104	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
105	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
106	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
107	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
108	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
109	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
110	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
111	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
112	positivo	únicos	neg	poucos cl	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
113	positivo	únicos	neg	poucos cl	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
114	positivo	duplos/trincas	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
115	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
116	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
117	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
118	positivo	duplos	neg	poucos cl	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
119	positivo	únicos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
120	positivo	únicos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
121	positivo	únicos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	<i>C. albicans</i>
122	positivo	cachos	poucos cl	pos	pos	pos	pos	pos	<i>C. albicans</i>
123	positivo	cachos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	<i>C. albicans</i>
124	positivo	duplos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
125	positivo	alguns duplos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>

Quadro 4 - Dados referentes as Provas Fenotípicas e Genotípicas (continua)

n°	Tubo Germ	Agar Fubá/ Cl.	Agar Caseína Cl	Agar Tabaco/Cl	Franja Hifal	Agar Girasso/CL	Franja Hifal	Temperatura 45°C	PCR
126	positivo	únicos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
127	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
128	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
129	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
130	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
131	positivo	alguns duplos	poucos cl	pos	pos	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
132	positivo	únicos	neg	neg	pos	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
133	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
134	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
135	positivo	cachos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
136	positivo	únicos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
137	positivo	únicos	poucos cl	cachos	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
138	positivo	únicos	poucos cl	poucos cl	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
139	positivo	únicos	poucos cl	poucos cl	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
140	positivo	únicos	poucos cl	poucos cl	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
141	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
142	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
143	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
144	positivo	únicos	neg	pos	neg	pos	pos	pos	<i>C. albicans</i>
145	positivo	únicos	cachos	cachos	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
146	positivo	únicos	neg	cachos	neg	pos	pos	pos	<i>C. albicans</i>
147	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
148	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
148	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
150	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>

Quadro 4 - Dados referentes as Provas Fenotípicas e Genotípica (continua)

nº	Tubo Germ	Agar Fubá/ Cl.	Agar Caseína Cl	Agar Tabaco/Cl	Franja Hifal	Agar Girassol/CL	Franja Hifal	Temperatura 45°C	PCR
151	positivo	únicos	neg	poucos cl	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
152	positivo	duplos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
153	positivo	cachos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
154	positivo	cachos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
155	positivo	cachos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
156	positivo	cachos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
157	positivo	cachos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
158	positivo	únicos	neg	poucos cl	pos fraco	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
159	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
160	positivo	únicos	neg	poucos cl	pos fraco	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
161	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
162	positivo	únicos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
163	positivo	duplos/trincas	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
164	positivo	cachos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
165	positivo	únicos	neg	neg	pos fraco	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
166	positivo	alguns duplos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
167	positivo	cachos	poucos cl	poucos cl	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
168	positivo	cachos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
169	positivo	cachos	poucos cl	neg	pos	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
170	positivo	cachos	poucos cl	pos	pos	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
171	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
172	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
173	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
174	positivo	únicos	neg	neg	pos fraco	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
175	positivo	cachos	poucos cl	poucos cl	pos fraco	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>

Quadro 4 - Dados referentes as Provas Fenotípicas e Genotípica (conclusão)

nº	Tubo Germ	Agar Fubá/ Cl.	Agar Caseína Cl	Agar Tabaco/Cl	Franja Hifal	Agar Girassol/CL	Franja Hifal	Temperatura 45°C	PCR
176	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
177	positivo	cachos	poucos cl	poucos cl	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
178	positivo	cachos	poucos cl	poucos cl	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
179	positivo	cachos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
180	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
181	positivo	cachos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
182	positivo	cachos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
183	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
184	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
185	positivo	cachos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	<i>C. albicans</i>
186	positivo	duplos/trincas	pos	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
187	positivo	cachos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
188	positivo	únicos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
189	positivo	únicos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
190	positivo	cachos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
191	positivo	cachos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
192	positivo	únicos	poucos cl	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
193	positivo	cachos	cachos	cachos	pos	pos	pos	neg	<i>C. albicans</i>
194	positivo	cachos	cachos	cachos	pos	pos	pos	neg	<i>C. albicans</i>
195	positivo	duplos	neg	poucos cl	pos fraco	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
196	positivo	únicos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
197	positivo	únicos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
198	positivo	únicos	cachos	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
199	positivo	cachos	cachos	pos	pos fraco	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>
200	positivo	cachos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	<i>C. albicans</i>

Apêndice B - Dados referentes às Provas Fenotípicas e Genotípicas das amostras padrão

Padrão	*Tubo Germ	Agar Fubá/ *Cl.	Agar Caseína Cl	Agar Tabaco/Cl	Franja Hifal	Agar Girassol/CL	Franja Hifal	Temperat 45°C	*PCR
ATCC 1804	positivo	únicos	*neg	neg	neg	neg	neg	*pos	<i>C. albicans</i>
NCPF 3108	positivo	cachos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	<i>C. dubliniensis</i>

\*Tubo Germ= tubo germinativo; Cl.=clamidoconídeo; PCR= reação em cadeia da polimerase; neg= negativo; pos= positivo.

Ribeiro, PM. Identification of *Candida dubliniensis* among isolates from Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP yeasts' collection [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

### **ABSTRACT**

*The aim of the present study was to identify phenotypically and genotypically Candida dubliniensis among the isolates initially identified as Candida albicans from the yeasts' collection of the laboratory of Microbiology of Faculdade de Odontologia - UNESP/ São José dos Campos. Two-hundred of Candida gender isolates from previous works obtained patients who underwent orthotopic cardiac transplantation under immunosuppressive therapy, tuberculosis patients submitted to antibiotic therapy, HIV-patients and healthy individuals were included in the study. The samples were submitted to the following phenotypic tests: 1) germ tube formation; 2) formation and structural arrangement of chlamydospores on cornmeal agar, tobacco agar, sunflower seed agar and casein agar; 3) inability to grow at 45°C. After these tests, all of the samples were analyzed by polymerase chain reactions (PCR) that demonstrated the absence of C. dubliniensis among the analyzed isolates. The results demonstrated that: 1) all isolates were positive for germ tube formation; 2) the percentage of agreement in relation to the molecular method for each phenotypic test was respectively: on 76% cornmeal agar, 92% tobacco agar, 92.5% sunflower seed agar, 85% casein agar; 3) 86.5% inability to growth at 45°C. In conclusion, based on phenotypic characteristics, the sunflower seed agar was the more effective method for differentiation between C. albicans and C. dubliniensis; none of the phenotypic methods was 100% effective; molecular identification is necessary for definitive differentiation between C. albicans and C. dubliniensis.*

**KEYWORDS:** *Candida albicans, Candida dubliniensis, polymerase chain reaction, mouth.*