

POLYANNA NUNES HERCULANO

**PERFIL TAXONÔMICO DAS CULTURAS DE *Candida albicans*, *C. dubliniensis* E *C. stellatoidea* ESTOCADAS NA MICOTECA URM,
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.**

RECIFE - PE

2006

POLYANNA NUNES HERCULANO

**PERFIL TAXONÔMICO DAS CULTURAS DE *Candida albicans*, *C. dubliniensis* E *C. stellatoidea* ESTOCADAS NA MICOTECA URM,
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Biologia de Fungos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Fungos, na área de Microbiologia.

ORIENTADORA

Prof^a Dr^a REJANE PEREIRA NEVES

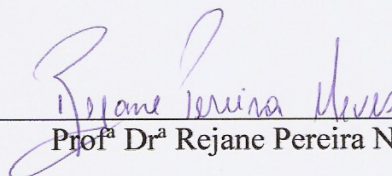
**RECIFE - PE
2006**

PERFIL TAXONÔMICO DAS CULTURAS DE *Candida albicans*, *C. dubliniensis* E *C. stellatoidea* ESTOCADAS NA MICOTECA URM, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

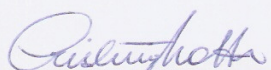
POLYANNA NUNES HERCULANO

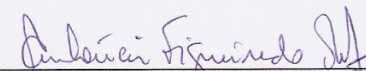
Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora:

Orientador:

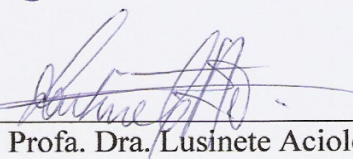

Prof.^a Dr.^a Rejane Pereira Neves

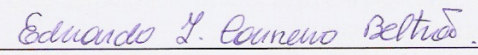
Examinadores:


Prof. Dra. Cristina Maria de Souza Motta


Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Suplentes:


Profa. Dra. Lusinete Aciole de Queiroz


Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

**Recife
2006**

“Não importa onde você parou... Em que momento da vida você cansou...
O que importa, é que sempre é possível e necessário recomeçar...
Porque somos do tamanho daquilo que vemos,
E não do tamanho da nossa altura. ”
Carlos Drummond de Andrade

DEDICO

**A Deus em primeiro lugar,
aos meus pais, Alberto e Marilúcia,**
pelo grande amor, dedicação, apoio em
mais uma vitória que é tão minha quanto deles.

OFEREÇO

**Aos meus irmãos Marcos André, Alexandre
e Katharine** pelo amor, confiança e apoio de
sempre.

A Ivone por sua dedicação integral e todo
carinho que tem por mim.

Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade oferecida na realização do Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos.

Ao Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, nas pessoas de Profa. Dra. Elza Luna Alves Lima e Profa. Dra. Cristina Maria Souza Motta.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À professora Rejane Neves, pelos valiosos ensinamentos, pela confiança, orientação, incentivo, exemplo profissional e dedicação que me oferece, e por nossa amizade que cresce a cada momento; e ainda te dizer que não acredito em acaso e se Deus te colocou na minha vida foi um presente que só a Ele posso agradecer.

À professora Cristina Motta, pelos valiosos ensinamentos, atenção, apoio e amizade que temos e foram fundamentais para a conclusão deste trabalho, também agradeço o livre acesso ao laboratório da Micoteca-URM, do qual também me sinto parte.

À professora Oliane Magalhães pela amizade, atenção e cooperação para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Mestrado em Biologia de Fungos, pelos ensinamentos que a mim possibilitaram maior conhecimento.

Aos amigos da Micoteca: Marília, Minelli, Liana, Stheffania, Herbert, Kalyni, Simone e Roberta pelo apoio, carinho, descontração e amizade de todos os momentos.

À Eliane Nogueira pelo incentivo, ensinamentos e oportunidade de saber que posso sempre contar com você seja qual for o momento.

À Emilia, Luciana, Vera Lúcia, Micheline, Eduardo, Dani, Silvia, Elvira, Ana Cristina e André pelo apoio, cooperação, incentivo, dedicação, valiosas sugestões e amizade demonstrada.

Aos amigos Natacha, André, Adriana, Bruninho, Reginaldo, Alexandre, Paulo César, Elvislene e Idalina pelo carinho, amizade e colaboração que foram constantes.

A todos os colegas de Mestrado, Felipe, Raquel, Marielle, Martha, Márcia, Tômio, Nicásio e Graziela pelos momentos que nunca serão esquecidos.

À Danielle pelo apoio, cooperação, incentivo, dedicação, valiosas sugestões e amizade demonstrada.

À minha amiga Consuelo de Souza pela sinceridade e respeito que sempre existiu em nossa amizade e que esta prevaleça em nossos caminhos.

À minha família, pela compreensão e momentos difíceis que sempre ultrapassamos juntos.

A Antônio Carlos pelo amor, paciência e confiança, sempre acompanhando com respeito, sinceridade e acreditando no meu sucesso em todos os momentos.

À minha tia Rosangela, minhas primas Tatiana e Paula, que sempre acompanharam com amor e são muito importantes em minha vida.

Minha avó Mocinha, tio Paulo e tias Célia, Lili e Teta pelo carinho e incentivo.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

A Deus por mais uma vitória na escalada de minha vida.

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1.	Culturas de <i>Candida albicans</i> procedentes da Coleção de Culturas Micoteca URM.	32
2.	Culturas de <i>Candida dubliniensis</i> procedentes da Coleção de Culturas Micoteca URM.	33
3.	Culturas de <i>Candida stellatoidea</i> procedentes da Coleção de Culturas Micoteca URM.	33
4.	Culturas de <i>Candida albicans</i>, <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. stellatoidea</i> para controle procedentes da Coleção de Culturas Micoteca URM provenientes de outras Coleções.	33
5.	Concentração das soluções-estoque e dos volumes testados dos compostos químicos utilizados para o resistograma.	38
6.	Perfis fisiológicos dos isolados de <i>Candida</i>.	45
7.	Temperatura de crescimento a 45°C dos isolados de espécies de <i>Candida</i>.	50
8.	Perfil assimilativo diferencial dos isolados de <i>Candida</i> revisados.	54
9.	Resistotipos dos isolados de <i>Candida</i>.	57
10.	Resistotipos de <i>Candida</i> em relação aos substratos.	59
11.	Detecção de atividade proteolítica dos isolados de <i>Candida albicans</i>.	61
12.	Detecção de atividade proteolítica dos isolados de <i>Candida dubliniensis</i>.	62
13.	Detecção de atividade proteolítica dos isolados de <i>Candida stellatoidea</i>.	63

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>Candida albicans</i> (3626) URM: (A) cultura preservada em óleo mineral, (B) cultura em caldo glicosado com cinco dias de crescimento e (C) cultura em ágar Sabouraud com três dias de crescimento.	41
2. Macroscopia e microscopia de <i>C. albicans</i> (A), <i>C. dubliniensis</i> (B) e <i>C. stellatoidea</i> (C) em ágar Sabouraud com extrato de levedura.	43
3. Perfis distintos dos isolados de <i>Candida</i> : A - assimilação de dextrose (D), galactose (G), maltose (M) sacarose (S) (isolado 3629); B - assimilação de D, G, M, S, lactose (L) e rafinose (R) (isolado 2253) e C - assimilação de D, G e M (isolado 6070).	44
4. Perfis fisiológicos dos testes de fermentação, produção de urease e ácido acético, representativo dos isolados de <i>Candida</i> . A- fermentação de dextrose ausente (-) e presente (+); B- teste da urease negativo (-) e C- ausência de produção de ácido acético em meio com carbonato de cálcio.	44
5. <i>Candida albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. stellatoidea</i> , respectivamente: Coleções (A:6074-Japão), (B:4803-CBS), (C:6071-IFO) e teste (A ₁ :3620-URM), (B ₁ :4127-URM) e (C ₁ :113-URM), expressando tubo germinativo em clara de ovo a 37°C, após 3 dias de incubação.	46
6. <i>Candida albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. stellatoidea</i> , respectivamente: isolado de outras Coleções (A:6074-Japão), (B:4803-CBS), (C:6071-IFO) e teste (A ₁ :3620-URM), (B ₁ :4127-URM) e (C ₁ :113-URM), expressando clamidiosporos em meio água bile de boi.	47
7. Atividade β -glicosidase expressa pelos isolados de <i>Candida</i> . Controle (A) negativo (-) e representação de positivo para comparação (+) e testes (B) negativo (1091-URM) e positivo(3620-URM).	48
8. Crescimento a temperatura ambiente (TA) e a 45°C de <i>Candida albicans</i> (A: 4986-URM), <i>C. dubliniensis</i> (B:4803-CBS) e <i>C. stellatoidea</i> (C:113-URM).	49

9. **Teste de assimilação de Dextrose (D), Arabinose (A), Glicosamina (G), Sacarose (S), Xilose (X) e Metil- α -D-glicosídeo (M) por *Candida albicans* (isolado de outras Coleções- 6073 URM, e o teste- 6076 URM). (D), (S), (X) e (M) assimilados após 3 dias de incubação.** **52**
10. **Teste de assimilação de Dextrose (D), Arabinose (A), Glicosamina (G), Sacarose (S), Xilose (X) e Metil- α -D-glicosídeo (M) por *Candida dubliniensis* (isolado de outras Coleções- 4803 URM, e o teste- 362 URM). (D), (G), (S), e (M) assimilados após 3 dias de incubação.** **53**
11. **Teste de assimilação de Dextrose (D), Arabinose (A), Glicosamina (G), Sacarose (S), Xilose (X) e Metil- α -D-glicosídeo (M), após três dias de incubação por *Candida stellatoidea* (isolado de outras Coleções- 6070 URM, e o teste- 1062 URM). (D), (X) e (M) assimilados após 3 dias de incubação.** **53**
12. **Teste de assimilação de Dextrose (D), Arabinose (A), Glicosamina (G), Sacarose (S), Xilose (X) e Metil- α -D-glicosídeo (M), após três dias de incubação por *Candida famata* - 2253 URM. Apenas a Glicosamina não foi assimilada após 3 dias de incubação.** **54**
13. **Crescimento parcial das leveduras nas diferentes concentrações dos químicos.** **56**
14. **A – Placa controle do resistograma apresentando de “a” a “u” crescimento dos isolados de *Candida*. B – Placas-teste evidenciando presença e/ou ausência de crescimento dos isolados de *Candida* frente aos compostos químicos [AB= Ácido Bórico, AC= Acrilamida, 4C= 4-Clororesorcinol, VM= Verde Malaquita, AS= Arseniato de Sódio, SC= Sulfato de Cobre].** **56**
15. **Atividade proteolítica (moderada*: A-4986, A1-1091, fraca**: B-362, B1-3719 e ausente: C-720, C1-4126) por *Candida albicans*.** **63**
16. **Atividade proteolítica (fraca: A-4822 e ausente:A1-4803) por *Candida dubliniensis*.** **64**
17. **Atividade proteolítica (moderada* A-6072, negativa** A1-1062 e fraca B-113, B1-6071) por *Candida stellatoidea*.** **64**

PERFIL TAXONÔMICO DAS CULTURAS DE *Candida albicans*, *C. dubliniensis* E *C. stellatoidea* ESTOCADAS NA MICOTECA URM, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

RESUMO

As leveduras compreendem um grupo de microrganismos com morfologia diversa. Características morfológicas e fenotípicas comuns entre algumas espécies de fungos, dificultam a taxonomia desses organismos. Espécies de *Candida* têm sido identificadas através das características morfológicas e fisiológicas. Entretanto, parâmetros como, assimilação de alguns compostos, composição da parede celular e produção de enzimas extracelulares podem variar amplamente entre algumas espécies. Este trabalho teve como objetivos confirmar a classificação taxonômica, testar a resistência a compostos químicos e verificar a atividade proteolítica de amostras de *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*, estocadas na Micoteca URM, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco. Para a confirmação taxonômica foram realizados os testes para verificação das características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas. A viabilidade das culturas e preservação das características típicas das espécies, mantidas por até 51 anos foi verificada nos 56 isolados. As características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas confirmaram o gênero, não ocorrendo o mesmo em relação às espécies. Dentre os isolados, foram obtidos 29 diferentes resistotipos. Em relação à diferenciação entre os isolados, todos foram sensíveis ao verde malaquita e resistentes ao 4-clororesorcinol. Foi possível verificar que isolados de diferentes espécies de *Candida*, bem como de mesma espécie podem expressar variabilidade, permitindo a detecção dos diferentes resistotipos. Entre os isolados de *Candida*, a zona de atividade proteolítica variou de moderada (64%) a ausente (36%).

Palavras-chave: *Candida*, viabilidade, confirmação taxonômica, resistograma, atividade proteolítica.

TAXONOMIC PROFILE OF *Candida albicans*, *C. dubliniensis* AND *C. stellatoidea* CULTURES MAINTAINED AT URM CULTURE COLLECTION, FEDERAL UNIVERSITY OF PERNAMBUCO.

ABSTRACT

Yeasts consist of a microorganism group with diverse morphology. Similar morphologic and phenotypic characteristics between some fungi difficult the taxonomy of these organisms. *Candida* species have been identified through morphologic and physiologic characteristics. However, parameters such as assimilation of some composts, cell wall composition and production of extra cellular enzymes may vary between some species. The aims of this research were to confirm taxonomic classification, test the resistance to chemical composts and verify proteolytic activity of *Candida albicans*, *C. dubliniensis* and *C. stellatoidea* cultures maintained at URM Culture Collection, Mycology Department, Federal University of Pernambuco. Tests were conducted to confirm taxonomy through macroscopic, microscopic and physiologic characteristics. The viability of the cultures and preservation of typical characteristics of the species, maintained for 51 years, were verified on 56 isolates. Macroscopic, microscopic and physiologic characteristics confirm the genera but not the species. 29 different resistotypes were obtained among the isolates. About the differentiation of the isolates, all of them were sensitive to malaquite green and resistant to 4-clororesorcinol. The tests permitted to verify that isolates from different and similar *Candida* species can express variability, through the detection of different resistotypes. Among *Candida* isolates the proteolytic activity varies from moderate (64%) to absent (36%).

Key words: *Candida*, viability, taxonomic confirmation, resistogram, proteolytic activity.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
	2.1 Geral	17
	2.2 Específicos	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
	3.1 Coleção de cultura	18
	3.2 Reativação de culturas de fungos preservadas	20
	3.3 Características taxonômicas	20
	3.3.1 Tubo Germinativo	22
	3.3.2 Clamidosporo	23
	3.3.3 β -glicosidase	23
	3.3.4 Temperatura de crescimento a 45°C	24
	3.4 Resistograma	24
	3.5 Atividade Proteolítica	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
	4.1 Amostras de <i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout, <i>C. dubliniensis</i> Sullivan e <i>C. stellatoidea</i> Jones et Martin	31
	4.2 Viabilidade das Amostras e Revisão Taxonômica	34
	4.2.1 Meios de Cultura para Verificação da Viabilidade e Revisão Taxonômica	34
	4.3 Testes de Diferenciação dos Isolados de Leveduras	35
	4.3.1 Prova do tubo germinativo	36
	4.3.2 Produção de clamidosporo	36
	4.3.3 Atividade da β -glicosidase	36

4.3.4	Temperatura de crescimento a 45°C	36
4.3.5	Testes de assimilação (SULLIVAN et al., 1995)	37
4.3.6	Meios de Cultura para os Testes Diferenciais	37
4.4	Resistência a Compostos Químicos	37
4.4.1	Compostos Químicos	38
4.4.2	Preparo dos Inóculos	38
4.4.3	Teste do Resistograma	39
4.4.4	Avaliação dos Resultados	39
4.4.5	Meios de Cultura Utilizados para o Resistograma	39
4.5	Caracterização Enzimática das Leveduras	39
4.5.1	Meio de Cultura para Detecção de Atividade Proteolítica	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Viabilidade e revisão taxonômica das culturas de <i>Candida albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. stellatoidea</i> .	41
5.2	Perfil diferencial dos isolados de <i>Candida albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. stellatoidea</i> .	46
5.2.1	Produção de Tubo Germinativo	46
5.2.2	Produção de clamidosporo	47
5.2.3	Atividade da β -glicosidase	48
5.2.4	Temperatura de crescimento	49
5.2.5	Perfil assimilativo diferencial	51
5.3	Resistência a compostos químicos (Resistograma)	55
5.4	Detecção de Atividade Proteolítica	60
6	CONCLUSÕES	65
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos mudanças taxonômicas têm sido propostas como subsídio para classificar os fungos, incluindo as leveduras, que são unicelulares e se reproduzem assexuadamente por brotação e/ou fissão (SULLIVAN et al., 1995; SULLIVAN; COLEMAN, 1998; ALVES et al., 2000, SIDRIM; ROCHA, 2004).

As leveduras compreendem um grupo de microrganismos com morfologia diversa incluídas em vários gêneros de fungos perfeitos e imperfeitos, como as filamentosas anascógenas pertencentes a espécies de *Candida* principalmente de interesse médico, como *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* (DIDDENS; LODDER, 1942; SULLIVAN et al., 1999; LACAZ et al., 2002).

Características morfológicas e fenotípicas comuns entre algumas espécies de fungos, dificultam a taxonomia desses organismos, uma vez que a maioria das leveduras produz blastoconídios isolados e em cadeias, constituindo pseudomicélio. Espécies de *Candida* têm sido identificadas através das características morfológicas e fisiológicas. Entretanto, parâmetros como, assimilação de alguns compostos, composição da parede celular e produção de enzimas extracelulares podem variar amplamente entre algumas espécies (SULLIVAN et al., 1995; SULLIVAN; COLEMAN, 1998; ALVES et al., 2000; SIDRIM; ROCHA, 2004). Como em *C. albicans* e *C. stellatoidea* que apresentam características morfológicas e bioquímicas semelhantes, com exceção da sacarose que não é assimilada por esta última e devido a esta similaridade são consideradas sinônimos (SULLIVAN et al., 1995; LACAZ et al., 2002).

O estágio inicial da formação da hifa pelo blastoconídio é denominado tubo germinativo, que observado juntamente com a presença de clamidosporo, os quais diferem na quantidade e no arranjo das células, na expressão de atividade β -glicosidase e proteinase, e na assimilação de algumas fontes como sacarose, xilose, glucosamina entre outras, determinam critérios de caracterização para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002).

Para determinar e fortalecer a distinção entre isolados de uma mesma espécie, pode ser utilizado o resistograma ou resistotipagem. Este método foi proposto por

McCreight; Warnock (1982), o qual fornece a distinção entre isolados de *C. albicans*, de acordo com as diferenças de resistência a alguns compostos químicos.

Considerando que *C. albicans* e *C. dubliniensis* são espécies de importância médica, a detecção da atividade proteolítica expressa uma prova para caracterizar ou identificar amostras patogênicas.

A protease ácida apresenta peso molecular de 43kDa, atua no processo de adesão às células iniciando sua atividade patogênica, é possível que colabore na invasão fúngica e diferencia amostras comensais das realmente patogênicas (STAIB, 1965; ALMEIDA, 1991; FUKAZAWA; KAGAYA, 1997; LACAZ et al., 2002).

Considerável progresso tem sido alcançado no estudo dos fatores que contribuem para a patogenicidade dos fungos. Dentre os vários fatores envolvidos na patogenicidade e virulência dos fungos, a variabilidade fenotípica, sorotipo, produção de enzimas, toxinas e a capacidade de crescer a 37°C estão entre os mais frequentemente citados (RIPPON, 1982; GALLAGHER et al., 1992; KWON-CHUNG; BENETT, 1992; HANEL et al., 1995; LACAZ et al., 2002).

A atualização taxonômica e caracterização de fungos são importantes para o conhecimento e diferenciação entre isolados de uma mesma espécie, bem como de espécies diferentes, tornando-se relevante o estudo de isolados depositados em Coleções de Culturas.

A Coleção de Culturas do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, registrada no Commonwealth Mycological Institute (CMI) sob a sigla URM e na World Federation of Culture Collections sob o número 604, está citada em vários catálogos, destacando-se a ATCC (American Type Culture Collection, Washington, USA), IFO (Institute for Fermentation, Osaka, Japão) e WFCC (World Directory of Collections of Cultures of Microorganisms, Japão) (CAVALCANTI et al., 1996). Desta forma, os isolados de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* estocados na Coleção de Culturas Micoteca-URM, são essenciais em diversas pesquisas, gerando um suporte para os estudos, especialmente na área médica e biotecnológica.

2 OBJETIVOS

2.1 – Geral

Confirmar a classificação taxonômica, testar quanto à resistência a compostos químicos e avaliar a atividade proteolítica de amostras de leveduras registradas como *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*, na Micoteca URM.

2.2 – Específicos

- Verificar a viabilidade dos isolados de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* estocados na Micoteca URM;
- Revisar e atualizar taxonomicamente os isolados de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* da Micoteca URM;
- Verificar a resistência dos isolados de *Candida* aos compostos químicos: ácido bórico, acrilamida, 4-clororesorcinol, verde malaquita, arseniato de sódio e sulfato de cobre;
- Correlacionar o perfil de resistência aos compostos químicos e as espécies de *Candida* da Micoteca URM;
- Verificar a atividade proteolítica dos isolados de *Candida*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Coleção de cultura

Haynes et al. (1955) afirmam que culturas de fungos são essenciais nos estudos taxonômicos e comparativos entre isolados intra e interespecíficos, nos ensaios sobre a qualidade, potência e segurança de muitos produtos usados no diagnóstico e tratamento de micoses, na produção de alimentos, fármacos e químicos. Porém, segundo Heckly (1978), para o desenvolvimento de todas essas atividades, é necessária a preservação de culturas em bom estado de conservação.

Segundo Smith e Onions (1983) o principal objetivo de uma coleção de culturas de fungos é mantê-las viáveis e sem mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas. A caracterização e a atualização taxonômica de fungos são fundamentais para o conhecimento e diferenciação dos mesmos, tornando-se relevante o estudo de isolados depositados em Coleções de Culturas, tendo a manutenção dessas coleções adquirido importância cada vez maior.

As coleções de culturas de microrganismos têm assumido papel importante no desenvolvimento de insumos biotecnológicos, seja agrícola, farmacêutico, industrial ou biológico, por serem o depósito para preservação e manutenção de suas características (CAVALCANTI et al., 1996).

Segundo Hawksworth e Kirsop (1998); Kirsop e Kurtzman (1998), culturas de leveduras e fungos filamentosos estocadas, representam elementos fundamentais em diversas pesquisas, tanto na ciência pura quanto aplicada.

A *American Type Culture Collection* (ATCC) USA, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) Alemanha e o *Institute for Fermentation* (IFO) Osaka, são algumas coleções de culturas que estocam isolados caracterizados sob diversos aspectos. A ATCC, referência mundial, foi fundada em 1925, quando um comitê de cientistas reconheceu a necessidade de uma coleção central de microrganismos, a qual serviria aos cientistas de qualquer parte do mundo. Assim, tem a missão de adquirir, autenticar, preservar, desenvolver e distribuir materiais biológicos, tecnologia para o avanço, validação e aplicação do conhecimento científico (ATCC, 2005).

O *Institute for Fermentation, Osaka* (IFO) é uma organização sem fins lucrativos formada em 1944. Seus objetivos incluem a obtenção, preservação e distribuição de autênticas culturas de microrganismos, importantes para estudos científicos e tecnológicos (IFO, 2005).

A *World Federation of Culture Collections* (WFCC) tem a responsabilidade de promoção e desenvolvimento de coleções de culturas de microrganismos e de células. Desta forma, tem um interesse constante sobre todos os aspectos da atividade da coleção e, em particular, com o propósito de incentivar e melhorar os padrões dos serviços científicos fornecidos à comunidade internacional (WFCC, 2005).

Existem no mundo aproximadamente 508 coleções de culturas em 66 países, preservando cerca de 1.152.175 culturas, sendo 460.263 de bactérias, 381.519 de fungos, 15.248 de vírus, 10.520 de células animais e vegetais e 284.625 de outros Reinos microbianos. No Brasil são preservados em torno de 35.400 culturas em 48 coleções distribuídas no Sudeste (78,4%), Nordeste (8,1%), Norte (5,4%), Centro-oeste (5,4%) e Sul (2,7%), sendo que destas uma é exclusiva para algas, duas para protozoários, oito para fungos, onze para bactérias, uma preserva bactérias e protozoários, dez preservam bactérias e fungos, uma preserva bactérias, protozoários e algas, e três coleções não divulgarão quais os microrganismos estocados. São preservadas no Brasil cerca de 16.148 culturas de fungos e 15.395 de bactérias. O Nordeste preserva cerca de 35% de fungos do Brasil, sendo que a coleção de culturas de fungos - Micoteca URM é a de maior representatividade (WFCC, 2005; WDCM, 2006).

A Micoteca URM detém o maior número de culturas de fungos no Brasil e os métodos utilizados para sua preservação incluem óleo mineral (SHERF, 1943), água destilada (CASTELLANI, 1967) e liofilização (RAPER; ALEXANDER, 1945). Atualmente constam na coleção aproximadamente 8000 culturas de fungos de diferentes grupos taxonômicos, incluindo leveduras e fungos filamentosos, sendo essencial à verificação constante da viabilidade e das características taxonômicas das espécies (CAVALCANTI et al., 1996; WFCC, 2005).

3.2 Reativação de culturas de fungos preservadas

Calich et al. (1978) e Rojas Pedral (1983), consideram que para indicar a viabilidade de células fúngicas, pode-se utilizar o método da fluorocromasia, baseado nas observações onde somente células vivas acumulam o diacetato de fluoroceína.

Corrêa (1984) aplicou o método do diacetato de fluoroceína mais brometo de etídio para verificar a viabilidade de *C. albicans*, mostrando a eficiência desse processo no estudo dessas leveduras. Em 1988, este pesquisador padronizou o método de fluorescência, para análise de viabilidade de células fúngicas leveduriformes, em 223 amostras obtidas de espécimes clínicos, provenientes de casos de micoses e a partir de inoculações experimentais.

A viabilidade de 150 amostras de fungos foi verificada por Corrêa et al. (1989) provenientes de variados substratos. O tempo considerado ideal do contato entre as células e os corantes (diacetato de fluoroceína e brometo de etídio) foi de 30 minutos, verificando perfeita diferenciação entre os microrganismos viáveis (apresentando fluorescência verde) e não viáveis (fluorescência vermelha). O referido autor após a determinação de viabilidade por diferentes métodos, concluiu que os resultados obtidos pelo exame direto clássico, cultivo e método fluorescente foram estatisticamente concordantes, apresentando este último um limiar de detecção superior ao do cultivo.

Chaves et al. (2003) estudaram a viabilidade de 15 isolados de leveduras da Coleção de Cultura – Micoteca URM, do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco e mantidos sob óleo mineral por até 44 anos. O teste foi realizado através do crescimento em meio caldo glicosado. Os autores verificaram que todos os isolados estavam viáveis a partir do referido meio e com suas características taxonômicas mantidas.

3.3 Características taxonômicas

Em 1936, Negroni descreve sua primeira observação quanto à variação da morfologia de lisa-rugosa na colônia de *C. albicans* (Robin) Berkhout, 1923. Em 1968, Brown-Thomsen estudou características variáveis importantes nas colônias desta espécie, padronizou condições fisiológicas e descreveu diferentes aspectos morfológicos.

Subseqüentemente, Phongpaichit et al. em 1987 ampliaram mais detalhadamente o sistema para morfotipagem de amostras dessa espécie.

Vários autores afirmam que na taxonomia dos fungos, semelhanças fenotípicas, fisiológicas, composição da parede celular e produção de enzimas extracelulares, variam amplamente entre os diferentes isolados de uma mesma espécie, gerando dificuldade na classificação das leveduras (WILLIAMSON et al., 1986; ODDS, 1988; GHANNOUM et al., 1990; SULLIVAN et al., 1995; FOONGLADDA et al., 2002).

Segundo Rippon (1982), aspectos morfológicos, habilidade de formar tubo germinativo, excreção de proteinases entre outros fatores continuam sendo avaliados em espécies de *Candida* como características taxonômicas e de patogenicidade.

A semelhança taxonômica entre *C. albicans* e *C. stellatoidea* Jones et Martin (1938), fez com que várias pesquisas fossem realizadas e esta última é considerada por alguns autores uma variante, e por outros uma sinonímia de *C. albicans* por apresentar às mesmas características morfofisiológicas exceto na assimilação da sacarose (BARNNET et al., 1990; SULLIVAN et al., 1995).

Kwon-Chung e Bennett (1992) relatam que *C. albicans* é uma levedura com notável índice de variação fenotípica e genotípica, dando origem a biotipos diversos.

Desde a década de 30, testes de assimilação e fermentação têm sido utilizados na identificação de leveduras; contudo formação de tubo germinativo e clamidosporo são características diferenciais entre *C. albicans* e outras espécies de *Candida*. Como um microrganismo polimórfico, esta espécie pode formar células esféricas e produzir filamentos os quais podem se desenvolver em pseudo-hifas ou hifas verdadeiras (SULLIVAN et al., 1995; KOBAYASHI; CUTLER, 1998).

Em 1995, Sullivan e colaboradores, verificaram características atípicas em isolados de *Candida* associados a casos de candidíase oral, de indivíduos HIV positivos em Dublin na Irlanda. Os referidos autores propuseram uma nova espécie denominada *C. dubliniensis*. Esta espécie tem sido relatada em diversos países e, devido às peculiaridades que a envolvem, como assimilação de alguns compostos, produção de tubo germinativo, clamidosporo, expressão enzimática, temperatura de crescimento a 37°C, filamentação em soro a 37°C e biologia molecular, seu reconhecimento e identificação merecem cuidadosa atenção, para diferenciação com *C. albicans* (SULLIVAN et al., 1995; SULLIVAN et al.,

1997; SULLIVAN; COLEMAN, 1998; SULLIVAN et al., 1999; ALVES et al., 2000; SANT'ANA et al., 2003).

3.3.1 Tubo Germinativo

A formação de tubo germinativo em células de *C. albicans* pode ser considerada como um rápido e relativamente simples modelo de morfogênese. Um dos métodos mais simples de se induzir a formação de tubo germinativo seguido por extenso crescimento hifal é a exposição das células de levedura ao N-acetil-D-glicosamina a 37°C. Este nutriente é utilizado como fonte de carbono por muitas leveduras, e pode ser metabolizado por esta espécie induzindo o crescimento na forma de levedura ou pseudomicélio (MATTIA et al., 1982).

Mattia et al. (1982) verificaram que apenas alguns isolados mostraram capacidade de formar tubo germinativo na presença de N-acetil-D-glicosamina e mencionaram que a grande maioria dos isolados formou tubo germinativo em meios complexos como soro ou na mistura soro-N-acetil-D-glicosamina. Desta forma, consideraram a possibilidade de um controle genético e propriedades fisiológicas para o aparecimento ocasional de variantes não-germinantes de *C. albicans*.

De acordo com os trabalhos de De Bernardis et al. (1993) e Wellmer e Bernhardt (1997) a formação do tubo germinativo parece contribuir para o estabelecimento de modelos de virulência. Kretschmar et al. (1999), para investigar a contribuição do tubo germinativo no dano do tecido, correlacionaram a profundidade de invasão do tecido determinando o comprimento do tubo germinativo da levedura. Entretanto, outros pesquisadores consideram a formação do tubo germinativo como critério taxonômico (LODDER, 1970; BARNETT et al., 1990; HOOG; GUARRO, 2000; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Segundo De Bernardis et al. (1993), variantes não-germinativas de *C. albicans* as quais expressam baixa virulência em infecção sistêmica também se mostraram incapazes em causar infecção vaginal. Adicionalmente, Odds (1994) afirma que durante o estágio de tubo germinativo nestes microrganismos verifica-se a capacidade de penetração através da membrana plasmática das células epiteliais testadas.

3.3.2 Clamidosporo

Nakamoto (1998) estudou a relação existente entre a concentração do inóculo e a formação de clamidosporos para identificação de *C. albicans*, e verificou que esta estrutura pode ser induzida tanto em ágar *cornmeal*, quanto em meio líquido suplementado com leite ou soro, e que a melhor concentração para a formação abundante de clamidosporo é de 10^5 cels/ ml, e 27°C a temperatura ideal.

Staib e Arastéh (2001), observaram a formação abundante de clamidosporos, em ágar Staib, um meio diferencial e de eficiente diagnóstico, geralmente utilizado na identificação de *Cryptococcus* e atualmente *C. dubliniensis*.

Al-Hedaithy e Fotedar (2002) verificaram em um período de 31 anos a capacidade de 3525 amostras atípicas de *C. albicans* em produzir clamidosporo em ágar *cornmeal*. As culturas foram provenientes de material clínico, porém não foram capazes de produzir esta estrutura. Todos os isolados também foram estudados em relação aos seus biotipos, sorotipos, produção de proteinase extracelular e susceptibilidade antifúngica e apresentaram de alta a moderada atividade proteolítica.

3.3.3 β -glicosidase

Roman e Sicillia (1983); Williamson et al. (1986) não detectaram atividade β -glicosidase ao analisarem 339 isolados de *C. albicans*. Em contraste, Polacheck et al. (1987) verificaram esta atividade enzimática através de teste comercial (API ZYM e Yeast Ident Systems) em 20 isolados desta espécie, selecionados aleatoriamente. Os autores concluíram que β -glicosidase de *C. albicans* encontra-se aparentemente localizada no citoplasma. De acordo com Notario (1982) e Ram et al. (1984) a atividade desta enzima ocorre intracelularmente. Estes verificaram que 91% da atividade ocorreu no citoplasma e que o ótimo desta enzima pode ser detectado durante a fase exponencial de crescimento.

Williamson et al. (1986) citam a atividade da β -glicosidase na diferenciação de biotipos de *C. albicans* e mais recentemente, na identificação de leveduras de importância médica.

Polacheck et al. (1987) afirmam que a avaliação da atividade da β -glicosidase é observada por liberação enzimática de grupos cromogênicos a partir de um substrato incolor, e que testes enzimáticos independem do crescimento da levedura, estando

pouco sujeitos a erros interpretativos, permitindo uma rápida identificação se comparados aos métodos tradicionais de assimilação de fontes de carbono.

O perfil enzimático de *C. dubliniensis* destaca-se por sua incapacidade de expressar atividade β -glicosidase, o que é evidenciado em todas as amostras de *C. albicans*. Por outro lado, *C. dubliniensis* expressa intensa atividade de proteinase extracelular, se comparada com *C. albicans* (SULLIVAN et al., 1995; SULLIVAN et al., 1997; SULLIVAN; COLEMAN, 1998; SULLIVAN et al., 1999; ALVES et al., 2000; SANT'ANA et al., 2003).

3.3.4 Temperatura de crescimento a 45°C

A incapacidade de crescimento de *C. dubliniensis* a 45°C foi inicialmente observada por vários autores, embora a maioria dos isolados de *C. albicans* e *C. stellatoidea* se desenvolvam bem nesta temperatura, alguns isolados podem ser incapazes de crescer. Sendo considerada a necessidade de provas complementares, como assimilação de sacarose e xilose as fontes mais utilizadas para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* (SULLIVAN et al., 1995; SULLIVAN et al., 1997; SULLIVAN; COLEMAN, 1998; SULLIVAN et al., 1999; ALVES et al., 2000; SANT'ANA et al., 2003).

Diversos pesquisadores consideram que *C. dubliniensis* é uma espécie recém-caracterizada e cuja identificação requer vários procedimentos incluindo capacidade de assimilar glicosamina e não assimilar xilose, lactato e ainda não apresentar atividade β -glicosidase (SULLIVAN et al., 1995; SULLIVAN et al., 1997; SULLIVAN; COLEMAN, 1998; SULLIVAN et al., 1999; ALVES et al., 2000).

Pinjón et al. (1998) propõem que todas as amostras incapazes de crescer a 45°C sejam estudadas em relação à assimilação da sacarose, uma vez que *C. stellatoidea* não assimila esta fonte, ao contrário de *C. dubliniensis*.

3.4 Resistograma

Métodos de diferenciação de amostras foram estabelecidos para bactérias patógenas. Muitos destes dependem da diferenciação sorológica das amostras, todavia

outras técnicas como morfotipagem e biotipagem têm sido propostas (WARNOCK et al., 1979).

O primeiro sistema para diferenciação de amostras de *C. albicans*: foi o método do “Resistograma” proposto em 1979 por Warnock e colaboradores, o qual apresenta como princípio a variação de resistência a compostos químicos, existente entre amostras de *C. albicans*, verificado através da habilidade dos isolados crescerem em meio sólido contendo diferentes concentrações de inibidores químicos orgânicos e inorgânicos (ODDS; ABBOTT, 1980; MCCREIGHT; WARNOCK, 1982; KHAN et al., 2003).

Elek e Higney (1970) descreveram pela primeira vez o método do resistograma, instituído para distinguir isolados de *Escherichia coli*. Posteriormente Elek et al. (1973) aplicaram para isolados de *Shigella sonnei*, Kashbur et al. (1974) para *Proteus mirabilis* e Elek e Moryson (1974) utilizaram para *Staphylococcus aureus*. Em 1979, Warnock et al. utilizaram este método para distinguir isolados de *C. albicans* e relataram a caracterização de culturas desta espécie obtidas da vagina, reto e fezes provenientes de pacientes em tratamento de infecção vaginal. Os isolados apresentaram o mesmo resistotipo, tanto nos diferentes espécimes clínicos quanto em diferentes ocasiões, em um mesmo paciente. Também foi verificada a ocorrência de dois diferentes resistotipos de *C. albicans* nos espécimes clínicos de outros pacientes.

Foi realizada por Warnock et al. (1979) a caracterização de 420 isolados de *C. albicans* obtidos de 30 pacientes em tratamento de vulvovaginite. Destas, 16 mulheres estavam colonizadas ou infectadas com um único resistotipo. O mesmo isolado foi obtido após múltiplas culturas e o trato vaginal foi recolonizado ou infectado com o mesmo isolado do trato intestinal. Similarmente, parceiros sexuais de sete pacientes estavam colonizados pelo mesmo resistotipo.

McCreight e Warnock, em 1982, propuseram modificações no método do resistograma, utilizando amostras de *C. albicans* obtidas da cavidade oral de pacientes sãos, em que os químicos originais, acrilamida, arsenato de sódio, verde malaquita, 4-clororesorcinol e sulfato de cobre, foram substituídos e apenas o ácido bórico foi mantido, o método de preparação do inóculos foi revisado, a fim de se obter isolados mais homogêneos, e a forma de interpretação dos resultados foi simplificada.

Meinhof (1982) estudou a epidemiologia da candidíase vaginal com um sistema de resistograma modificado, suplementado pela atividade proteásica, atividade lipásica e sensibilidade a 5-fluorocitosina. Isolados de *C. albicans* provenientes de fezes, secreção oral, anal e vaginal de 134 mulheres foram submetidos à diferenciação. Foi possível verificar que mais de 70% dos isolados do trato genital foram idênticos àqueles isolados obtidos das amostras orais ou intestinais obtidos do mesmo indivíduo, sugerindo tratar-se da mesma levedura.

McCreight et al. (1984) caracterizaram 41 isolados de *C. albicans* provenientes de 22 pacientes apresentando estomatite cremosa. Foram utilizados na caracterização cinco compostos químicos, selenato de sódio, ácido bórico, cetrimida, periodato de sódio e nitrato de prata, e obtidos 18 resistotipos. Os autores mencionam 12 resistotipos similares, porém encontrados em outra pesquisa por McCreight e Warnock (1982), na cavidade oral de indivíduos saudáveis. Considerando A--D-, o resistotipo prevalente em indivíduos apresentando estomatite e indivíduos saudáveis, puderam concluir que não há dados suficientes para afirmar que este apresente maior virulência e capacidade de aderência do que os outros resistotipos.

Em 1985, McCreight et al. aplicaram o método do resistograma a isolados de *C. albicans* da mucosa oral e pele de pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de tumor oral e de laringe, a fim de determinar se os isolados encontrados nos diferentes sítios corporais eram similares. Desta forma, 25 dos 27 pacientes estudados carregavam um ou mais isolados com resistotipos idênticos tanto na cavidade oral quanto em sítio cutâneo em tratamento por radioterapia. Os autores consideraram que, provavelmente, a cavidade oral é a fonte para a subsequente colonização cutânea pela levedura.

Ghannoum et al. (1985) utilizaram a resistotipagem para investigar especificamente quais isolados de *C. albicans* da mucosa oral são mais frequentemente associados com pacientes com câncer em tratamento por quimioterapia ou radioterapia em relação aos provenientes de indivíduos saudáveis. Foram obtidos, em cultura da secreção oral de pacientes com câncer, 44 isolados, os quais foram comparados com dez isolados provenientes de indivíduos saudáveis (controles). Dois resistotipos predominaram e estavam igualmente distribuídos dentre os grupos estudados. Os autores concluíram que um mesmo resistotipo pode ocorrer tanto em indivíduos doentes quanto saudáveis.

Phelps et al. (1986) realizaram um estudo sobre infecções por *Candida* envolvendo 12 neonatos em uma unidade de tratamento intensivo neonatal. A investigação da colonização por *C. albicans* de todos os bebês na unidade foi realizada junto com amostras do ambiente e mãos dos profissionais que os assistiam. A tipagem pelo método do resistograma indicou a presença de muitos isolados semelhantes, sugestivo de ocorrência de infecção cruzada. De acordo com os autores, a transmissão foi possível através do contato direto com os recém-nascidos, porém a terapia com múltiplos antibióticos pode ter contribuído para a elevada incidência de infecção nessa unidade.

Hunter e Fraser (1987) realizaram o método do resistograma para conhecer melhor a epidemiologia da vaginite por *C. albicans*, destacando a importância do trato intestinal como reservatório da levedura. Durante o período de Junho a Setembro de 1986, 300 amostras de fezes provenientes de pacientes de uma mesma área geográfica da Inglaterra, foram processadas e 109 isolados de *C. albicans* foram obtidos. Do mesmo modo, 90 culturas se desenvolveram a partir de *swabs* vaginais de pacientes com vaginite. Após a caracterização, concluíram que não foram encontradas diferenças significativas entre a incidência de resistotipos com relação aos substratos utilizados, demonstrando que provavelmente um resistotipo não é mais virulento que outro e que todos os isolados encontrados colonizando o intestino humano são potencialmente capazes de colonizar e infectar o trato genital.

Avaliação de acordo com a reprodutibilidade e o poder de discriminação foi realizada por Hunter e Fraser (1989), através de quatro métodos para diferenciação de isolados de *C. albicans* (resistotipagem, morfotipagem, produção de enzimas e assimilação de fontes de carbono) sendo possível concluir que a resistotipagem apresentou a melhor combinação de discriminação e reprodutibilidade dentre os métodos analisados.

Para investigar a ocorrência de infecção cruzada entre 63 pacientes internados numa unidade de terapia intensiva e enfermeiros, Hunter et al. (1990) caracterizaram isolados de *C. albicans* por morfotipagem e resistotipagem. Num período de quatro meses, coletas com *swabs* foram realizadas de diversas regiões do corpo e sempre que possível foram realizadas coletas simultâneas do enfermeiro responsável pelo paciente. Em 12 das 19 ocasiões em que tanto a enfermeira quanto seu paciente apresentaram cultura de *C. albicans* positiva, os isolados eram indistinguíveis. Puderam concluir que a infecção

cruzada ocorreu na unidade de terapia intensiva e pelo menos uma das rotas de contaminação foi o contato direto do paciente com os profissionais da enfermagem.

Hunter (1995) reproduziu o método do resistograma para caracterizar 106 isolados de *C. albicans* provenientes de infecções superficiais ou profundas, e com base em análises estatísticas observou diferenças significativas entre os dois grupos de isolados, mas não ficou claro se representam linhagens diferentes ou se as ocorreram devido à influência do substrato de origem.

Nakamura et al. (1998), realizaram a resistência a compostos químicos em isolados de *C. albicans* de mucosa oral de 22 pacientes jovens do sexo feminino, sem infecção prévia e coletados em triplicata, obtendo 66 culturas. As culturas de sete pacientes apresentaram o mesmo resistotipo em cada uma das coletas, seis mostraram o mesmo duas vezes e para nove houve crescimento de três diferentes resistotipos. Segundo os autores, mudanças nos biotipos dos isolados orais de *C. albicans* não são freqüentes, mas podem ocorrer em indivíduos normais. Foi ressaltado, ainda, que maiores estudos são necessários para definir se tais mudanças são devido à substituição dos isolados iniciais ou ocorre por variações de suas características fisiológicas. Ainda de acordo com o estudo, é importante conhecer o biotipo de isolados invasivos não somente a respeito da epidemiologia, mas também para a patogênese da candidíase.

Abu-Elteen (2000) realizou a diferenciação de 66 isolados clínicos de *C. albicans* obtido de pacientes com dentes naturais e de pacientes que faziam uso de dentaduras postizas. O resistograma baseou-se nas diferenças de resistência dos isolados a compostos químicos selecionados (selenito de sódio, ácido bórico, certimida, periodato de sódio e nitrato de prata). Foram obtidos 14 diferentes resistotipos, tendo os resultados demonstrado que não há correlação entre os grupos de indivíduos com e sem dentadura artificial e os isolados de *C. albicans* obtidos, não sendo possível indicar virulência através do resistograma.

Khan et al. (2003) desenvolveram um trabalho, no período de oito meses, para investigar o contágio de *C. albicans* entre pacientes e profissionais de enfermagem de um centro de terapia intensiva aplicando dois métodos de caracterização, o resistograma e a morfotipagem. Foram realizadas coletas com *swabs* semanalmente de várias regiões do corpo de pacientes internados e sem infecção por *Candida* no momento da primeira coleta.

Os profissionais foram submetidos a coletas quinzenais da cavidade oral, interdental das mãos, além do ambiente. Foram isoladas 326 leveduras dos pacientes, sendo 269 (82.5%) identificadas como *C. albicans*. Do outro grupo, obteve-se 16 isolados de *C. albicans*. De acordo com Khan e colaboradores, o raro isolamento de *C. albicans* do ambiente indica que a forma mais provável de infecção exógena ocorre devido à transmissão através das mãos dos profissionais.

De acordo com Hunter e Fraser (1989), a melhor forma de caracterização de *C. albicans* combina morfotipagem das colônias com a resistotipagem ou susceptibilidade a drogas antifúngicas.

3.5 Atividade Proteolítica

Staib em 1965 foi o primeiro a relatar atividade proteolítica extracelular em *C. albicans* (AOKI et al., 1994).

Proteinases secretadas também apresentam um importante papel durante as infecções por *C. albicans*, como demonstrado em estudos através de modelos de aderência de *C. albicans* à mucosa humana, bem como no poder de disseminação desta espécie após ruptura provocada de barreira de proteção tecidual (BORG; RUCHEL, 1988; KRETSCHMAR et al., 1999).

Proteases extracelulares de fungos sapróbios tais como *Aspergillus niger* ou *Neurospora crassa* são secretadas primariamente para garantir nutrientes para as células; entretanto, fungos patogênicos se adaptam bioquimicamente garantindo sucesso durante o processo infeccioso, facilitando a adesão e invasão do tecido, em plantas e insetos, ou danificando células e moléculas do sistema imune do hospedeiro a fim de evitar ou resistir ao ataque antimicrobiano pelo hospedeiro (NAGLIK et al., 2003).

Schaller et al. (2005) explorando a resposta do hospedeiro durante infecções de mucosas através de análises da expressão de citocina em células epiteliais estimuladas por *C. albicans*, verificaram que as proteases apresentam-se como importantes fatores de virulência de *C. albicans* durante infecções disseminadas e de mucosa, podendo contribuir para a indução na resposta imune inflamatória do hospedeiro. Segundo esses autores esta enzima é capaz de causar danos teciduais relacionados com uma resposta

epitélio-induzida pro-inflamatória por citocina, a qual pode ser crucial no controle e tratamento de infecções por *C. albicans*.

Entretanto, não está claro quais fatores podem afetar diretamente a resposta imune epitelial do hospedeiro e se fatores de virulência específicos como as proteases secretadas por *C. albicans* podem contribuir para o desenvolvimento da reação inflamatória no sítio de infecção (SCHALLER et al., 2005).

Kantarcioglu e Yucel (2002) verificaram a atividade fosfolipásica e proteásica em 95 isolados de várias espécies de *Candida*, e observaram que 59 (62.1%) foram fosfolipase positiva e 75 (78.9%) foram protease positiva, dentre elas, as culturas de *C. albicans* apresentaram 56 (93.3%) de atividade fosfolipásica e 57 (95%) de atividade proteásica.

Ruchel et al. (1982), compararam a secreção de proteinases em 103 culturas diferentes de *C. albicans*, obtidas de material clínico e identificadas com base na produção de clamidosporos e propriedades metabólicas. A atividade proteolítica foi avaliada em meio contendo soro de albumina bovina como única fonte de nitrogênio, e verificaram forte proteólise em poucos isolados após suplementação do meio com extrato de levedura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de *Candida albicans* (Robin) Berkhout, *C. dubliniensis* Sullivan e *C. stellatoidea* Jones et Martin

As amostras foram procedentes da Coleção de Culturas Micoteca URM, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), foram obtidas 50 culturas de leveduras, as quais estavam estocadas sob óleo mineral (SHERF, 1943), por um período que variou desde 1954 a 2005. Destas, 42 culturas foram de *Candida albicans*, seis culturas de *C. dubliniensis* e duas de *C. stellatoidea*, obtidas de diferentes substratos (Tabelas 1, 2 e 3). Para controle, foram utilizadas seis culturas de outras Coleções para comparação das características morfofisiológicas, sendo duas amostras de *C. albicans*, três *C. stellatoidea* e uma *C. dubliniensis* provenientes da Culture Collection of Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses Chiba University - Japão, Central Bureau voor Schimmelcultures Bearn - Holanda e Institute for Fermentation, Osaka - Japão (Tabela 4).

Tabela 1. Culturas de *Candida albicans* procedentes da Coleção de Culturas Micoteca URM.

Nº de registro da Micoteca URM	Ano de estoque	Substrato
0110 (IBB-050)	1954	-
0362	1956	-
0720	1956	Secreção brônquica
0743	1957	Secreção vaginal
0835	1957	Excremento
1091	1961	LBFHC-1061
2224	1968	Secreção nasal
2251	1969	Secreção brônquica
2252	1969	Mucosa bucal
2253	1969	Escamas ungueais
2883	1986	-
3620	1994	Secreção brônquica
3622	1994	Esputo
3623	1994	Esputo
3625	1994	Esputo
3626	1994	Esputo
3628	1994	Esputo
3629	1994	Esputo
3716	1996	Escarificado de dentina
3719	1996	Resto radicular (dente)
4124	1999	Secreção orofaríngea
4125	1999	Escarro
4126	1999	Urina
4127	1999	Região inguinal
4260	2001	Secreção orofaríngea
4384	2001	Secreção orofaríngea
4385	2001	Secreção orofaríngea
4386	2001	Secreção orofaríngea
4387	2001	Secreção orofaríngea
4388	2001	Secreção orofaríngea
4448	2002	Solo de praia
4606	2003	Sangue
4609	2003	Sangue
4819	2004	Unha do pé
4820	2004	Unha da mão
4986	2005	Secreção vaginal
4987	2005	Secreção vaginal
4990	2005	Secreção vaginal
6078	2004	Unha da mão
6077	2004	Unha da mão
6076	2004	Unha da mão
6075	2004	Unha do pé

IBB= Instituto Biológico da Bahia - Bahia; LBFHC= Lab. Botânica Facultad de Human y Ciencias- Uruguai.

Tabela 2. Culturas de *Candida dubliniensis* procedentes da Coleção de Culturas Micoteca URM.

Nº de registro da Micoteca URM	Ano de estoque	Substrato
4822	2004	Unha da mão
4823	2004	Unha da mão
4824	2004	Unha da mão
4825	2004	Unha da mão
4827	2004	Unha do pé
4848	2004	Líquor

Tabela 3. Culturas de *Candida stellatoidea* procedentes da Coleção de Culturas Micoteca URM.

Nº de registro da Micoteca URM	Ano de estoque	Substrato
0113 (IBB-045)	1954	-
1062 (LBFHC-1019)	1958	-

IBB= Instituto Biológico da Bahia - Bahia; LBFHC= Lab. Botânica Facultad de Human y Ciências- Uruguai.

Tabela 4. Culturas de *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* para controle procedentes da Coleção de Culturas Micoteca URM provenientes de outras Coleções.

Nº de registro da Micoteca URM	Espécie
6073 (H39 47106)	<i>C. albicans</i> (sorotipo A)
6074 (H40 47107)	<i>C. albicans</i> (sorotipo B)
4803 (CBS 7987)	<i>C. dubliniensis</i>
6070 (IFO 40021)	<i>C. stellatoidea</i>
6071 (IFO 40086)	<i>C. stellatoidea</i>
6072 (IFO 5745)	<i>C. stellatoidea</i>

H= Culture Collection of Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses Chiba University; CBS= Central Bureau voor Schimmelcultures Bearn; IFO= Institute for Fermentation.

4.2 Viabilidade das Amostras e Revisão Taxonômica

Todas as amostras de leveduras foram submetidas à avaliação quanto à viabilidade e revisadas taxonomicamente de acordo com Lodder (1970), Kreger-van Rij (1984), Barnett et al. (1990), Kurtzman e Fell (1998), Hoog e Guarro (2000).

As culturas preservadas foram repicadas para caldo glicosado e mantidas durante cinco dias à temperatura ambiente ($T.A = 28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), para verificação da viabilidade. Após o crescimento, foram semeadas em meio ágar Sabouraud adicionado de extrato de levedura, para posterior revisão taxonômica. Após 72 horas foram realizados os testes para verificação das características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas de acordo com Lodder (1970), Kreger-van Rij (1984), Barnett et al. (1990), Kurtzman e Fell (1998) e Hoog e Guarro (2000). Para observação das características macroscópicas (coloração, superfície, consistência, bordos e diâmetro das colônias, além de formação de película, sedimento e anel) foi utilizado o meio ágar Sabouraud adicionado de extrato de levedura, para características microscópicas (morfologia da célula, tipo de brotação, presença de pseudo-micélio e/ou micélio verdadeiro) foi utilizado o meio ágar malte e para as características fisiológicas foram realizados testes quanto a capacidade de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, através dos meios básicos C (isento de fontes de carbono) e N (isento de fonte de nitrogênio), assim como fermentação de fontes de carbono a partir de solução peptonada e produção de urease e ácido utilizando ágar Christensen e Carbonato de cálcio respectivamente, de acordo com a metodologia proposta por Lodder (1970), Kreger van-Rij (1984), Barnett et al. (1990) e Kurtzman e Fell (1998).

4.2.1 Meios de Cultura para Verificação da Viabilidade e Revisão Taxonômica

- **Caldo Glicosado** (LACAZ et al., 2002)

Glicose (40g), extrato de carne (3g), cloreto de sódio (5g), peptona de carne (10g) e água destilada (1000 mL q.s.p.).

- **Ágar Sabouraud + Extrato de levedura** (LACAZ et al., 2002)

Glicose (40g), peptona (10g), extrato de levedura (5g), ágar (16g) e água destilada (1000 mL q.s.p.).

- **Ágar Malte** (LACAZ et al., 2002)

Extrato de malte (30g), ágar (15g), água destilada (1000 mL q.s.p.) e o pH ajustado em 5,5.

- **Prova de Assimilação de Hidratos de Carbono e Fontes de Nitrogênio** (LODDER; KREGER-VAN RIJ, 1952)

Meio Básico C (assimilação de fontes de carbono)

Sulfato de amônio (5g), fosfato de potássio monobásico (1g), sulfato de magnésio (0,5g), ágar (16g) e água destilada (1000 mL q.s.p.).

Meio Básico N (assimilação de fontes de nitrogênio)

Glicose (20g), fosfato de potássio monobásico (1g), sulfato de magnésio (0,5g), ágar (16g) e água destilada (1000 mL q.s.p.).

- **Prova de Fermentação de Açúcares** (LODDER, 1970; KREGER VAN-RIJ, 1984)

Água Peptonada

Peptona (2,5g), extrato de levedura (0,5g) e água destilada (1000 mL q.s.p.).

Solução de Açúcar

Fonte de carbono (4g) e água peptonada a 2,5% em 100 mL.

- **Ágar Christensen** (CHRISTENSEN, 1946)

Glicose (1g), peptona (1g), cloreto de sódio (5g), fosfato de potássio monobásico (2g), vermelho de fenol (0,012g), ágar (16g), uréia 20% e água destilada (1000 mL q.s.p.).

- **Ágar Carbonato de Cálcio (CaCO₃)** (LACAZ et al., 2002)

Extrato de levedura (0,5g), dextrose (5g), Carbonato de cálcio (0,5g), ágar (20g) e água destilada (1000 mL q.s.p.).

Os meios de cultura foram autoclavados a 120°C por 15 minutos e mantidos a temperatura ambiente durante 72 horas para controle de esterilização.

4.3 Testes de Diferenciação dos Isolados de Leveduras

Para observação de diferenças entre os isolados foram realizados os seguintes testes: prova do tubo germinativo, produção de clamidosporo, atividade β -glicosidase, temperatura de crescimento a 45°C e testes de assimilação utilizando sacarose, xilose, glucosamina, arabinose, metil- α -D-glicosídeo e glicose.

4.3.1 Prova do tubo germinativo

Fragmentos de culturas com 72 horas de crescimento em meio ágar Sabouraud, foram semeados em clara de ovo contida em tubos de ensaio (18 × 180mm) sendo posteriormente incubados a 37°C. Após três horas, alíquotas foram depositadas em lâmina e sobre estas lamínulas sendo examinadas ao microscópio, para observação da capacidade de formação de tubo germinativo.

Para interpretação da prova foi considerado: vários (V), raros (R) ou ausência (-) de tubo germinativo (REYNOLDS; BRAUDE, 1956).

4.3.2 Produção de clamidosporo

De culturas com 72 horas de crescimento em meio ágar Sabouraud, foram retirados fragmentos e suspensos em meio água bile de boi contido em tubos de ensaio (18 × 180mm), sendo mantidos a temperatura ambiente ($28^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$). Após 72 horas, alíquotas das suspensões foram depositadas entre lâmina e lamínula sendo examinada ao microscópio, para observação da capacidade de produção de clamidosporo. Para interpretação do teste foi considerada: clamidiosporos com arranjos em: cachos (C), trios (Tr), pares (P), terminal (T), isolado (I) e ausente (-) (FEO, 1978).

4.3.3 Atividade β -glicosidase

Para detecção da atividade β -glicosidase foram realizadas suspensões da levedura em caldo com esculina, mantidas a 28°C durante seis semanas. Foi incluído um tubo controle, sem adição de esculina. A interpretação do teste foi realizada através do escurecimento do meio quando positivo (COWAN; STEEL, 1965).

4.3.4 Temperatura de crescimento a 45°C

As culturas de leveduras foram inoculadas em duplicata no meio ágar Sabouraud adicionado de extrato de levedura contidos em placas de Petri, sendo mantidas à temperatura ambiente ($TA = 28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) para controle de crescimento e outro incubado à 45°C. O crescimento das culturas foi acompanhado durante sete dias (SULLIVAN et al., 1995).

4.3.5 Testes de assimilação (SULLIVAN et al., 1995)

Para o perfil assimilativo das leveduras foram utilizadas como diferentes fontes de carbono, sacarose, xilose, glucosamina, arabinose, metil- α -D-glicosídeo e como controle glicose. O meio básico C foi vertido em placas de Petri contendo 2mL da suspensão de leveduras com a concentração ajustada para $1,5 \times 10^6$ céls./mL⁻¹, após a solidificação do meio, foram depositadas em pontos equidistantes porções aleatórias das referidas fontes de carbono. As placas foram mantidas à temperatura ambiente e realizadas leituras a cada 24 horas durante três dias. Os testes foram considerados positivos pela formação de halo opaco, caracterizando crescimento ao redor das diferentes fontes.

4.3.6 Meios de Cultura para os Testes Diferenciais

- **Produção de clamidosporos (FEO, 1978)**

Bile de boi (14g) e água destilada (1000 mL q.s.p.).

- **Atividade da β glicosidase (COWAN; STEEL, 1965)**

Esculina (1g), citrato férrico (0,5g), peptona (10g), NaCl (5g) e água destilada (1000mL q.s.p.).

4.4 Resistência a Compostos Químicos

O resistograma foi realizado de acordo com Warnock et al. (1979) e McGreight e Warnock (1982) com modificações, o qual foi utilizado neste trabalho com os isolados procedentes da Micoteca URM. O método do resistograma se baseou na resistência de amostras a compostos químicos, para o qual foram testados: o ácido bórico, a acrilamida, o 4-clororesorcinol, o verde malaquita, o arseniato de sódio e o sulfato de cobre, representados pelas letras A, B, C, D, E e F, respectivamente. A interpretação foi designada em dois grupos, por indicação de resistência total (letra) e parcial/ ausente (-).

4.4.1 Compostos Químicos

As soluções estoques dos compostos químicos foram preparadas nas concentrações e volumes das mesmas listados na Tabela 5 foram posteriormente adicionadas a 20mL de *Yeast Morphology Agar* (YMA) da Difco.

Tabela 5. Concentração das soluções-estoque e dos volumes testados dos compostos químicos utilizados para o resistograma.

Referência	Composto Químico	Concentração (g/l)	Volumes Testados (mL) × Concentração do Composto Químico (mg/mL)					
			1,8	2,0	2,2	2,4	2,6	2,8
A	Ácido Bórico	15,0	1,23	1,36	1,48	1,60	1,72	1,84
B	Acrilamida	20,0	1,65	1,81	1,98	2,14	2,30	2,47
C	4 – Clororesorcinol	4,0	0,33	0,36	0,39	0,42	0,46	0,49
D	Verde Malaquita	0,3	0,024	0,027	0,029	0,032	0,034	0,036
E	Arseniato de Sódio	23,5	1,94	2,13	2,32	2,51	2,70	2,88
F	Sulfato de Cobre	10,6	0,87	0,96	1,05	1,13	1,21	1,30

4.4.2 Preparo dos Inóculos

Os isolados com 72h de crescimento a 37°C no meio YMA contido em tubos de ensaio (18 × 180mm), foram transferidos para tubos de ensaio (10 × 130mm) contendo 2mL do meio líquido *Yeast Nitrogen Base* (YNB) da Difco, 0,67g, contendo 0,15g de L-asparagina, 1,0g de glicose, em 100mL de água destilada e esterilizado por filtração, em filtro milipore com poro de 0.2µm e 47mm de diâmetro (membrana da Schleicher & Schuell) e mantidas a 37°C.

Após 48h, suspensões de cada isolado foram preparadas com 5mL de água destilada esterilizada e a concentração ajustada com um espectrofotômetro em 35% de transmitância a 540nm correspondendo a 10^7 céls/mL⁻¹.

4.4.3 Teste do Resistograma

Em placas de Petri, foram vertidos 20mL de YMA a $\pm 56^{\circ}\text{C}$. Para cada composto químico, foram preenchidas seis placas com 1,8; 2,0; 2,2; 2,4; 2,6 e 2,8 mL de cada solução e foi adicionado o meio de cultura e homogeneizado. Desta forma, foram preparadas 37 placas, sendo uma placa controle, isenta de qualquer composto químico.

Com o auxílio de um furador esterilizado, foram realizados 21 orifícios em cada placa, ordenados com letras, onde 10 μl da suspensão de cada isolado foram depositados em seu respectivo poço. As placas foram então incubadas a 37°C e após 40h foi realizada a interpretação dos testes.

4.4.4 Avaliação dos Resultados

O perfil de resistência de cada isolado de levedura correspondeu à capacidade de crescimento em meios contendo diferentes substâncias químicas. Cada composto utilizado foi marcado por uma letra, para indicar que determinada amostra foi resistente ao mesmo (Tabela 5). O crescimento foi interpretado em dois grupos de acordo com McGreight e Warnock (1982), McGreight et al. (1985), Nakamura et al. (1998): “crescimento confluyente” e “não confluyente (parcial/ ausente)”.

4.4.5 Meios de Cultura Utilizados para o Resistograma

- ***Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco Laboratories)***

YNB (6,7g), glicose (5g), L-asparagina (1,5g), água destilada (1000mL q.s.p.).

- ***Yeast Morphology Agar (YMA) (Difco Laboratories)***

YMA (35g) e água destilada (1000mL q.s.p.).

4.5 Caracterização Enzimática das Leveduras

Para detectar a atividade proteolítica, foi instituído o método descrito por Aoki et al. (1990). Fragmentos de culturas com 72 horas de crescimento foram inoculados em duplicata em 20 mL do meio ágar soro de albumina bovina (BSA) contidos em placas de petri, mantidas a temperatura de 37°C por sete dias. A leitura do teste foi realizada mediante a observação da formação de halo transparente ao redor da colônia, sendo este medido para realização do cálculo da zona de atividade ($\text{ZA} = \text{diâmetro da colônia dividido}$

pela soma do diâmetro da colônia com o tamanho do halo), de acordo com Vidotto et al. (2000), o qual adaptou a interpretação do método de Price et al. (1982) de fosfolipase para protease. Para interpretação foi considerado como parâmetros para atividade proteolítica: ausente (-), fraca (0.70 - 0.99cm), moderada (0.50 - 0.69cm) e positiva (< 0.50cm), sem utilização de revelador.

4.5.1 Meio de Cultura para Detecção de Atividade Proteolítica

A solução esterilizada por filtração contendo [Glicose (4g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.04g), K_2HPO_4 (0.5g), NaCl (1g), extrato de levedura (0.2g), BSA (0.5g) e água destilada (60mL q.s.p.), com pH ajustado para o valor de 3,5 com 1N HCl], foi adicionado a [ágar (3.2g) + água destilada (140mL q.s.p.)] esterilizado em autoclave.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Viabilidade e revisão taxonômica das culturas de *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*.

A viabilidade foi verificada em todos os 56 isolados obtidos, em que o crescimento das culturas ocorreu em até cinco dias após a inoculação em caldo glicosado, os quais, após a transferência para ágar Sabouraud, cresceram até o terceiro dia (Figura 1).

A viabilidade e preservação das características típicas das culturas, mantidas por até 51 anos, demonstram que o tempo de estocagem não interferiu na expressão das características dos isolados, fortalecendo a eficácia do método de preservação em óleo mineral instituído desde 1943 por Sherf. Os resultados estão corroborados por diversos pesquisadores que têm relatado elevadas taxas de sobrevivência quando instituído este método de preservação (SHERF, 1943; GUTTER; BARKAI-GOLAN, 1967; LITTLE; GORDON, 1967; TANDON et al., 1987).

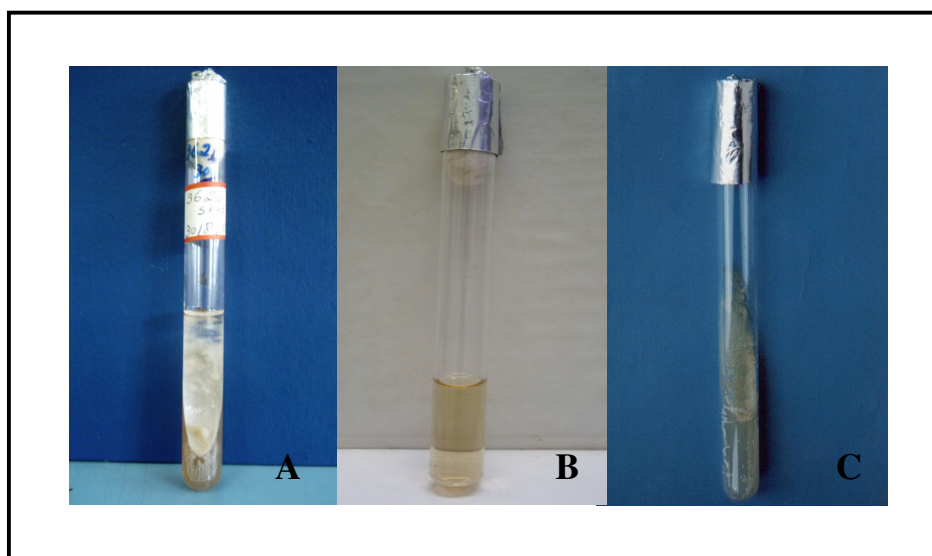


Figura 1. *Candida albicans* (3626) URM: (A) cultura preservada em óleo mineral, (B) cultura em caldo glicosado com cinco dias de crescimento e (C) cultura em ágar Sabouraud com três dias de crescimento.

As características macroscópicas mostraram colônias cremosas de cor branca a creme, quanto às microscópicas foram evidenciadas células de leveduras apresentando brotação simples, múltipla e pseudomicélio (Figura 2) e a prova da urease foi negativa indicando tratar-se de *Candida*, entretanto a fisiologia se mostrou variável, apresentando perfis de assimilação diferentes e temperatura de 40°C. Para *C. albicans* foram observados seis perfis diferentes: 27 isolados (110, 362, 720, 743, 2224, 2252, 3622, 3623, 3625, 3626, 3628, 3629, 3716, 3719, 4124, 4126, 4127, 4260, 4385, 4386, 4448, 4609, 4819, 4820, 6076, 6077, 6078) assimilaram e fermentaram dextrose, galactose, sacarose e maltose; 13 isolados (2883, 3620, 4125, 4384, 4387, 4388, 4606, 4986, 4987, 4990, 6073, 6074, 6075) a assimilação foi a mesma das anteriormente citadas, porém só foram fermentadas dextrose, galactose e maltose; o isolado (835), fermentou dextrose e galactose e o isolado (2251) apenas glicose e maltose. Foram considerados não se tratar de *C. albicans* dois isolados, 1091 e 2253, uma vez que não ocorreu fermentação da maltose e ocorreu assimilação de lactose e rafinose respectivamente (Figura 3, Tabela 6). Para as amostras de *C. dubliniensis* foram verificados três perfis fisiológicos distintos, os quais apresentaram a assimilação de dextrose, galactose, sacarose e maltose, porém em dois isolados (4803 e 4848) ocorreu fermentação de dextrose, galactose, maltose e em quatro (4822, 4823, 4825, 4827) foi fermentada as quatro fontes assimiladas e apenas um dos isolados (4824) fermentou dextrose, galactose e sacarose (Figura 3). Para os isolados de *C. stellatoidea*, foram evidenciadas três diferenças fisiológicas, em que três isolados (6070, 6071 e 6072) assimilaram glicose, galactose, maltose e não fermentaram esta última fonte. O mesmo perfil assimilativo foi observado em um dos isolados (1062), mas não fermentou nenhuma das fontes testadas. Em outro isolado (113) a assimilação ocorreu com dextrose, galactose, maltose e ainda sacarose, sendo fermentada todas essas fontes exceto galactose (Figura 3, Tabela 6). De acordo com a literatura, através das características macroscópicas e microscópicas não foi possível a diferenciação entre as espécies, contudo as fisiológicas permitirão essa distinção uma vez que podem variar quanto à assimilação e fermentação de algumas fontes de carbono, entretanto, não ocorrendo variação podem perder características, mas não adquiri-las (LODDER, 1970, KREGER-VAN RIJ, 1984, BARNETT et al., 1990, KURTZMAN; FELL, 1998, HOOG; GUARRO, 2000).

Não foi possível nos 56 isolados testados, verificar a produção de urease e de carbonato de cálcio, o que implicaria em mudança em nível de gênero, uma vez que é uma característica do gênero *Candida* a não detecção desta enzima e a não produção de ácido acético, evidenciado pela degradação do carbonato de cálcio (Figura 4, Tabela 6).

Estas características confirmam o gênero em estudo, não sendo possível esta confirmação quanto às espécies de todos os isolados determinadas anteriormente. Os nossos resultados estão em concordância com Lodder (1970), Kreger-van Rij (1984), Barnett et al. (1990), Kurtzman e Fell (1998), Hoog e Guarro (2000).

Segundo vários autores, o crescimento, ou seja, o aumento do número de células em meio completo, que contenha uma determinada substância como única fonte de carbono, indica a capacidade deste isolado em assimilar esta determinada fonte. A fermentação indica a produção de gás, resultado da produção de CO₂ e álcool (LACAZ et al., 2002).

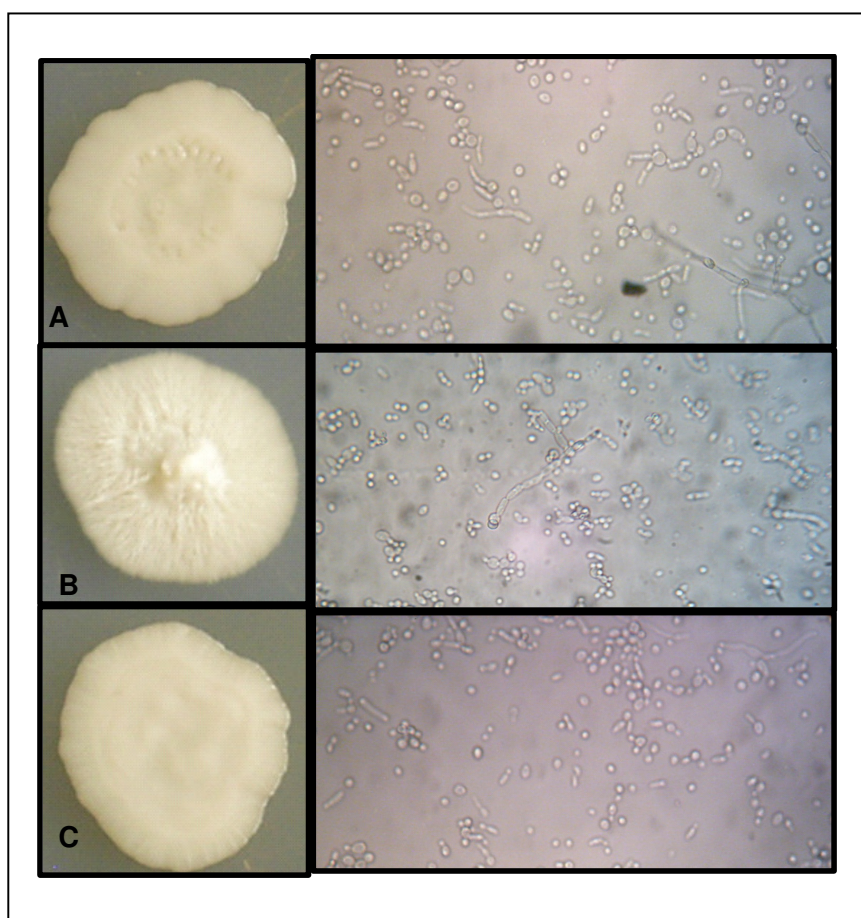


Figura 2. Macroscopia e microscopia de *C. albicans* (A), *C. dubliniensis* (B) e *C. stellatoidea* (C) em ágar Sabouraud com extrato de levedura.

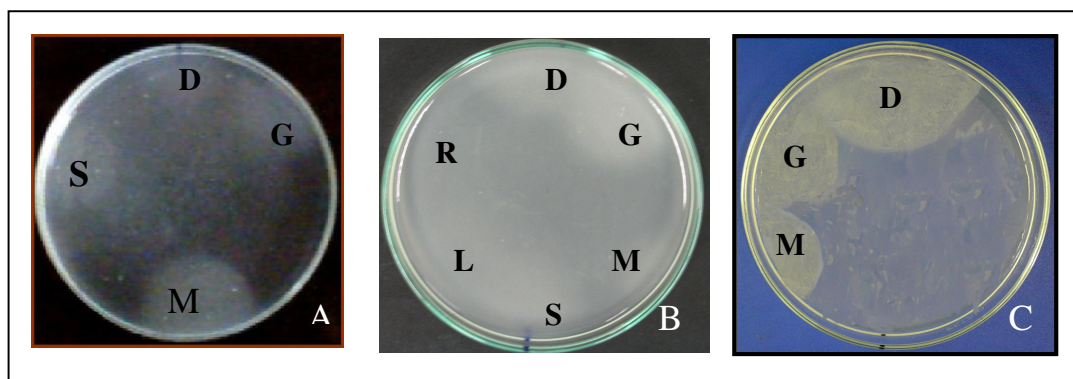


Figura 3. Perfis distintos dos isolados de *Candida*: A - assimilação de dextrose (D), galactose (G), maltose (M) sacarose (S) (isolado 3629); B - assimilação de D, G, M, S, lactose (L) e rafinose (R) (isolado 2253) e C - assimilação de D, G e M (isolado 6070).

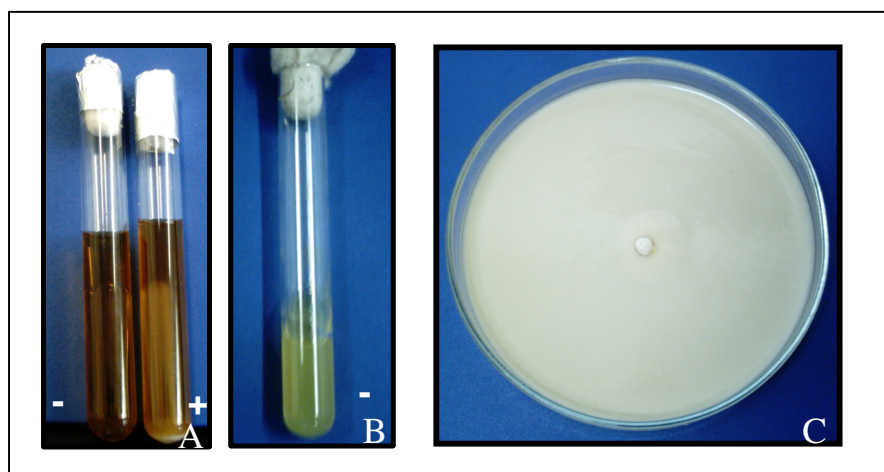


Figura 4. Perfis fisiológicos dos testes de fermentação, produção de urease e ácido acético, representativo dos isolados de *Candida*. A - fermentação de dextrose ausente (-) e presente (+); B- teste da urease negativo (-) e C- ausência de produção de ácido acético em meio com carbonato de cálcio.

Tabela 6. Perfis fisiológicos dos isolados de *Candida*.

Espécies de <i>Candida</i> × Número de Culturas	Assimilação								Fermentação de Fontes de Carbono						U r e a s e	Temperatura	
	Fontes de Carbono						Fontes de Nitrogênio										
	D	G	L	M	S	R	(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	D	G	L	M	S	R		37°C	40°C
<i>C. albicans</i> (27)	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>C. albicans</i> (13)	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>C. albicans</i> (01)	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>C. albicans</i> (01)	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>C. albicans</i> (01)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. albicans</i> (01)	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>C. dubliniensis</i> (02)	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>C. dubliniensis</i> (04)	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>C. dubliniensis</i> (01)	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
<i>C. stellatoidea</i> (03)	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>C. stellatoidea</i> (01)	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>C. stellatoidea</i> (01)	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

D = Dextrose; G = Galactose; L= Lactose; M = Maltose; S = Sacarose; R = Rafinose.

5.2 Perfil diferencial dos isolados de *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*.

5.2.1 Produção de Tubo Germinativo

Dos 56 isolados de *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* foi possível observar tubo germinativo em 48, sendo evidenciado vários (V) em 38 isolados (110, 113, 362, 743, 2221, 2224, 2252, 2253, 2883, 3620, 3622, 3623, 3625, 3626, 3629, 3716, 4124, 4125, 4126, 4384, 4385, 4386, 4387, 4388, 4448, 4606, 4803, 4820, 4822, 4823, 4986, 4987, 4990, 6071, 6073, 6074, 6076, 6078) e raros (R) em 11 (720, 3628, 3719, 4127, 4260, 4609, 4819, 4825, 4827, 6075, 6077) (Figura 5). Entretanto, em sete isolados (835, 1062, 1091, 4848, 4824, 6070, 6072) não foi evidenciado (-) esta estrutura. Inicialmente a formação de tubo germinativo por *C. albicans* foi considerada como um rápido e simples modelo de morfogênese (MATTIA et al., 1982), contudo sua expressão é citada para a determinação de modelos de virulência (DE BERNARDIS et al., 1993; WELMER; BERNHARDT, 1997) e é considerado como critério taxonômico, porém esta estrutura é formada tanto em *C. albicans* como em *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*, não sendo possível diferenciá-las através dessa estrutura, mas a incapacidade da sua formação indica tratar-se de outras espécies (LODDER, 1970; BARNETT et al., 1990; HOOG; GUARRO, 2000).

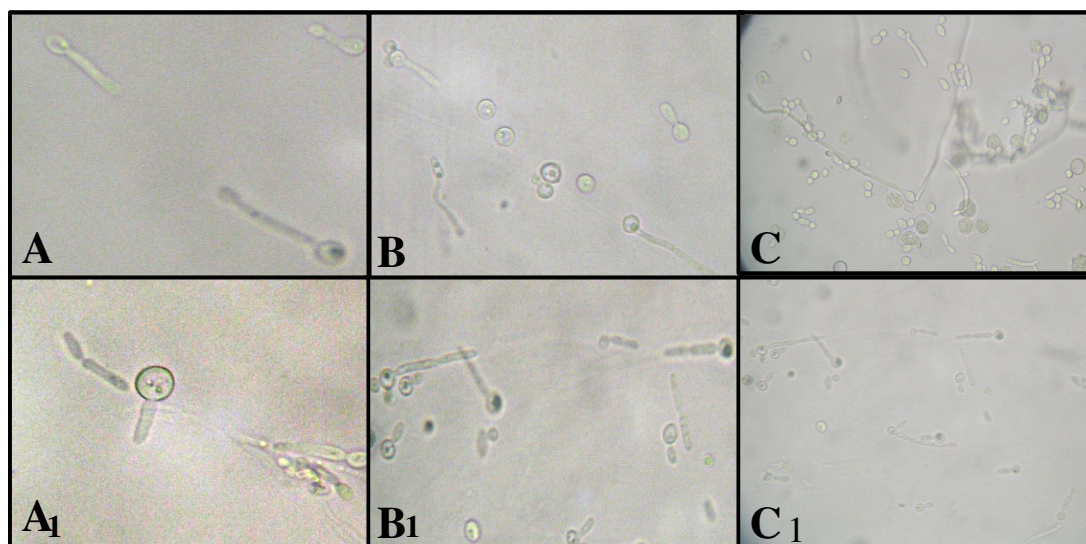


Figura 5. *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*, respectivamente: Coleções (A:6074-Japão), (B:4803-CBS), (C:6071-IFO) e teste (A₁:3620-URM), (B₁:4127-URM) e (C₁:113-URM), expressando tubo germinativo em clara de ovo a 37°C, após 3 dias de incubação.

5.2.2 Produção de clamidosporo

A formação de clamidosporos apresentou-se variável entre os isolados de *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*, sendo verificado que em 16 isolados (110, 362, 2224, 3620, 3716, 4124, 4127, 4260, 4385, 4388, 4606, 4803, 4819, 4986, 6070, 6073), o arranjo desta estrutura foi em cachos (C); em cinco (743, 2883, 3623, 4848, 6074) mostraram-se em trios (Tr); em 13 (2251, 3626, 3629, 3719, 4125, 4126, 4384, 4387, 4609, 4820, 4823, 4848, 6077) aos pares (P); em 11 terminais (T) (113, 1062, 3622, 4822, 4825, 4987, 4990, 6071, 6072, 6075, 6076); em nove (720, 835, 2252, 3625, 3628, 4386, 4824, 4827, 6078) isolados (I) (Figura 6) e dois (1091 e 2253) não apresentaram (-) clamidosporos. A presença dessa estrutura fortalece tratar-se das espécies acima mencionadas, sobretudo a distinção entre os arranjos contribui para a diferenciação entre estas espécies. A ausência de clamidosporo não é um fator limitante para a transferência para outras espécies, contudo associada a outros fatores tornar-se-á possível determinação da espécie. Os isolados que não foram capazes de formarem esta estrutura, apresentaram outras características que as distinguem de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Estes resultados estão apoiados por alguns autores, os quais descrevem o arranjo de clamidosporos como possibilidade para se distinguir estas espécies, bem como a ausência desta estrutura associada a outras características incluir a amostra em uma outra espécie (ALVES et al., 2000; STAIB; ARASTÉH, 2001; AL-HEDAITHY; FOTEDAR, 2002).

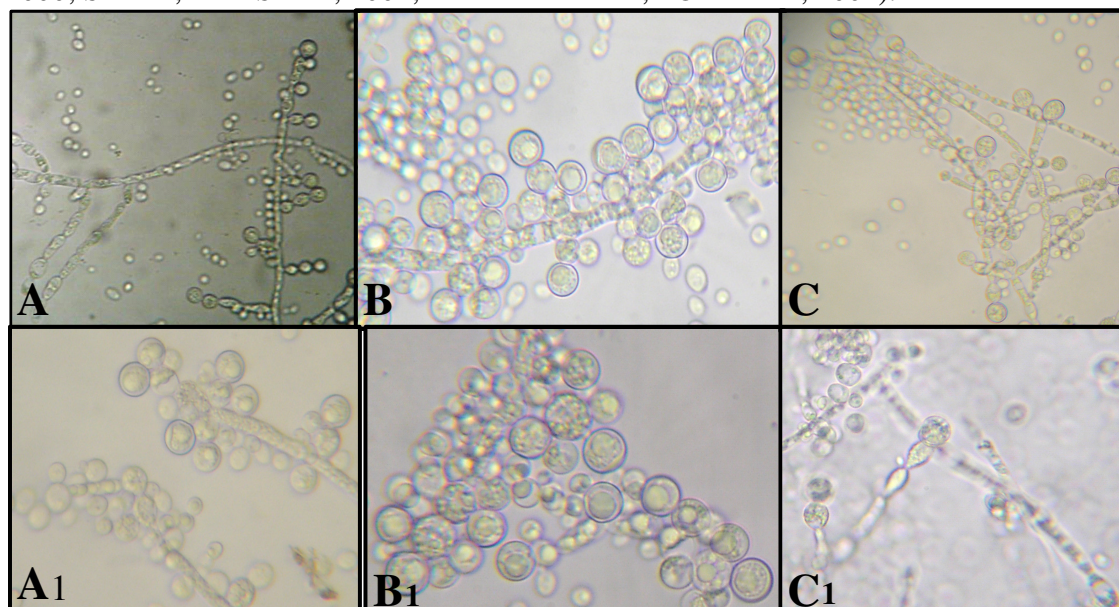


Figura 6. *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*, respectivamente: isolado de outras Coleções (A:6074-Japão), (B:4803-CBS), (C:6071-IFO) e teste (A₁:3620-URM), (B₁:4127-URM) e (C₁:113-URM), expressando clamidosporos em meio água bile de boi.

5.2.3 Atividade da β -glicosidase

A atividade da β -glicosidase foi verificada em 54 isolados de *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*, todavia de forma variável, sendo fraca em oito amostras (835, 4127, 4260, 4385, 4606, 4819, 4824, 4986) e ausente em dois (1091, 2253) (Figura 7). É possível que a diferença na expressão da atividade desta enzima tenha ocorrido mediante a fisiologia do isolado, uma vez que, estavam estocados por diferentes períodos e mantidos em óleo mineral. Os resultados obtidos estão apoiados por Williamson et al. (1986), os quais afirmam que a presença desta enzima contribui para identificação de leveduras de importância médica, assim como na diferenciação de biotipos de *C. albicans*. Este teste foi desenvolvido originalmente por Boerlin et al. (1995) com o objetivo de diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*, sendo esta última espécie considerada incapaz de expressar esta enzima. Embora estudos prévios reportem que todas as amostras de *C. albicans* apresentam atividade β -glicosidase intensa e *C. dubliniensis* não possui esta capacidade (SCHOOFS et al., 1997; SULLIVAN; COLEMAN, 1998), em nossos resultados verificamos a atividade desta enzima nas duas espécies diferindo dos achados de outros autores.

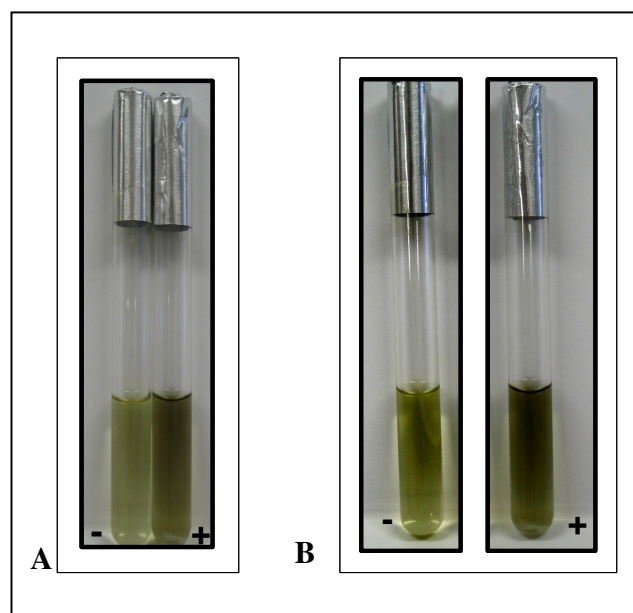


Figura 7. Atividade β -glicosidase expressa pelos isolados de *Candida*. Controle (A) negativo (-) e representação de positivo para comparação (+) e testes (B) negativo (1091-URM) e positivo(3620-URM).

5.2.4 Temperatura de crescimento

A capacidade de crescimento a 45°C, considerada como diferencial entre *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* (atual *C. albicans*), foi variável nos isolados testados, sendo 24 isolados (362, 2251, 2252, 3628, 3716, 4260, 4384, 4606, 4609, 4819, 4820, 4822, 4823, 4827, 4848, 4986, 4987, 4990, 6071, 6073, 6074, 6076, 6077, 6078) capazes de crescerem a 45°C, o que não ocorreu com as demais culturas. *C. albicans* é uma espécie que apresenta a capacidade de crescer a 45°C, entretanto *C. dubliniensis* não possui esta capacidade e *C. stellatoidea* pode apresentar variações de crescimento a esta temperatura. Possivelmente alguns isolados não foram capazes de crescer a esta temperatura devido à variação fisiológica mediante o tempo e método de preservação (Figura 8, Tabela 7). Estes resultados, somando a outros testes realizados, confirmam o que é reforçado por outros pesquisadores que chamam atenção da sua importância como um critério taxonômico relevante, facilmente aplicável como critério de triagem aplicado a um grande número de culturas, requerendo, no entanto provas complementares (SULLIVAN et al., 1995; KURTZMAN; FELL, 1998; PINJON et al., 1998; ALVES et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

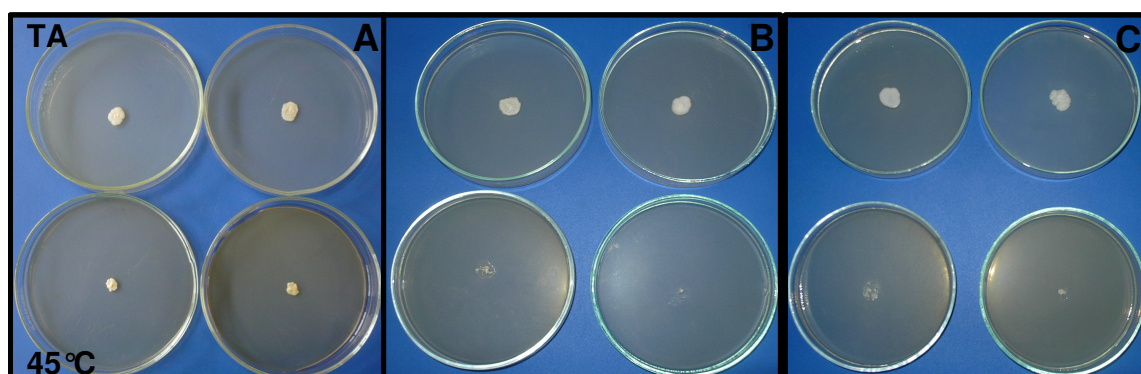


Figura 8. Crescimento a temperatura ambiente (TA) e a 45°C de *Candida albicans* (A: 4986-URM), *C. dubliniensis* (B:4803-CBS) e *C. stellatoidea* (C:113-URM).

Tabela 7. Temperatura de crescimento a 45°C dos isolados de espécies de *Candida*.

Número do isolado	Espécies	Temperatura de 45°C
0110	<i>Candida albicans</i>	-
0113	<i>C. stellatoidea</i>	-
0362	<i>C. albicans</i>	+
0720	<i>C. albicans</i>	-
0743	<i>C. albicans</i>	-
0835	<i>C. albicans</i>	-
1062	<i>C. stellatoidea</i>	-
1091	<i>C. albicans</i>	-
2224	<i>C. albicans</i>	-
2251	<i>C. albicans</i>	+
2252	<i>C. albicans</i>	+
2253	<i>C. albicans</i>	+
2883	<i>C. albicans</i>	+
3620	<i>C. albicans</i>	+
3622	<i>C. albicans</i>	+
3623	<i>C. albicans</i>	+
3625	<i>C. albicans</i>	+
3626	<i>C. albicans</i>	+
3628	<i>C. albicans</i>	+
3629	<i>C. albicans</i>	-
3716	<i>C. albicans</i>	+
3719	<i>C. albicans</i>	-
4124	<i>C. albicans</i>	-
4125	<i>C. albicans</i>	-
4126	<i>C. albicans</i>	-
4127	<i>C. albicans</i>	-
4260	<i>C. albicans</i>	+
4384	<i>C. albicans</i>	+
4385	<i>C. albicans</i>	-
4386	<i>C. albicans</i>	-
4387	<i>C. albicans</i>	-
4388	<i>C. albicans</i>	-
4448	<i>C. albicans</i>	-
4606	<i>C. albicans</i>	+
4609	<i>C. albicans</i>	+
4803	<i>C. dubliniensis</i>	-
4819	<i>C. albicans</i>	+
4820	<i>C. albicans</i>	+
4822	<i>C. dubliniensis</i>	+
4823	<i>C. dubliniensis</i>	+
4824	<i>C. dubliniensis</i>	-
4825	<i>C. dubliniensis</i>	-
4827	<i>C. dubliniensis</i>	+
4848	<i>C. dubliniensis</i>	-
4986	<i>C. albicans</i>	+
4987	<i>C. albicans</i>	-
4990	<i>C. albicans</i>	+
6070	<i>C. stellatoidea</i>	-
6071	<i>C. stellatoidea</i>	+
6072	<i>C. stellatoidea</i>	-
6073	<i>C. albicans</i>	+
6074	<i>C. albicans</i>	+
6075	<i>C. albicans</i>	-
6076	<i>C. albicans</i>	+
6077	<i>C. albicans</i>	+
6078	<i>C. albicans</i>	+

5.2.5 Perfil assimilativo diferencial

A partir do padrão assimilativo diferencial foram evidenciados quatro perfis de assimilação em *C. albicans*, sendo no primeiro possível verificar que 21 isolados (743, 835, 2224, 2883, 3622, 3625, 4125, 4126, 4385, 4386, 4820, 4822, 4823, 4825, 4827, 4986, 4987, 6075, 6076, 6077, 6078) assimilaram xilose, sacarose, metil- α -D-glicosídeo, entretanto não assimilaram arabinose e glicosamina (Figura 9; Tabela 8); o segundo perfil com mais 21 isolados (720, 2251, 2252, 3620, 3623, 3626, 3628, 3629, 3716, 3719, 4124, 4260, 4384, 4387, 4388, 4448, 4606, 4609, 4990, 6073, 6074) que apresentaram variação do perfil anterior, apenas na assimilação da glicosamina; no terceiro perfil com quatro isolados (110, 113, 4819, 4824) apenas xilose e sacarose foram assimiladas, e em outro perfil, outros quatro (1062, 6070, 6071, 6072) ocorreu a assimilação em xilose, metil- α -D-glicosídeo e glicosamina, porém não foi expressa a assimilação da sacarose e arabinose (Tabela 8; Figura 11); em três (362, 4127, 4803), ocorreu com sacarose, metil- α -D-glicosídeo, glicosamina e não apresentou assimilação da xilose e arabinose (Figura 10; Tabela 8); para um (4848) dos isolados a assimilação foi evidenciada em xilose, sacarose e glicosamina, mas não houve com metil- α -D-glicosídeo e arabinose. Foi verificada a assimilação de xilose, sacarose, metil- α -D-glicosídeo e arabinose, sem ocorrer em glicosamina em somente um isolado (2253) (Figura 12), sendo observado em outro (1091) uma diferença apenas na não assimilação da arabinose (Tabela 8).

As características fenotípicas evidenciadas nos isolados testados indicaram a mudança de espécies em algumas das 56 amostras testadas em que destas 44 originalmente identificadas como *C. albicans*, duas foram consideradas *C.dubliniensis* (362, 4127) por não assimilarem a xilose e arabinose, mas a sacarose e glucosamina foram assimiladas e não cresceram a 45°C; uma foi considerada *C. famata* (2253) por não produzirem tubo germinativo, clamidosporo, assim como arabinose positiva e cresceu apenas a 37°C; a outra amostra foi renomeada à *C. parapsilosis* (1091) por não formar tubo germinativo, clamidosporo e não crescer a 45°C. Dos sete isolados de *C.dubliniensis*, apenas um permaneceu como sendo esta espécie os demais passaram a ser *C. albicans* (4822, 4823, 4824, 4825, 4827, 4848), destas, quatro (4822, 4823, 4825, 4827) assimilaram metil- α -D-glicosídeo e não assimilaram a arabinose, glicosamina e duas (4824 e 4848) não assimilaram estas fontes, entretanto foram capazes de formar tubo germinativo, bem como

clamidosporo e crescerem bem a 45°C. Dos cinco isolados de *C. stellatoidea* um (113) passou a ser considerado *C. albicans* (*C. albicans*) por apresentar a capacidade de assimilar a sacarose (Tabela 8).

Os nossos resultados estão em concordância com Ahearn (1970) que já afirmava que *C. stellatoidea* não é capaz de assimilar a sacarose e pode ser considerada como variante de *C. albicans*, a qual assimila esta fonte de carbono. Nossos achados estão em concordância com Odds et al. (1998) que revisaram 2589 amostras de uma coleção, originalmente identificadas como *C. albicans* para avaliar a frequência de *C. dubliniensis*. Após esta revisão ocorreu a renomeação de 53 amostras para esta última espécie, sendo uma delas isolada em 1957 e identificada como *C. stellatoidea*.

Há trabalhos que indicam a assimilação de metil- α -D-glicosídeo e outros que consideram esta fonte não assimilada por *C. albicans*. Na verdade, várias características específicas para essas diferentes espécies são mencionadas por diversos pesquisadores como alteráveis confirmando a importância da verificação conjunta, das características fenotípicas para a inclusão do isolado em determinada espécie, tornando-se a partir destes relatos os nossos resultados mais fortalecidos (SULLIVAN et al., 1995; SULLIVAN et al., 1999; GALES et al., 1999).

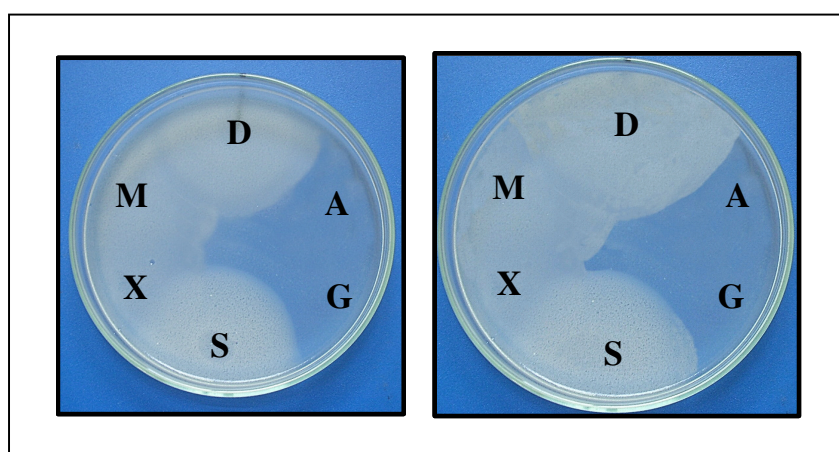


Figura 9. Teste de assimilação de Dextrose (D), Arabinose (A), Glicosamina (G), Sacarose (S), Xilose (X) e Metil- α -D-glicosídeo (M) por *Candida albicans* (isolado de outras Coleções- 6073 URM, e o teste- 6076 URM). (D), (S), (X) e (M) assimilados após 3 dias de incubação.

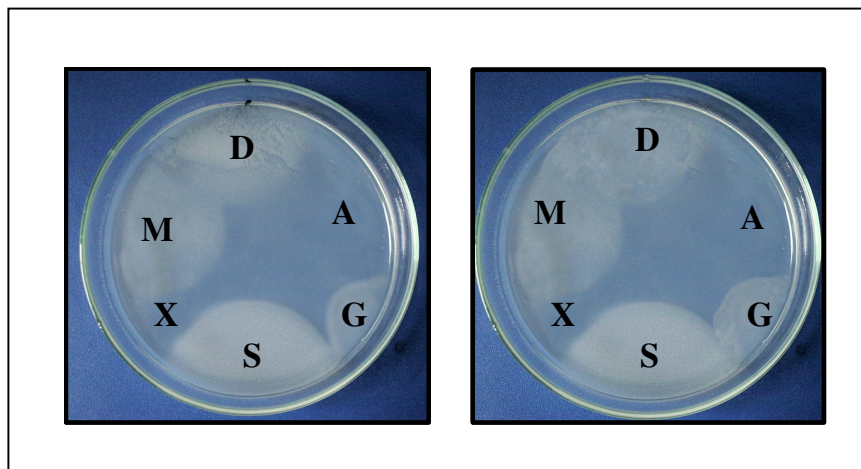


Figura 10. Teste de assimilação de Dextrose (D), Arabinose (A), Glicosamina (G), Sacarose (S), Xilose (X) e Metil- α -D-glicosídeo (M) por *Candida dubliniensis* (isolado de outras Coleções- 4803 URM, e o teste- 362 URM). (D), (G), (S), e (M) assimilados após 3 dias de incubação.

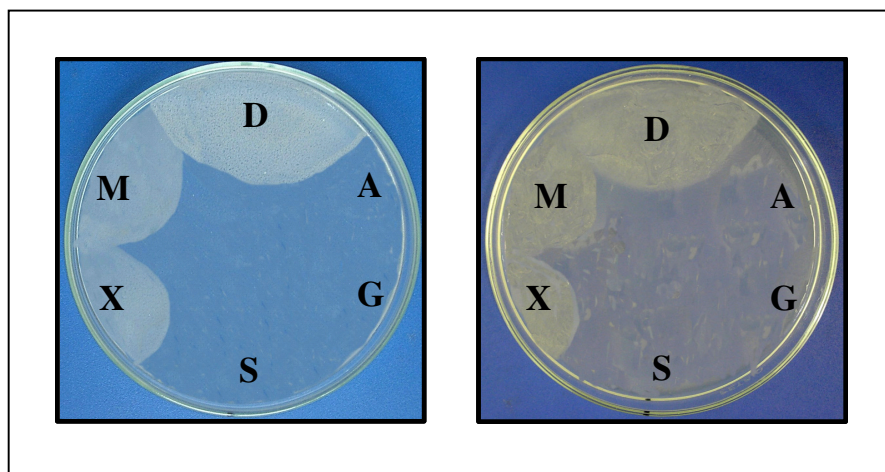


Figura 11. Teste de assimilação de Dextrose (D), Arabinose (A), Glicosamina (G), Sacarose (S), Xilose (X) e Metil- α -D-glicosídeo (M), após três dias de incubação por *Candida stellatoidea* (isolado de outras Coleções- 6070 URM, e o teste- 1062 URM). (D), (X) e (M) assimilados após 3 dias de incubação.

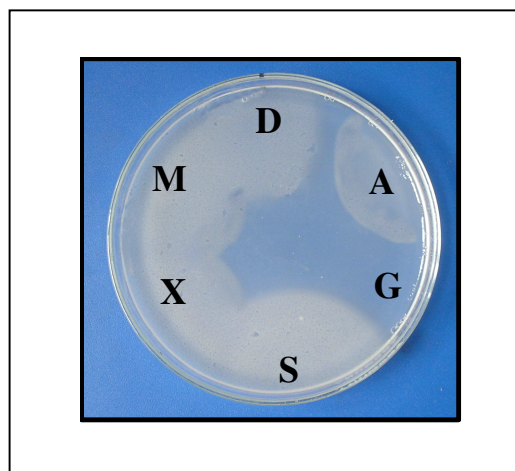


Figura 12. Teste de assimilação de Dextrose (D), Arabinose (A), Glicosamina (G), Sacarose (S), Xilose (X) e Metil- α -D-glicosídeo (M), após três dias de incubação por *Candida famata* - 2253 URM. Apenas a Glicosamina não foi assimilada após 3 dias de incubação.

Tabela 8. Perfil assimilativo diferencial dos isolados de *Candida* revisados.

Espécies de <i>Candida</i> × Número de Culturas	Fontes de Carbono					
	D	X	S	MDG	A	Gli
<i>C. albicans</i> (21)	+	+	+	+	-	-
<i>C. albicans</i> (21)	+	+	+	+	-	+
<i>C. albicans</i> (04)	+	+	+	-	-	-
<i>C. albicans</i> (01)	+	+	+	-	-	+
<i>C. dubliniensis</i> (03)	+	-	+	+	-	+
<i>C. stellatoidea</i> (04)	+	+	-	+	-	+
<i>C. famata</i> (01)	+	+	+	+	+	-
<i>C. parapsilosis</i> (01)	+	+	+	+	-	-

D = Dextrose; X = Xilose; S = Sacarose; MDG = Metil- α D-glicosídeo; A = Arabinose; Gli = Glicosamina.

5.3 Resistência a compostos químicos (Resistograma)

Foram selecionadas as concentrações de 1,36mg/mL para ácido bórico; de 0,96mg/mL sulfato de cobre; de 2,30mg/mL para acrilamida; de 0,33mg/mL para 4-clororesorcinol e para os compostos químicos verde malaquita e arseniato de sódio escolhidas, de acordo com o menor número de crescimento parcial (Figuras 13 e 14; Tabelas 5 e 9). Na situação em que coincidiu o mesmo número entre duas ou mais concentrações, a menor foi adotada (Figura 13). Estes critérios estão apoiados por Warnock et al. (1979), os quais consideram que para os melhores resultados apresentados pelos compostos químicos, é necessário que se encontre a concentração adequada a ser utilizada.

Foi possível a obtenção de 29 diferentes resistotipos (Tabela 9). As leveduras apresentaram crescimento em todas as concentrações nas placas com 4-clororesorcinol. Nenhuma levedura cresceu em meio contendo verde malaquita. Estes compostos químicos, nas concentrações utilizadas, não mostraram eficiência para diferenciar os isolados. Outros autores indicaram a substituição destes compostos por outros como nitrato de prata e ceftriaxona (MCCREIGHT; WARNOCK, 1982).

O ácido bórico, arseniato de sódio, verde malaquita, e sulfato de cobre, utilizados no presente trabalho, são considerados fungicidas por Schmid et al. (1995). Vários autores afirmam existir uma associação entre virulência e capacidade de resistir à presença dos compostos tóxicos em meio de cultura por parte dos isolados, porém não foi evidenciada nenhuma correlação nos isolados testados (MCCREIGHT et al., 1984; GHANNOUM et al., 1985; HUNTER; FRASER, 1987; ABU-ELTEEN, 2000). Uma completa comparação do resistograma entre resultados previamente reportados e os nossos é dificultada devido às diferentes concentrações e químicos utilizados na presente pesquisa.

Os resultados contidos na tabela 9 demonstraram que do total de 44 isolados de *C. albicans* foram obtidos 24 resistotipos diferentes. O resistotipo [ABC-EF] foi verificado em um grupo de 10 isolados desta espécie, equivalendo ao perfil de resistência mais comum entre todos os isolados de *C. albicans*.

Dos sete isolados de *C. dubliniensis*, foram verificados cinco resistotipos diferentes, sendo três (4822, 4823 e 4827) representados por [ABC-E-]; um (4848) com resistotipo [ABC-EF] e outro (4803) também obteve similar resultado, entretanto, variou

apenas no resultado parcial no sulfato de cobre, sendo o resistotipo [ABC-E(F)]; e dois (4824 e 4825) com resistotipos [ABC---] e [A-C-E-] respectivamente (Tabela 9).

De cinco isolados de *C. stellatoidea* (113, 1062, 6070, 6071 e 6072), foram observados cinco resistotipos diferentes, sendo duas (1062 e 6071) amostras sensíveis a cinco dos compostos químicos testados apresentando resistência parcial e total, respectivamente, apenas ao 4-clororesorcinol (Tabela 9).

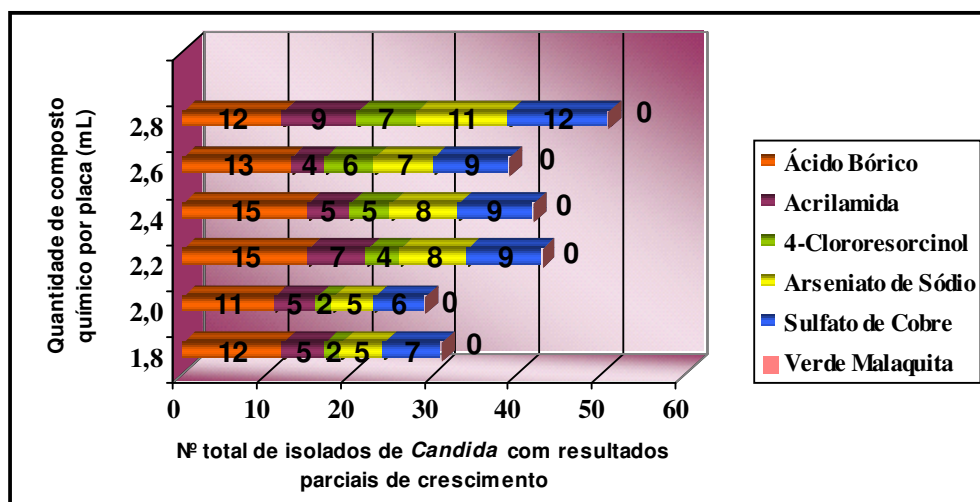


Figura 13. Crescimento parcial das leveduras nas diferentes concentrações dos químicos.

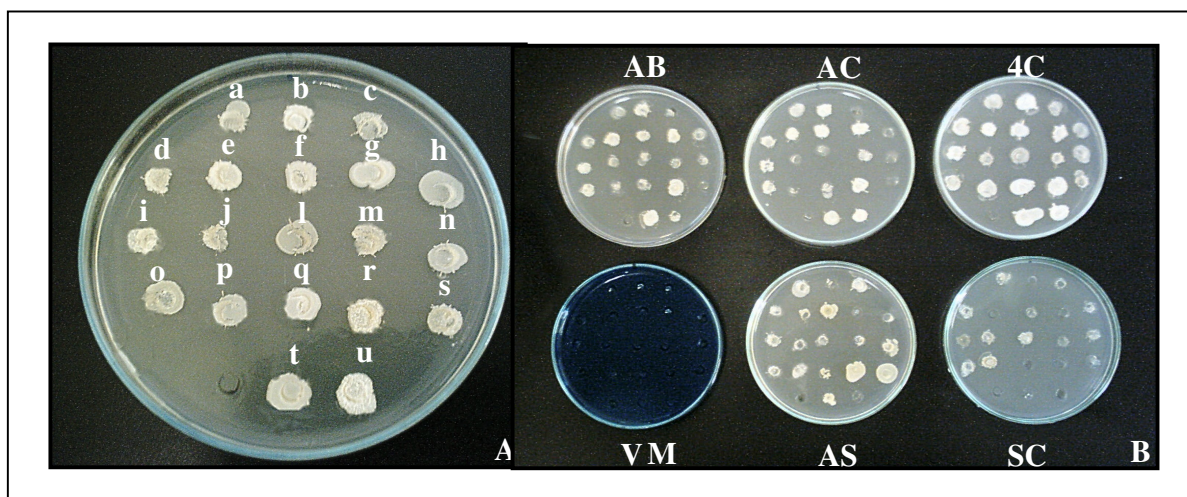


Figura 14. A – Placa controle do resistograma apresentando de “a” a “u” crescimento dos isolados de *Candida*. B – Placas-teste evidenciando presença e/ou ausência de crescimento dos isolados de *Candida* frente aos compostos químicos [AB= Ácido Bórico, AC= Acrilamida, 4C= 4-Clororesorcinol, VM= Verde Malaquita, AS= Arseniato de Sódio, SC= Sulfato de Cobre].

Tabela 9. Resistotipos dos isolados de *Candida*.

Cultura	Espécies	AB	AC	4C	VM	AS	SC
6078	<i>Candida albicans</i>	A	B	C	-	E	F
6076	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	F
2251	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	F
3716	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	F
4127	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	F
4606	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	F
4609	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	F
4848	<i>C. dubliniensis</i>	A	B	C	-	E	F
4986	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	F
4987	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	F
4990	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	F
6073	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	F
6074	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	F
6075	<i>C. albicans</i>	A	(B)	C	-	E	F
3629	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	(F)
4803	<i>C. dubliniensis</i>	A	B	C	-	E	(F)
4126	<i>C. albicans</i>	A	(B)	C	-	E	(F)
2224	<i>C. albicans</i>	(A)	B	C	-	(E)	(F)
3620	<i>C. albicans</i>	(A)	(B)	C	-	E	(F)
0113	<i>C. stellatoidea</i>	A	B	C	-	E	-
6077	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	-
3625	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	-
3628	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	-
3719	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	E	-
4822	<i>C. dubliniensis</i>	A	B	C	-	E	-
4823	<i>C. dubliniensis</i>	A	B	C	-	E	-
4827	<i>C. dubliniensis</i>	A	B	C	-	E	-
4448	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	(E)	-
0362	<i>C. albicans</i>	(A)	(B)	C	-	(E)	-
2883	<i>C. albicans</i>	-	B	C	-	E	F
4124	<i>C. albicans</i>	-	(B)	C	-	E	F
4819	<i>C. albicans</i>	A	-	C	-	E	F
4820	<i>C. albicans</i>	A	-	C	-	E	F
4260	<i>C. albicans</i>	A	-	C	-	E	F
4384	<i>C. albicans</i>	(A)	-	C	-	E	F
4388	<i>C. albicans</i>	(A)	-	C	-	(E)	(F)
4825	<i>C. dubliniensis</i>	A	B	C	-	-	-
3622	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	-	-
3626	<i>C. albicans</i>	A	B	C	-	-	-
2252	<i>C. albicans</i>	(A)	B	C	-	-	-
0720	<i>C. albicans</i>	(A)	(B)	C	-	-	-
4125	<i>C. albicans</i>	-	-	C	-	E	F
2253	<i>C. albicans</i>	A	-	C	-	E	-
4824	<i>C. dubliniensis</i>	A	-	C	-	E	-
4386	<i>C. albicans</i>	(A)	-	C	-	(E)	-
6070	<i>C. stellatoidea</i>	A	-	C	-	-	F
4385	<i>C. albicans</i>	(A)	-	C	-	-	F
6072	<i>C. stellatoidea</i>	A	-	C	-	-	-
1091	<i>C. albicans</i>	(A)	-	C	-	-	-
3623	<i>C. albicans</i>	(A)	-	C	-	-	-
0110	<i>C. albicans</i>	-	-	C	-	E	-
0743	<i>C. albicans</i>	-	-	(C)	-	E	-
0835	<i>C. albicans</i>	-	-	C	-	-	F
4387	<i>C. albicans</i>	-	-	C	-	-	F
6071	<i>C. stellatoidea</i>	-	-	C	-	-	-
1062	<i>C. stellatoidea</i>	-	-	(C)	-	-	-

AB= Ácido Bórico, AC= Acrilamida, 4C= 4-Clororesorcinol, VM= Verde Malaquita, AS= Arsenato de Sódio, SC= Sulfato de Cobre, A; B; C; D; E; F= Crescimento total, (A); (B); (C); (D); (E); (F)= Crescimento parcial e [-]= Ausência de crescimento.

Houve uma ampla distribuição de resistotipos dentre os substratos originais (Tabela 10), como ocorrido nos trabalhos publicados por Ghannoum et al. (1985), Hunter e Fraser (1987), Khan et al. (2003). Porém, isolados provenientes de candidíase sistêmica, como de sangue e líquido, fluidos orgânicos naturalmente isentos de microrganismos, apresentaram resistência a todos os compostos testados, exceto ao verde malaquita.

Os perfis verificados nos isolados provenientes do trato respiratório (secreção brônquica, esputo, secreção nasal) foram bastante heterogêneos (Tabela 10), não havendo possibilidade de correlacionar um resistotipo em especial com o substrato de origem. Este dado está corroborado por diversos autores, os quais observaram o mesmo resistotipo em isolados de sítios anatômicos distintos (WARNOCK et al., 1979; MEINHOF, 1982).

O resistotipo [ABC-(E)-] verificado em um isolado de *C. albicans* (4448) obtido a partir de solo de praia difere do resistotipo (ABC-E-) observado em isolados de *C. albicans* (4822, 4823, 4827 e 6077) obtidos de escamas ungueais, apenas no crescimento parcial na placa contendo arseniato de sódio, o que pode sugerir o potencial de uma amostra ambiental em causar onicomicose. Contudo em 1982, McCreight e Warnock demonstraram que um isolado sapróbio é capaz de causar lesão na cavidade oral.

Embora as amostras de *C. albicans*, procedentes da Coleção de Culturas do Japão, tenham apresentado o mesmo resistotipo, não significa tratar-se do mesmo isolado. Este fato é mencionado por McCreight e Warnock (1982), ao lembrar que outros aspectos como biotipos, sorotipos, morfotipos, entre outros, podem diferir, sendo necessário aplicar provas adicionais para uma completa discriminação.

Segundo Warnock et al. (1979), o método realizado é uma proposta prática que possibilita a distinção de um grande número de isolados de *C. albicans*, uma vantagem em relação ao método sorológico de Hanseclever e Mitchell (1961) que é capaz de distinguir dois grupos apenas. Hunter e Fraser (1989), após compararem quatro diferentes métodos de diferenciação para essa espécie, avaliaram o resistograma, juntamente com a morfotipagem, como a melhor combinação.

O método do resistograma é válido para distinção entre isolados de *C. albicans*, entretanto não foi possível diferenciar a virulência entre as amostras e as

concentrações de 4-clororesorcinol e verde malaquita devem ser modificadas, assim como proposto por Warnock et al. (1979) e McCreight; Warnock, (1982).

Tabela 10. Resistotipos de *Candida* em relação aos substratos.

Substrato	Espécie	Resistotipo	Quantidade de isolados
Secreção Brônquica	<i>C. albicans</i>	ABC-EF	1
	<i>C. albicans</i>	(A)(B)C-E(F)	1
	<i>C. albicans</i>	(A)(B)C---	1
Esputo	<i>C. albicans</i>	ABC-E(F)	1
	<i>C. albicans</i>	ABC-E-	2
	<i>C. albicans</i>	ABC---	2
	<i>C. albicans</i>	-(B)C-EF	1
	<i>C. albicans</i>	(A)-C---	1
Secreção Nasal	<i>C. albicans</i>	(A)BC-(E)(F)	1
Secreção Orofaríngea	<i>C. albicans</i>	A-C-EF	1
	<i>C. albicans</i>	(A)-C-(E)(F)	1
	<i>C. albicans</i>	(A)-C-EF	1
	<i>C. albicans</i>	(A)-C--F	1
	<i>C. albicans</i>	(A)-C-(E)-	1
	<i>C. albicans</i>	-(B)C-EF	1
	<i>C. albicans</i>	--C--F	1
Mucosa Oral	<i>C. albicans</i>	(A)BC---	1
Dente	<i>C. albicans</i>	ABC-EF	1
	<i>C. albicans</i>	ABC-E-	1
Secreção Vaginal	<i>C. albicans</i>	ABC-EF	3
	<i>C. albicans</i>	--(C)-E-	1
Urina	<i>C. albicans</i>	A(B)C-E(F)	1
Sangue	<i>C. albicans</i>	ABC-EF	2
Líquor	<i>C. dubliniensis</i>	ABC-EF	1
Região inguinal	<i>C. albicans</i>	ABC-EF	1
Escamas ungueais	<i>C. albicans</i>	ABC-EF	1
	<i>C. albicans</i>	A-C-EF	3
	<i>C. dubliniensis</i>	ABC-E-	3
	<i>C. albicans</i>	ABC-E-	1
	<i>C. albicans</i>	A(B)C-EF	1
	<i>C. dubliniensis</i>	ABC---	1
	<i>C. dubliniensis</i>	A-C-E-	1
	<i>C. albicans</i>	A-C-E-	1
	<i>C. albicans</i>	--C--F	1
	<i>C. albicans</i>	ABC-(E)-	1
Excremento	<i>C. albicans</i>	ABC-E(F)	1
Solo de Praia Sem substrato	<i>C. stellatoidea</i>	ABC-E-	1
	<i>C. dubliniensis</i>	ABC-E(F)	1
	<i>C. albicans</i>	(A)(B)C-E-	1
	<i>C. albicans</i>	-BC-EF	1
	<i>C. albicans</i>	--C-E-	1
	<i>C. albicans</i>	(A)-C---	1
	<i>C. stellatoidea</i>	--(C)---	1
	<i>C. albicans</i>	ABC-EF	2
	<i>C. stellatoidea</i>	A-C--F	1
	<i>C. stellatoidea</i>	A-C---	1
	<i>C. stellatoidea</i>	--C---	1

5.4 Detecção de Atividade Proteolítica

Entre os 56 isolados submetidos à avaliação da capacidade de produzir protease, foi verificado que dos 44 isolados inicialmente identificados como *C. albicans*, em 27 foi detectada esta enzima, com uma zona de atividade que variou de 0,67 a 0,95cm. A menor zona de atividade a qual expressa moderada atividade proteásica ocorreu em dois isolados (1091 e 4986) sendo o primeiro considerado após os testes como *C. parapsilosis*. Os isolados que se expressaram fracamente em relação a esta enzima foram 24 (362, 743, 835, 2251, 2883, 3622, 3625, 3626, 3628, 3629, 3716, 3719, 4384, 4385, 4448, 4606, 4819, 4987, 4990, 6073, 6074, 6075, 6076, 6078), destes, um isolado (362) passou de acordo com as características fenotípicas testadas à *C. dubliniensis*. A não detecção de atividade proteolítica ocorreu em 18 amostras, estando incluída a *C. famata* (2253) anteriormente *C. albicans* (Tabela 11; Figura 15).

Dos sete isolados de *C. dubliniensis* a atividade proteolítica foi ausente apenas em um (4803) e nos demais foi evidenciada fracamente variando a zona de atividade de 0,71 a 0,96cm, estes foram renomeados para *C. albicans* mediante a evidência do conjunto de características verificados nos testes de formação de tubo germinativo, produção de clamidosporo, atividade da β -glicosidase, temperatura de crescimento e assimilação de fontes de carbono (Tabela 12; Figura 16).

Com relação às amostras nomeadas anteriormente de *C. stellatoidea*, uma (1062) não apresentou atividade proteolítica enquanto que quatro expressaram fracamente e a zona de atividade variou de 0,63 a 0,84cm; destas uma (113) passou a ser *C. albicans* (Tabela 13; Figura 17).

Estes achados estão em consonância com outros descritos na literatura, os quais demonstram diversidade na atividade proteásica por isolados de *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* (*C. albicans*) (AL-HEDAITHY; FOTEDAR, 2002; KANTARCIOGLU; YÜCEL, 2002). Chaves et al. (2003) trabalhando com isolados estocados em Coleção de Culturas e mantidos em óleo mineral, também verificaram diferença na produção de protease entre amostras de *C. albicans*. Variações desta expressão enzimática também foram mencionadas em outras pesquisas e ainda a não detecção por esta espécie (KANTARCIOGLU; YÜCEL, 2002). A produção desta enzima é considerada como fator de patogenicidade entre as leveduras, determinando segundo vários

pesquisadores o diferencial entre espécies distintas e isolados de uma mesma espécie (KWON-CHUNG; BENNET, 1992; LACAZ et al., 2002).

Tabela 11. Detecção de atividade proteolítica dos isolados de *Candida albicans*.

Nº de Registro	Espécie	Protease 37°C ZA (cm)
110	<i>Candida albicans</i>	0
362	<i>C. albicans</i>	0.93
720	<i>C. albicans</i>	0
743	<i>C. albicans</i>	0.80
835	<i>C. albicans</i>	0.83
1091	<i>C. albicans</i>	0.67
2224	<i>C. albicans</i>	0
2251	<i>C. albicans</i>	0.80
2252	<i>C. albicans</i>	0
2253	<i>C. albicans</i>	0
2883	<i>C. albicans</i>	0.87
3620	<i>C. albicans</i>	0
3622	<i>C. albicans</i>	0.91
3623	<i>C. albicans</i>	0
3625	<i>C. albicans</i>	0.88
3626	<i>C. albicans</i>	0.81
3628	<i>C. albicans</i>	0.90
3629	<i>C. albicans</i>	0.90
3716	<i>C. albicans</i>	0.95
3719	<i>C. albicans</i>	0.95
4124	<i>C. albicans</i>	0
4125	<i>C. albicans</i>	0
4126	<i>C. albicans</i>	0
4127	<i>C. albicans</i>	0
4260	<i>C. albicans</i>	0
4384	<i>C. albicans</i>	0.86
4385	<i>C. albicans</i>	0.88

Cont. Tabela 11

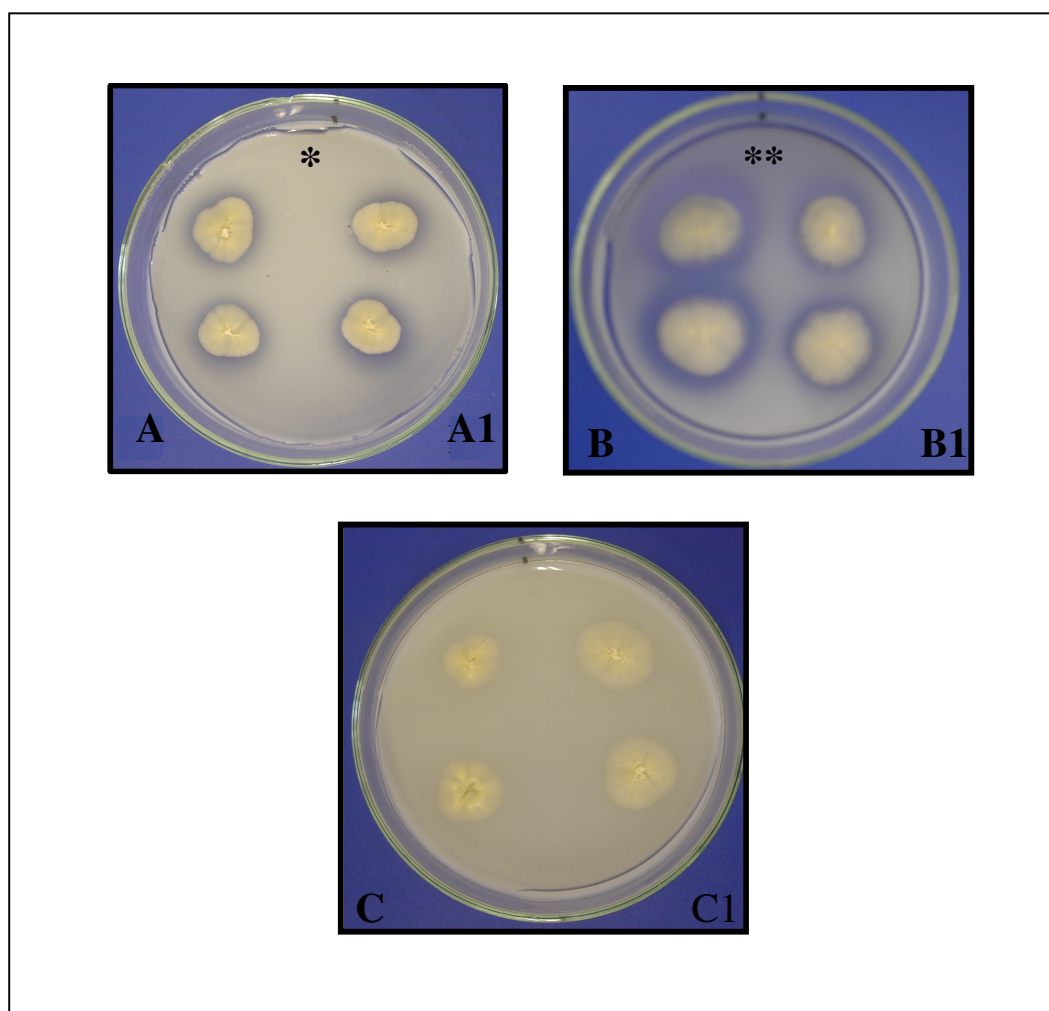
Nº de Registro	Espécie	Protease 37°C ZA(cm)
4386	<i>C. albicans</i>	0
4387	<i>C. albicans</i>	0
4388	<i>C. albicans</i>	0
4448	<i>C. albicans</i>	0.90
4606	<i>C. albicans</i>	0.87
4609	<i>C. albicans</i>	0
4819	<i>C. albicans</i>	0.74
4820	<i>C. albicans</i>	0
4986	<i>C. albicans</i>	0.67
4987	<i>C. albicans</i>	0.86
4990	<i>C. albicans</i>	0.77
6073	<i>C. albicans</i>	0.80
6074	<i>C. albicans</i>	0.88
6075	<i>C. albicans</i>	0.94
6076	<i>C. albicans</i>	0.93
6077	<i>C. albicans</i>	0
6078	<i>C. albicans</i>	0.86

Tabela 12. Detecção de atividade proteolítica dos isolados de *Candida dubliniensis*.

Nº de Registro	Espécie	Protease 37°C ZA(cm)
4822	<i>Candida dubliniensis</i>	0.81
4823	<i>C. dubliniensis</i>	0.96
4824	<i>C. dubliniensis</i>	0.71
4825	<i>C. dubliniensis</i>	0.89
4827	<i>C. dubliniensis</i>	0.86
4848	<i>C. dubliniensis</i>	0.80
4803	<i>C. dubliniensis</i>	0

Tabela 13. Detecção de atividade proteolítica dos isolados de *Candida stellatoidea*.

Nº de Registro	Espécie	Protease 37°C ZA(cm)
113	<i>C. stellatoidea</i>	0.84
1062	<i>C. stellatoidea</i>	0
6070	<i>C. stellatoidea</i>	0.71
6071	<i>C. stellatoidea</i>	0.71
6072	<i>C. stellatoidea</i>	0.63

**Figura 15. Atividade proteolítica (moderada*: A-4986, A1-1091, fraca**: B-362, B1-3719 e ausente: C-720, C1-4126) por *Candida albicans*.**

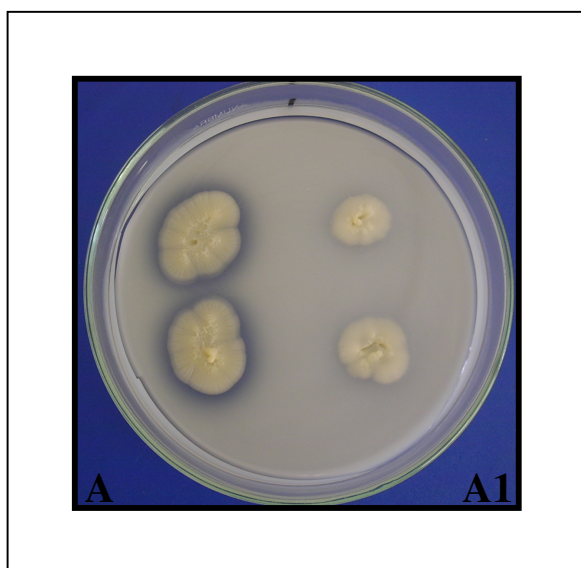


Figura 16. Atividade proteolítica (fraca: A-4822 e ausente:A1-4803) por *Candida dubliniensis*.

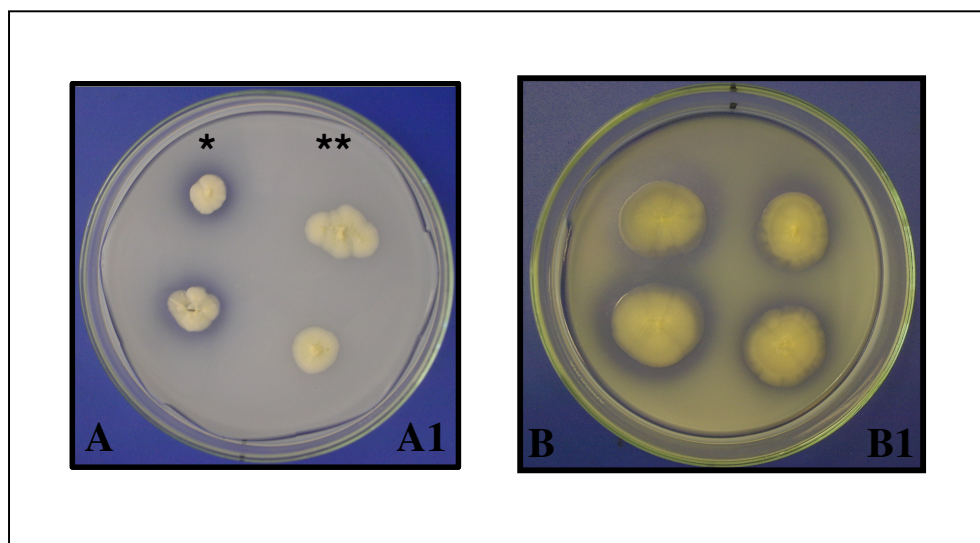


Figura 17. Atividade proteolítica (moderada* A-6072, negativa** A1-1062 e fraca B-113, B1-6071) por *Candida stellatoidea*.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir:

- Isolados de *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* preservados em óleo mineral por longo período mantêm sua viabilidade.
- A revisão taxonômica é indispensável para o desenvolvimento de pesquisas com leveduras preservadas.
- A produção de tubo germinativo não é indicada para distinguir *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*.
- Parâmetros como produção de clamidosporos, assimilação de xilose e sacarose, devem ser utilizados para diferenciar *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*.
- Atividade da β -glicosidase pode ocorrer em *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*.
- Crescimento a 45°C pode ou não ocorrer em *C. albicans* e *C. stellatoidea* e não ocorre em *C. dubliniensis*.
- Isolados de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* podem ser sensíveis ou resistentes a ácido bórico, acrilamida, arseniato de sódio e sulfato de cobre.
- Isolados de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* são sensíveis ao Verde Malaquita nas concentrações de 0,024mg/mL a 0,036mg/mL.
- Isolados de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* são resistentes a 4-Clororesorcinol nas concentrações de 0,33mg/mL a 0,49mg/mL.
- Diferentes isolados de uma mesma espécie apresentam resistotipos variados.
- Não há clara correlação entre patogenicidade e resistotipos de *Candida*.
- *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* podem apresentar atividade proteolítica moderada, fraca ou ausente, quando utilizado soro de albumina bovina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-ELTEEN, K.H. *Candida albicans* strain differentiation in complete denture wearers. **New Microbiol.** v. 23, n.3, p. 329-337, 2000.

AHEARN, D. G. Systematics of yeasts of medical interest. In: International Symposium on Mycoses. Washington, 1970. **Proceedings. Scient. Publ.** Washington, PAHO, v. 295, p. 64-70, 1970.

AL-HEDAITHY, S. S. A.; FOTEDAR, R. Recovery and studies on chlamydospore-negative *Candida albicans* isolated from clinical specimens. **Med. Mycol.**, v. 40, p.301-306, 2002.

ALMEIDA, N. Q. **Influência da produção de hialuronidase, proteinase, condroitin-sulfatase e fosfolipase por algumas espécies de *Candida* sobre a patogenicidade para camundongos.** São José dos Campos, 1991. (Tese de livre docência. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos).

ALVES, S.H.; OLIVEIRA, L.T.O.; SANTÚRIO, J.M. A importância de *Candida dubliniensis* no diagnóstico laboratorial das micoses oportunistas. **Rev. Bras. Anál. Clin.** v. 32, n. 2, p. 65-68, 2000.

AOKI, S.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, Y.; MASUHARA, T. Comparative pathogenicity of wild-type strains and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. **Zol. Bakt.** v. 273, p. 332-343, 1990.

AOKI, S.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; NINOMIYA, K.; VIDOTTO, V. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia.** v.128, p. 143-150, 1994.

ATCC. [Http://www.atcc.org/About/AboutATCC.cfm](http://www.atcc.org/About/AboutATCC.cfm), 2005. Acesso em 11 de novembro de 2005.

BARNETT, J.A.; PAINE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. University Press, Cambridge, 1990, 1002p.

BOERLIN, P.; BOERLIN-PETZOLT, F. DURUSSEI, C.; ADDO, M.; PAGANI, J.; CHAVE, P.; BILLE, J. Cluster of atypical *Candida* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. **J. Clin. Microbiol.** v. 33, p. 1129-1135, 1995.

BORG, M.; RUCHEL, R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. **Infect. Immun.** v. 56, p. 626-631, 1988.

BROWN-THOMSEN, J. Variability in *Candida albicans* (Robin) Berkhout. I. Studies on morphology and biochemical activity. **Hereditas.** v. 60, p. 335-398, 1968.

CALICH, V. L. G. et al. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia.** v. 66, p. 175-177, 1978.

CHAVES, G.M.; CAVALCANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F. Pathogenicity Characteristics of Stocked and Fresh Yeasts Strains. **Braz. J. Microbiol.** v. 34, p. 197-202, 2003.

CASTELANI, A.; Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researchs. **J. Trop. Medic. Hyg.** v. 70, p. 181-184, 1967.

CAVALCANTI, M.A.; SOUZA-MOTTA, C.M.; NOGUEIRA, E.B.S. **Catálogo da Coleção de Culturas da Micoteca URM, Recife-PE**. Editora Universitária da UFPE, 3ª ed., 1996, 109p.

CHRISTENSEN, W.B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and Paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **J. Bact.** v. 52, p. 461-466, 1946.

CORRÊA, B. **Avaliação da eficácia do método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) no estudo da viabilidade de amostras de leveduras não capsuladas (*Candida albicans*) e capsuladas (*Cryptococcus neoformans*).** Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da USP. São Paulo, 1984.

CORRÊA, B. et al. Método fluorescente para estudo da viabilidade de células fúngicas em materiais clínicos. **Rev. Microbiol.** São Paulo, v. 20, p. 349-357, 1989.

COWAM, S.T.; STEEL, K.J. **Manual for the Identification of Medical Bacteria**, University Press, Cambridge, 1965, 86 p.

DE BERNARDIS, F.; ADRIANI, D.; LORENZINI, R.; PONTIERI, E.; CARRUBA, G.; CASSONE, A. Filamentous growth and elevated vaginopathic potencial of a non-germinative variant of *Candida albicans* expressing low virulence in systemic infection. **Infect. Immun.**, 61: 1500-1508, 1993.

DIDDENS, H.A.; LODDER, J. Die anaskosporogenen hefen. Amsterdam, North Holland, Publishing company, 1942.

ELEK, S.D.; HIGNEY, L. Resistogram typing – a new epidemiological tool: application to *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v.3, n.1, p.103-110, 1970.

ELEK, S.D.; DAVIES, J.R.; MILLES, R. Resistotyping of *Shigella sonnei*. **J. Med. Microbiol.** v. 6, p. 329-344, 1973.

ELEK, S.D.; MORYSON, C. Resistotyping of *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.** v. 7, n. 2, p. 237-249, 1974.

FEO, M. *Candida albicans*: studies on the production of clamidospores. *In*: International Conference on the Mycoses. The black and white yeasts, 4th. Brasília, 1977. **Proceedings** Washington, PAHO. Scient. Publ. v. 356, p. 235-236, 1978.

FOONGLADDA, S.; HAOUHARN, P.; SAKULMAIWATANA, P.; CHAIPRASERT, A. Comparative evaluation of Candi *Select* test and conventional methods for identification of *Candida albicans* in routine clinical isolates. **Mycosis**, v. 45, p. 75-78, 2002.

FUKAZAWA, Y; KAGAYA, K. Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 35, p.87-99, 1997.

GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; HOSUTON, A. K.; JOLY, S.; SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. C.; SOLI, D. R. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and α -metil-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC systems. **J. Clin. Microbiol.** v. 37, n. 12, p. 3804-3808, 1999.

GALLAGHER, P.J.; BENNETT, D.E.; HENMAN, M.C.; RUSSELL, R.J.; FLINT, R.; SHANLEY, D.B.; COLEMAN, D.C. Reduced azole susceptibility of oral isolates of *Candida albicans* from HIV- positive patients and a derivative exhibiting colony morphology variation. **Gen. Microbiol.** v. 138, p. 1901-1911, 1992.

GHANNOUM, M.A.;MOTAWY, M.S.;AL-MUBAREK, A.L.; AL-AWADHI, H.A. *Candida albicans* strain differentiation in cancer patients undergoing therapy. **Mykosen.** v. 28, p. 388-393, 1985.

GHANNOUM, M. A.; SWAIRJO, I.; SOLL, D. R. Variation in lipid and sterol contents in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 28, p. 103-115, 1990.

GUTTER, Y.; BARKAI-GOLAN, J.F. Observations on some fungi and other microorganisms preserved under mineral oil for 15 years. **Isr. J. Botany.** v. 16, p. 105-107, 1967.

HANEL, H.; KIRS, R.; SCHMIDIS, H. New systematically active antimycotics from the beta-blocher category. **Mycoses.** v. 38, p. 251-264, 1995.

HANSECLEVER, H.F.; MITCHELL, W.O. Antigenic studies of *Candida*. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. **J. Bacteriol.** v. 82, p. 570-573, 1961.

HAWKSWORTH, D.L.; KIRSOP, B.E. **Filamentous fungi: living resources for biotechnology.** New York: Cambridge University Press, 1998. 209p.

HAYNES, W.C.; WICKERHAN, L.J.; HESSELTINE, C.W. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. **Appl. Microbiol.** v. 3, p. 361-372, 1955.

HECKLY, R.J. Preservation of microorganisms. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 24, p. 1-53, 1978.

HOOG, G.S.; GUARRO, J. **Atlas of clinical fungi.** The Netherlands: Central Bureau voor Schimmelcultures/ Reus (Spain), Universitat Rovira i Virgili, 1995, 720p.

HOOG GS, GUARRO J, GENÉ J, FIGUERAS MJ. **Atlas of Clinical Fungi**, 2nd edn. The Netherlands: Centralbureau voor Schimmelculture, 2000.

HUNTER, P.R. Discrimination of strains of *Candida albicans* isolated from deep and superficial sites by resistotyping. **Mycoses.** v. 38, n. 1, p. 37-40, 1995.

HUNTER, P.R.; FRASER, C.A.M. Use of a modified resistogram to type *Candida albicans* isolated from cases of vaginitis and from faeces in same geographical area. **J. Clin. Pathol.** v. 40, p. 1159-1161, 1987.

HUNTER, P.R.; FRASER, C.A.M. Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.** v. 27, n.10, p. 2156-60, 1989.

HUNTER, P.R.; HARRISON, G.A.J.; FRASER, C.A.M. Cross-infection and diversity of *Candida albicans* strain carriage in patients and nursing staff on an intensive care unit. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 28, p. 317-325, 1990.

IFO. [Http://www.ifo.or.jp/about_e/ab_fe1.html](http://www.ifo.or.jp/about_e/ab_fe1.html), 2004. Acesso em 11 de novembro de 2005.

KANTARCIOGLU, A.S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the source of strains. **Mycoses.** v. 45, p. 160-165, 2002.

KASHBUR, I.M.; GEORGE, R.H.; AYLIFFE, G.A. Resistotyping of *Proteus mirabilis* and a comparison with other methods of typing. **J. Clin. Pathol.** v. 27, n.7, p. 572-577, 1974.

KHAN, Z.U.; CHANDY, R.; METWALI, K.E. *Candida albicans* strain carriage in patients and nursing staff of an intensive care unit: a study of morphotypes and resistotypes. **Mycoses.** v. 46, p. 479-486, 2003.

KIRSOP, B.E.; KURTZMAN, C.P **Yeasts: living resources for biotechnology.** New York: Cambridge University Press, 1998, 233p.

KOBAYASHI, S.D.; CUTLER, J.E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role? **Trends Microbiol.** v. 6, p. 92-94, 1998.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The Yeast: A Taxonomic Study**. Elsevier Sci. Publication, Amsterdam, 1984, 1091p.

KRETSCHMAR, M.; HUBE, B.; BERTSCH, T.; SANGLARD, D.; MERKER, R.; SCHRÖDER, M.; HOF, H.; NICTERLEIN, T. Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. **Infect. Immun.** v. 67, n. 12, p. 6637-6642, 1999.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts, A Taxonomic Estudy**. 4ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1998. 1055p.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNET, J.E. Dermatophytoses. **Med. Mycol.**, Philadelphia/London: Lea; Febiger, 1992, 130 p.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 9^a ed. Sarvier, São Paulo, 2002, 1.104p.

LITTLE, G.N.; GORDON, M.A. Survival of fungus cultures maintained unde mineral oil for twelve years. **Mycologia**. v. 59, p. 784-788, 1967.

LODDER, J.; KREGER-VAN RIJ, N.J.W. Characteristics and methods used in the classification. **In: The Yeasts. A taxonomic study**. Amsterdam: North Holland, 1952.

LODDER, J. **The Yeast: A Taxonomic Study**. North Holland Publishing Company, Oxford, 1970, 1385p.

MATTIA, E.; CARRUBA, G.; ANGIOLELLA, L.; CASSONE, A. Induction of germ tube formation by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*: uptake of inducer and germinative response. **J. Bacteriol.** v. 152, n. 2, p. 555-562, 1982.

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

MCCREIGHT, M.C.; WARNOCK, D.W.; WATKINSON, A.C. Prevalence of different strains of *Candida albicans* in patients with denture-induced stomatitis. **Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol.** v. 22, p. 83-85, 1984.

MCCREIGHT, M.C.; WARNOCK, D.W.; MARTIN, M.V. Resistogram typing of *Candida albicans* isolates from oral and cutaneous sites in irradiated patients. **Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol.** v. 23, n. 6, p. 403-406, 1985.

MEINHOF, W. Demonstration of typical features of individual *Candida albicans* strains as a means of studying sources of infection. **Chemoter.** v. 28, n. 1, p. 51-55, 1982.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 67, p. 400-428, 2003.

NAKAMOTO, S. Promotion of chlamydoconidium formation in *Candida albicans* by corn meal broth incubation. **Med. Mycol.** v. 36, p. 123-125, 1998.

NAKAMURA, K.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, Y.; AOKI, S.; VIDOTTO, V.; SINICCO, A. Resistogram typing of oral *Candida albicans* isolates from normal subjects in three successive trials. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 15, p. 19-21, 1998.

NEGRONI, P. Variación hacia el tipo R de *Mycothorula albicans*. **Rev. Soc. Argentina Biol.** v. 11, p. 449-453, 1936.

NOTARIO, V. β -glucosidase from *Candida albicans*: purification, characterization and the nature of their attachment to cell wall components. **J. Gen. Microbiol.** v. 128, p. 747-759, 1982.

ODDS, F.C.; ABBOTT, A.B. A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strain within the species. **Sabouraudia.** v. 18, p. 301-317, 1980.

ODDS, F.C. ***Candida and candidosis***. 2.ed Bailliere Tindall: London, 1988.

ODDS, F.C. *Candida* species and virulence. **ASM News.** V. 60, p. 313-318, 1994.

ODDS, F. C.; NUFFEL, L. C.; DAMS, G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, n. 10, p. 2869-2873, 1998.

PINJÓN, E.; SULLIVAN, D.; SALKIN, I.; SHANLEY, D.; COLEMAN, D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, n. 7, p. 2093-2095, 1998.

PHELPS, M.; AYLIFFE, G.A.; BABB, J.R. An outbreak of candidiasis in a special care baby unit: the use of a resistogram typing. **J. Hosp. Infect.** v. 7, n.1, p. 13-20, 1986.

PHONGPAICHIT, S.; MACKENZIE, D.W.R.; FRASER, C.A.M. Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. **Epidemiol. Infect.** v. 99, p. 421-428, 1987.

POLACHECK, I.; MELAMED, M.; BERCOVIER, H.; SALKIN, I.F. β -glucosidase in *Candida albicans* and its application in yeast identification. **J. Clin. Microbiol.** v. 25, n.5, p. 907-910, 1987.

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

RAM, S.P.; ROMANA, L.K.; SHEPERD, M.G.; SULLIVAN, P.A. Exo-(1-3)- β -glucanase autolysin and trehalase activities during yeast growth and germ-tube formation in *Candida albicans*. **J. Gen. Microbiol.** v. 130, p. 1227-1236, 1984.

RAPER, K.B.; ALEXANDER, D.F. Preservation of molds by lyophil process. **Mycologia.** v. 37, p. 499-525, 1945.

RENOLDS, R.; BRAUDE, A. The filament inducing property of blood for *Candida albicans*: its nature and significance. **Clin. Res. Proceed.** v. 4, p. 40, 1956.

RIPPON, J.W. **Medical Mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes.** Philadelphia, PA: Saunders Company, 1982, 842 p.

ROJAS PEDRAL, de las M. E. **Avaliação da eficiência do método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) no estudo da viabilidade de células de leveduriformes de *Sporothrix schenckii*.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1983.

ROMAN, M.C.; SICILLIA, M.J.L. Preliminary investigation of *Candida albicans* biovars. **J. Clin. Microbiol.** v. 18, p. 430-431, 1983.

RUCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A. A camparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia.** v. 20, p. 233-244, 1982.

SANT'ANA, P.L.; MILAN, E.P.; MATTA, D.A.; COLOMBO, A.L. *Candida dubliniensis* identification in brazilian yeast stock collection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.98, n. 4, p. 533-538, 2003.

SCHALLER, M.; MAILHAMMER, R.; GRASSI, G.; SANDER, C.A.; HUBE, B.; KORTING, H.C. Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine

expression correlated to the degree of virulence. **J. Investig. Dermatol.** v. 118, p. 652-657, 2005.

SCHMID, J.; HUNTER, P.R.; WHITE, G.C.; NAND, A.K.; CANNON, R.D. Physiological trains associated with success of *Candida albicans* strains as commensal colonizers and pathogens. **J. Clin. Microbiol.** v. 33, n. 11, p. 2920-2926, 1995.

SCHOOFS, A.; ODDS, F. S.; COLEBUNDERS, R.; LEVEN, M.; GOOSENS, H. Use of specialized isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. **Eur. J. Clin. Infect. Dis.** v. 16, p. 296-300, 1997.

SHERF, A.F. A method for maintaining *Phytophthora sepioides* for long periods without transf. **Phytopathology.** v. 31, p. 30-32, 1943.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 388 p. .

SMITH, D.; ONIONS, A.H.S. **The Preservation and Maintenance of Living Fungi.** Commonwealth Mycological Institute, 1983.

STAIB, F. Serum proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. **Sabouraudia.** v. 4, p. 187-193, 1965.

STAIB, F.; ARASTÉH, K. Chlamydospore formation on Staib Agar. Observations made before *Candida dubliniensis* was described. **Mycosis.** v. 44: 23- 27, 2001.

SULLIVAN, D.J.; WESTERNENG, T.J.; HAYNES, K.A.; BENNETT, D.E.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology.** v. 141, p. 1507-1521, 1995.

SULLIVAN, D.J.; HAYNES, K.A.; BILLE, J.; BOERKIN, P.; RODERO, L.; LLOYD, S.; HERMAN, M.; COLEMAN, D.C. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. **J. Clin. Microbiol.** v. 35, p. 960-964, 1997.

SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, p. 329-334, 1998.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.; DONNELLY, S.; GEE, S.; PINJON, E.; MCCARTAN, B.; SHANLEY, D.B.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis*: An update. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 16, p. 72-76, 1999.

TANDON, G.P.; DAYAL, H.M.; MEHTA, K.; PANT, H.C.; PANDEY, R.S.; TRIVEDI, J.P. Observation on preservation of fungal cultures by serial subculturing and liquid paraffin. **Curr. Sci.** v. 56, n. 17, p. 895-896, 1987.

VIDOTTO, V.; KOGA-ITO, C. Y.; CANELLA, D.; SINICCO, A.; PERRI, G. D.; AOKI, S.; ITO-KUWA, S. Extracellular activity in *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients and from environmental sources. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 17, p. 14-19, 2000.

WARNOCK, D.W.; SPELLER, D.C.E.; DAY, J.K.; FARRELL, A.J. Resistogram method for differentiation of strains of *Candida albicans*. **J. Appl. Bacteriol.** v. 46, p. 571-78, 1979.

WDCM. [Http://www.wdcn.nig.ac.jp/hpcc.html](http://www.wdcn.nig.ac.jp/hpcc.html), 2005. Acesso em 06 de janeiro de 2006.

WELLMER, A.; BERNHARDT, H. Adherence on buccal epithelial cells and germ tubes formation in the continuous flow culture of clinical *Candida albicans* isolates. **Mycosis.** v. 40, p. 363-368, 1997.

WFCC. [Http://www.wfcc.info/aboutwfcc.html](http://www.wfcc.info/aboutwfcc.html), 2005. Acesso em 11 de novembro de 2005.

WILLIAMSON, M.I.; SAMARANAYAKE, L.P.; MACFARLANE, T.W. Biotypes of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 24, p. 81-84, 1986.

Herculano, Polyanna Nunes

Perfil taxonômico das culturas de *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* estocadas na micoteca URM, Universidade Federal de Pernambuco / Polyanna Nunes Herculano. – Recife : O Autor, 2006.

78 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2006.

Inclui bibliografia.

1. Micologia – Leveduras. 2. *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* – Taxonomia – Resistência a compostos químicos – Detecção de diferentes resistotipos. 3. Viabilidade – Confirmação taxonômica – Método de preservação – Eficácia. 4. Atividade proteolítica – Espécies iguais - Variação. I. Título.

**582.282
579.56**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2006-268**