

FERRAMENTAS MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO DE CANDIDA ALBICANS (ROBIN) BERKHOUT (1923) EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS

Molecular tools for the characterization of *Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923) in epidemiological surveys

Marcelo Fabiano Gomes Boriollo ¹

José Francisco Höfling ²

Aline Mendes ³

Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa ⁴

Resumo

Essa revisão busca apresentar uma descrição dos principais recursos moleculares empregados em estudos epidemiológicos envolvendo candidoses. São abordados os recursos mais comumente empregados em Epidemiologia Molecular e baseados em polimorfismos protéicos (Eletroforese de Isoenzimas) e de ácidos nucléicos (Eletrocariotipagem, Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição, e Polimorfismos do DNA Amplificado ao Acaso). São apresentadas as características de cada método, bem como suas vantagens e desvantagens.

Palavras-chave: *Candida albicans*; Epidemiologia molecular; Tipagem; Proteínas; Ácidos Nucléicos.

Abstract

This review aims to show a brief description of molecular resources used in epidemiological surveys involving oral candidosis. The most commonly tools for Molecular Epidemiology are presented, in special, those based on protein polymorphisms (Isoenzyme Electrophoresis) and on nucleic acids (Electrokaryotyping, Restriction Fragment Length Polymorphism, and Randomly Polymorphic Amplified DNA). The features of each method are described as well as their advantages and disadvantages.

Keywords: *Candida albicans*; Molecular Epidemiology; Typing; Protein; Nucleic acids.

¹ Curso de Biomedicina, Faculdades Integradas Einstein de Limeira FIEL, Rua Santana, 33 Vila Queiroz 13485-023 Limeira/ SP. E-mail: marcelofgb@yahoo.com.br Professor Adjunto.

² Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas Professor Titular.

³ Laboratório de Estomatologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná Acadêmica de Biologia.

⁴ Laboratório de Estomatologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil. Rua Imaculada Conceição 1155, 80215-901. Email: edvaldo.rosa@pucpr.br Professor Adjunto.

Introdução

Candida albicans e espécies relacionadas são encontradas de forma ubíqua e comensal na microbiota de cavidades (retal, bucal, vaginal, uretral, nasal, aural) e pele humanas(1). Estas espécies são consideradas patógenos oportunistas capazes de causar infecções variando desde distúrbios mucocutâneas, não comprometedoras ao indivíduo, até doenças invasivas, envolvendo quase todos os órgãos. A frequência das infecções por *Candida* spp. vem aumentando mundialmente devido um uma multiplicidade de fatores predisponentes que facilitam um conversão da forma comensal à existência parasitária (2,3). O aumento destas infecções tem sido associado com deficiências imunológicas, conforme as observações de inúmeros casos de candidíase orofaríngea em pacientes com AIDS (4). A progressão da colonização para infecção em mucosas foi relatada como um processo dependente do mecanismo de defesa do hospedeiro e da habilidade de *Candida* spp. sobrepujar tal mecanismo (5). Diferentes manifestações clínicas de candidíase bucal foram descritas, as quais correspondem ao crescimento excessivo de leveduras e a sua penetração pela mucosa epitelial (6).

Para entender a dinâmica dos organismos infecciosos em populações humanas, interpretar o relacionamento complexo entre comensalismo e infecção, identificar a origem de uma infecção ou monitorar a emergência de linhagens resistentes a drogas, métodos moleculares baseados em sistemas fingerprinting genotípicos (marcadores moleculares) devem ser disponibilizados para acessar o relacionamento genético destes organismos de importância epidemiológica (7,8). Por definição, um isolado corresponde a um clone coletado independentemente de outros isolados. Dois isolados coletados independentemente podem ser completamente não relacionados ou geneticamente indistinguíveis. Em contraste, uma linhagem refere-se a uma coleção de isolados da mesma espécie, que são altamente relacionadas ou geneticamente

indistinguíveis Para classificar dois isolados como pertencentes à mesma linhagem, ou como membros de diferentes linhagens, métodos moleculares genotípicos sensitivos devem ser aplicados adequadamente para realizar estas funções. Esta necessidade é especialmente importante quando doenças emanam a partir de organismos comensais, quando linhagens tornam-se especializadas em determinadas localizações do corpo ou condições comprometedoras, quando linhagens sofrem microevolução para rápida adaptação, ou quando linhagens são transmitidas entre indivíduos. Por sua vez, os sistemas fingerprinting genotípicos devem ser examinados quanto à sua efetividade em diferentes níveis de discriminação: (i) identificar a mesma linhagem em isolados independentes; (ii) identificar mudanças microevolucionárias em uma linhagem (isolados altamente relacionados, porém não idênticos); (iii) agrupar isolados moderadamente relacionados; e (iv) identificar isolados completamente não relacionados. Além disso, tais sistemas também devem fornecer uma base de dados para a estimativa da probabilidade de uma particular linhagem ser isolada duas vezes ao acaso em determinado local geográfico (8).

Até o momento, nenhum método fingerprinting genotípico tem fornecido uma medida definitiva de distância genética entre dois isolados. Tibayrenc (1998) tem pronunciado, nitidamente de modo pungente, que não existem ainda meios para determinar por completo a identidade de dois genótipos microbianos, objeção ao seqüenciamento do genoma inteiro (9). Diferentes marcadores moleculares podem apresentar diferentes clocks moleculares (i.e., a velocidade evolucionária a qual eles mudam). Deste modo, um ótimo método fingerprinting genotípico deveria ser baseado em um número de marcadores moleculares. Tal método também deveria ser resistente à homoplasia (i.e., características comuns entre isolados que não apresentam um mesmo ancestral) e fornecer dados quantitativos que refletem distância genética. A comparação dos dados gerados por métodos fingerprinting genotípicos não relacionados, empregando um mesmo grupo de isolados

testes, tornou-se um meio para avaliar tais requerimentos, mencionados anteriormente (10,11). Em adição, a inclusão de isolados idênticos, altamente relacionados (mas não idênticos), e independentes com relacionamentos desconhecidos (incluindo isolados moderadamente relacionados e completamente não relacionados) foram sugeridos em grupos de isolados testes durante análises comparativas entre métodos fingerprinting genotípicos¹². Segundo Soll (2000), quando dois métodos identificam isolados idênticos e não idênticos, mas altamente relacionados, onde geralmente agrupam menos os isolados estritamente relacionados e distinguem isolados completamente não relacionados, em essência, os dois métodos apresentam marcas comprovadas para todos os níveis de resolução (i, ii, iii e iv). Contudo, estas comprovações podem ser realizadas somente para espécies com uma estrutura populacional predominantemente clonal (8). Os dados gerados por determinado método fingerprinting genotípico, para uma linhagem (i.e., padrões eletroforéticos em gel), devem ser relativamente estáveis sobre muitas gerações. Para tanto, este fato requer a existência de pouca recombinação entre as seqüências selecionadas para a análise. Em adição, as populações de isolados em análise devem sofrer primariamente reprodução clonal. Por outro lado, quando panmixia ocorre em alta frequência, devido a processos de reprodução sexual e recombinação, os resultados dos estudos epidemiológicos, obtidos por métodos fingerprinting genotípicos padrões, dificultam a interpretação (8)

Afortunadamente, muitas infecções fúngicas sofrem recombinação ou mudança gênica em frequência extremamente baixa (13). Alguns trabalhos têm mostrado o modo de reprodução primariamente clonal em *C. albicans*, elucidando sua aplicação por marcadores molecular padrões em estudos epidemiológicos (14,15). Em adição a estabilidade resultante da reprodução clonal, um método fingerprinting genotípico deveria acessar principalmente seqüências que não são altamente reorganizacional (i.e., seqüências razoavelmente estáveis sobre o

tempo). Por exemplo, a complexa sonda de DNA fingerprinting Ca3 (11kb) de *C. albicans* (12,16,17), a qual contém seqüências repetitivas dispersas em toda parte do genoma (RPS repetitive element) e seqüências únicas representadas em apenas um locus (18,19). Como consequência da existência de grupos de unidades RPS de tamanho natural (full-length RPS sequences) (20,21), os quais sofrem freqüentes reorganizações (duplicação e deleção) (19), freqüentes alterações ocorrem em padrões de hibridação Ca3 contendo seqüências RPS de tamanho natural (full-length RPS sequences). Bandas contendo tais seqüências representam, em média, 20% dos padrões gerados por hibridação com sonda Ca3. Os 80% restantes representam seqüências menos variáveis que tendem a estabilizar os padrões (22). Em contraste, uma sonda que consiste inteiramente de elementos RPS tende a gerar um adicional padrão fingerprinting menos estável, quando comparável com a complexa sonda Ca319, e conseqüentemente o padrão apresentará baixa efetividade durante o agrupamento de isolados moderadamente relacionados. Entretanto, ambas as sondas full-length Ca3 e RPS restrita podem ser empregadas em estudos que acessam rápidas mudanças devido à microevolução, mas somente a sonda full-length Ca3 pode ser empregada em estudos nos quais isolados moderadamente relacionados devem ser analisados (8).

A tipabilidade, reprodutibilidade e poder discriminatório têm sido desenvolvidos e sugeridos durante a avaliação da eficiência de vários métodos fingerprinting genotípicos^{23,24,7}. A tipabilidade e reprodutibilidade representam sistemas quantitativos que são freqüentemente expressos como medidas percentuais. A tipabilidade de um método corresponde ao percentual de distintas linhagens obtidas. O percentual de linhagens que apresentaram os mesmos resultados sob ensaios repetitivos corresponde à reprodutibilidade, isto é, a habilidade de um método produzir o mesmo resultado quando particular linhagem é repetidamente testada. A reprodutibilidade é especialmente

importante para a construção de uma base de dados confiável, a qual apresenta todas as linhagens conhecidas dentro de uma espécie em que organismos desconhecidos podem ser comparados para classificação. Por sua vez, o poder discriminatório de um método corresponde à sua habilidade de diferenciar claramente linhagens não relacionadas, tais como aquelas que são geograficamente distintas a partir de uma fonte de organismos, e demonstrar ao mesmo tempo o relacionamento de todos os organismos isolados a partir de indivíduos infectados diretamente de uma mesma fonte (23,24,7).

O interesse em adquirir um melhor entendimento sobre a patogênese, epidemiologia, genética e evolução das infecções causadas por *C. albicans* tem conduzido ao desenvolvimento de inúmeras pesquisas, as quais empregaram sistemas fingerprinting tais como MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis), EK (Electrophoretic Karyotyping), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), RFLP sem hibridação (Restriction Length Fragment Polymorphism without hybridization) ou REA (Restriction Enzyme Analysis) e RFLP com hibridação (Restriction Length Fragment Polymorphism with hybridization), os quais serão examinados a seguir.

Multilocus Enzyme Electrophoresis. O método de eletroforese de enzima multiloco (MLEE ou MEE), também conhecido como tipagem isoenzimática, tem sido empregado durante várias décadas como método padrão para análise genética de populações em eucarióticos (25, 26, 27, 28, 29,30). Trabalhos pioneiros realizados na década de oitenta, empregando MLEE para análise genética de *Escherichia coli* e *Shigella*, despertaram enorme interesse dos microbiologistas médicos (31,32). Desde então, numerosos estudos foram realizados com inestimáveis resultados para o conhecimento da história natural das doenças infecciosas. MLEE tem sido considerado um método gold standard para a genética de populações em microorganismos (33). Sua capacidade analítica permite avaliar marcadores

codominantes para cada locus em organismo diplóide, um requerimento essencial para os biólogos evolucionários que não é alcançado por poucos métodos de DNA fingerprinting (8.)

No campo da micologia médica, a tipagem isoenzimática tem apresentado grande potencialidade nos estudos de caracterização taxonômica, sistemática, genética, evolução e epidemiologia, especialmente para a levedura *C. albicans* (34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,15,48,12,49,50,51). A reação enzimática pode ser evidenciada por bandas eletroforéticas de atividades enzimáticas em géis, indicando a existência de isoenzimas ou isozimas (52.) Isoenzimas constituem múltiplas estruturas moleculares de uma mesma enzima com afinidade individual para um mesmo substrato, catalisando a mesma reação na célula⁵³. Seu controle ocorre geneticamente por um ou vários alelos ou genes, situados em um ou vários loci (54,55,56). Isoenzimas controladas por alelos de um único locus são denominadas de aloenzima ou alozima (57,58). Sua migração durante a eletroforese é determinada pela carga eletrostática presente na seqüência de aminoácidos e, conseqüentemente, sua mobilidade variante (eletromorfos ou aloenzimas) pode ser equiparada diretamente com alelos do correspondente locus gênico estrutural (32).

A análise isoenzimática na distinção de espécies de fungos depende da variabilidade genética intrapopulacional. Organismos com elevada variabilidade genética podem expressar fenótipos altamente variáveis e, portanto, ocultar diferenças inter ou intra-específicas. Essas evidências surgem principalmente com diferentes enzimas não-metabólicas que exibem altas variações estruturais em virtude da intensidade da pressão seletiva ambiental (59,60,61,62,63). Ao contrário, enzimas metabólicas apresentam baixa vulnerabilidade à seleção ambiental e usualmente são empregadas como marcadores isoenzimáticos (64).

Os padrões de bandas eletroforéticas isoenzimáticas são freqüentemente previsíveis, uma vez que dependem das condições genéticas e nucleares de cada organismo. No entanto, vários micologistas

restringiram as interpretações dos resultados eletroforéticos à mera contagem de bandas (65,66,67,68,69). A interpretação genética, quando possível, fornece muitas informações adicionais acerca da condição nuclear, genética e taxonomia de um grupo de organismo (70,71,72). Neste contexto, diferentes critérios de interpretação têm sido empregados para organismos haplóides ou diplóides (70,73,74,32). Baseado nestes critérios, a composição alélica tem sido determinada a partir de um grupo constituído por dez a trinta enzimas metabólicas consideradas representativas do genoma total de um organismo, as quais sustentam os estudos de genética de populações em bactérias, fungos e protozoários (33,8).

A interpretação genética dos resultados obtidos por MLEE tem sido aplicada em uma variedade de propósitos no campo da microbiologia médica. Em termos de alelos específicos, as proporções alélicas têm inferido o grau de recombinação genética em populações naturais. Essas proporções também têm sido empregadas na avaliação dos graus de isolamento genético entre populações naturais, causado por regiões geográficas e ecológicas ou barreiras biológicas. Seu emprego tem apresentado implicações taxonômicas e sistemáticas uma vez que, para microorganismos clonais, os graus de relacionamento inter e intrapopulacional têm sido analisados. Clones espécie-específicos identificados por MLEE também foram associados com padrões e reincidências clínicas, e altos índices de patogenicidade. Tais resultados têm sido empregados em traçados epidemiológicos permitindo melhor entendimento no desenvolvimento de epidemias, o que representa um inestimável complemento aos métodos atuais de tipagem molecular, particularmente nos estudos epidemiológicos em larga escala. Adicionalmente, MLEE tem sido considerado um método de tipagem com alto poder discriminatório e reprodutibilidade (33,75,76,73,74,12).

Análises comparativas entre MLEE, RAPD e Southern blot hibridação com sonda Ca3 apresentaram forte concordância nos resultados, durante o agrupamento de

isolados orais e outros sítios anatômicos de *C. albicans* provenientes de três regiões geográficas dos Estados Unidos. Três principais grupos contendo isolados de origens não relacionadas foram gerados pelos métodos acima, sem qualquer indicação de que alguns loci analisados por MLEE correspondem às seqüências de amplificação por RAPD ou da sonda por Ca3. Em adição, mudanças microevolucionárias em linhagem de origem relacionada foram reveladas pelas análises de Southern blot hibridação com sonda Ca3 (alto poder resolutivo), MLEE (moderado poder resolutivo) e RAPD (moderado poder resolutivo)77. Entretanto, MLEE pode ser considerado um ótimo método fingerprinting genotípico para infecções fúngicas, uma vez que suas informações são obtidas em todos os níveis de resolução (i, ii, iii e iv). Contudo, a única desvantagem desse método é o tempo consumível de trabalho laboratorial relativamente longo, visto a necessidade de laboriosos ensaios enzimáticos e a cuidadosa atenção durante o processamento de dados e sua interpretação genética.

Electrophoretic Karyotyping. Com a invenção da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE pulsed-field gel electrophoresis) (78), e seus respectivos sistemas OFAGE (orthogonal-fieldalter native gel electrophoresis), FIGE (fieldinversion gel electrophoresis), CHEF (contourclamped homogeneous electric field) ou TAFE (transverse alternate field electrophoresis), fragmentos cromossômicos do genoma de leveduras foram facilmente separados em um gel, consolidando assim a cariotipagem eletroforética (EK) (8). Estas invenções pareceram ideais para epidemiologia de fungos, uma vez que esta tecnologia foi confiável. Em geral, células imersas em plugs de agarose geleificados devem ser misturadas diretamente com solução enzimática para a remoção da parede celular. Protease e detergente também podem ser adicionados, seguindo a incubação celular para remoção de membranas e proteínas. Logo após, os plugs contendo moléculas de DNA devem ser colocados no interior dos poços existentes nas placas dos géis de agarose, onde a

eletroforese deverá ser realizada, de acordo com as especificações de determinado sistema, para a separação cromossômica. Os fragmentos cromossômicos de leveduras são separados de acordo com o tamanho, os quais podem ser visualizados após a coloração por brometo de etídio. Em adição, cromossomos específicos podem ser identificados empregando Southern blot hibridação com sondas de DNA cromossomo-específicas (i.e., rDNA) (8).

As primeiras aplicações de PFGE demonstraram variações nos padrões cariotípicos entre isolados de *C. albicans* não relacionados (79, 80, 94, 81, 82, 83, 84, 85, 86) e, por essa razão, proporcionou um potencial método fingerprinting genotípico (8). Apesar da variabilidade cariotípica entre linhagens de *C. albicans*, Thrash-Bingham e Gorman (1992), empregando Southern blot hibridação com sondas de genes clonados, demonstraram que (i) a organização genômica foi mantida e que (ii) processos de translocações contribuíram para aquela variabilidade⁸⁷. Essencialmente importante foi o fato revelado por Sangeorzan e colaboradores (1995), os quais demonstraram padrões de cariotipagem eletroforética altamente reproduzíveis entre experimentos, relativamente intensivos durante a preparação de métodos dentro do mesmo laboratório, e não influenciado por permuta (switching) fenotípica de alta frequência em linhagens de *C. albicans*⁸⁸. Entretanto, Holmberg e Feroze (1995) demonstraram variabilidade técnica para o sistema CHEF devido aos reagentes, preparação de amostras e condições de corrida eletroforética (61).

Devido ao excelente poder discriminatório e reprodutibilidade (89, 90, 91, 92, 93), a cariotipagem eletroforética tem sido empregada extensivamente como marcador molecular de *C. albicans* (94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 80, 102, 81, 103, 82, 91, 104, 105, 106, 84, 85, 93, 107, 87, 108). Este método mostrou poder discriminatório superior em comparação com RFLP sem hibridação, durante ensaios entre isolados independentes^{50,93}. Contudo, sua eficiência em agrupar linhagens moderadamente relacionadas não

foi avaliada cuidadosamente. Outras indicações sugerem que a cariotipagem eletroforética não pode cumprir os requerimentos necessários para análises de DNA fingerprinting em *C. albicans*, uma vez que estas leveduras podem apresentar reorganizações cromossômicas com altas ou baixas frequências que, conseqüentemente, induzem alterações cariotípicas elevadas ou reduzidas, respectivamente (109). Células de linhagens de *C. albicans* 3153A, que expressam fenótipos variantes (switching), sofrem alterações excessivamente frequentes no tamanho de dois cromossomos que abrigam cistrons de rDNA (109). A capacidade de uma célula expressar duas frequências de reorganização cromossômica e, conseqüentemente, duas frequências de alterações cariotípicas como resultado da diferenciação reversível, indefere o uso da cariotipagem eletroforética como um método fingerprinting genotípico efetivo para análises de grupos de isolados moderadamente relacionados⁸. Em adição aos estudos sobre alterações cariotípicas com frequências elevadas ou reduzidas em *C. albicans*, foi demonstrado que os padrões cariotípicos em linhagens variantes (switching) podem divergir e em outra ocasião convergir (109, 110, 111). A convergência dos padrões cariotípicos conduz à homoplasia, cuja característica é inconsistente com os objetivos de um método fingerprinting genotípico. Quando a divergência é seguida pela convergência de um padrão de DNA fingerprinting, dois cariótipos similares ou idênticos podem ser interpretados como a mesma linhagem quando, na realidade, os isolados comparados podem ser não relacionados (8). As alterações cariotípicas de alta frequência em *C. albicans* podem interferir com a capacidade de discriminar linhagens moderadamente relacionadas e não relacionadas, porém a cariotipagem eletroforética pode ser empregada eficazmente para avaliar microevolução dentro de uma linhagem infectante (112.) Contudo, as demonstrações de reorganização de alta frequência e homoplasia reduzem a efetividade da cariotipagem como um método de DNA fingerprinting geral para *C. albicans* (8).

Outros fatores que têm limitado o emprego de PFGE são o elevado custo e o tempo relativamente longo para a realização dos ensaios que, conseqüentemente, reduz a capacidade laboratorial em analisar grandes números de amostras (7,92). Ademais, uma versão modificada da cariotipagem eletroforética tem fornecido uma melhor efetividade ao método, a fim de cumprir os requerimentos necessários. O poder de resolução da cariotipagem tem aumentado pela digestão do DNA cromossômico de linhagens de *Candida* spp. com enzimas de restrição, tais como SfiI, NotI e BssHII, previamente aos ensaios de eletroforese em gel de campo-pulsado (113, 114, 115, 116, 117, 118, 102, 119, 92).

Randomly Amplified Polymorphic DNA. A análise do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) foi primeiramente descrita por Williams e colaboradores (1990) (120) e Welsh & McClelland (1990) (121). Embora uma variedade de estratégias com base na reação em cadeia da polimerase (PCR-polymerase chain reaction) tem sido desenvolvidas, o RAPD tem surgido como o método de DNA fingerprinting mais comum para infecções fúngicas (122, 121, 120.) Empregando primers ao acaso, de aproximadamente 10 bases (oligonucleotídeo), amplicons em toda parte do genoma são objetos a serem atingidos e amplificados. Os produtos amplificados são comumente separados em géis de agarose e corados com brometo de etídio (7,8). Durante o desenvolvimento de um sistema RAPD para determinada espécie, certa quantidade de primers deve ser testada a fim de selecionar aqueles oligonucleotídeos capazes de fornecer maior variabilidade entre isolados independentes. Um único primer pode gerar um padrão relativamente complexo que varia entre isolados, porém em muitos casos o seu emprego produz uma a três bandas eletroforéticas intensas capazes de diferenciar os isolados. Por essa razão, os primers devem ser selecionados e testados independentemente para cada isolado em questão, e as informações obtidas devem ser combinadas⁸. Esta estratégia tem sido objetivo de Pujol e colaboradores (1997), os quais testaram quarenta primers ao acaso

(cada um com 10 bases) sobre um número limitado de isolados testes de *C. albicans*. Destes, oito primers foram selecionados por fornecer a máxima variabilidade. Porém, apenas os padrões que apresentaram bandas eletr ofor éticas intensas e reprodutíveis (de uma a seis bandas para cada primer) foram empregados durante análises de agrupamento. Em adição, estes padrões demonstraram paridades com aqueles obtidos por MLEE e Southern blot hibridação com sonda Ca312. Estes pesquisadores também demonstraram que RAPD, MLEE e Ca3 fingerprinting de *C. albicans* não somente agrupam isolados moderadamente relacionados, mas também fornece níveis similares de resolução de microevolução dentro de uma população clonal. Contudo, estas mudanças microevolucionárias foram independentes e, conseqüentemente, os três métodos não identificam alterações nos mesmos isolados altamente relacionados. Mais propriamente, estes métodos medem freqüências similares de variantes dentro de uma mesma linhagem (12).

O método RAPD tem demonstrado grande êxito em estudos sobre infecções fúngicas, especialmente para *C. albicans* (123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 12, 13, 132, 133). Apesar da técnica apresentar rapidez, simplicidade e alto poder discriminatório, várias limitações sobre seus procedimentos foram apontadas. A falta de reprodutibilidade intere intralaboratórios, que embora não seja insuperável, tem gerado o desenvolvimento de uma base de dados complexa e de difícil interpretação (134, 135, 7, 92, 8). Variações dos resultados provenientes de artefatos também podem ocorrer como um resultado de pequenas diferenças na concentração de primers, na temperatura de amplificação e na concentração de magnésio da mistura de reação (136). Alterações destes parâmetros podem afetar notavelmente a presença de bandas de baixa intensidade, a posição e a nitidez de bandas de alta intensidade (8). Em adição, vários pesquisadores demonstraram variações significativas da metodologia RAPD devido as diferentes fontes da enzima Taq polymerase, as quais foram

capazes de gerar pseudoclusters durante análises de agrupamento (137,138,139).

Restriction Length Fragment Polymorphism sem hibridização. Um dos primeiros métodos fingerprinting genotípicos, empregado para analisar o relacionamento de linhagens em infecções fúngicas, foi a análise com enzima de restrição (REA restriction enzyme analysis) ou a comparação do polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP), sem sondas de hibridação (135, 92, 8). Esta metodologia tem sido aplicada em uma série de estudos epidemiológicos de várias infecções fúngicas, especialmente para *C.albicans* (140, 125, 141, 76, 142, 91, 143, 144, 145, 146, 93, 108). Esta técnica tem sido considerada uma metodologia segura e confiável. Comumente, DNAs celulares têm sido extraídos a partir de esferoplastos, digeridos com uma ou mais enzimas de restrição (i.e., EcoRI e HinfI), separados em géis de agarose por procedimentos eletroforéticos e visualizados pela coloração com brometo de etídio. A resolução deste método depende da concentração de agarose, do tempo de eletroforese, da voltagem e da endonuclease empregada. No entanto, todas as condições experimentais devem ser determinadas empiricamente. Seus padrões resultam a partir de diferentes comprimentos dos fragmentos de DNA, os quais são determinados pelos sítios de restrição identificados por endonucleases específicas. As variações entre linhagens podem ocorrer em função de alterações nas seqüências dos sítios de restrição, modificações secundárias dos sítios de restrição, deleção dos sítios de reconhecimento ou deleção e inserção em seqüências de DNA localizadas entre sítios de reconhecimento (135, 92, 8).

Em infecções fúngicas, a complexidade elevada do genoma eucariótico aumenta o número de bandas obtidas com endonucleases convencionais. Isto diminui a resolução dos padrões de bandas que representam seqüências únicas, uma vez que a complexidade dos padrões de bandeamento gerado por RFLP muitas vezes dificulta a interpretação do relacionamento das linhagens (92, 8). De modo semelhante a todos os genomas

eucarióticos, os genomas fúngicos contêm genes rDNA repetitivos com seqüências relativamente homólogas e regiões intergênicas. Cistrons ribossômicos eucarióticos são normalmente agrupados em um ou dois cromossomos⁸. O genoma de *C. albicans* contém aproximadamente 50 a 130 cistrons rDNA por genoma diplóide (147). Os fungos também apresentam muitas cópias do genoma mitocondrial (148). Seqüências de rDNA (144) e de DNA mitocondrial (149, 150), este último em menor extensão, representam a maioria das bandas intensas dos padrões RFLP⁸. Estudos de *C. albicans* por RFLP apontaram várias evidências da utilidade deste método, tanto na identificação de linhagens idênticas a partir de isolados independentes quanto na discriminação entre isolados não relacionados (141, 151, 144, 145). RFLP sem uma sonda de hibridação foi considerado um legítimo método para responder seletivas questões epidemiológicas relacionadas a infecções fúngicas. Porém, esta metodologia apresenta a desvantagem para analisar grupos de isolados moderadamente relacionados. Por essa razão, RFLP não tem sido bem apropriado para grandes estudos epidemiológicos. Em adição, este método não foi validado criteriosamente por comparações com outros métodos nos diferentes níveis de resolução (i, ii, iii e iv) (8).

Restriction Length Fragment Polymorphism com hibridização. Um padrão RFLP geral de DNA celular eucariótico foi considerado insuficientemente resolvido devido à revelação de todos os fragmentos de restrição⁸. No entanto, a metodologia RFLP pode ser ampliada pela transferência dos fragmentos de DNA para membranas de nitrocelulose ou nylon, os quais podem hibridizar com sondas específicas (152, 90, 153). Este procedimento permite visualizar seletivamente um número limitado de fragmentos, e ainda fornece um padrão fingerprinting de alta resolução (8). Esta metodologia, nomeada de Southern blot hibridação, foi baseada em sondas de DNA constituídas de seqüências (i.e., radiomarcadas) capazes de reconhecer um ou mais fragmentos correspondentes,

presentes em géis de RFLP (152, 90, 8, 153). A estringência desta hibridação pode ser controlada pela variação da concentração de sal e/ou temperatura. Padrões de bandas únicas foram evidenciados quando uma determinada sonda reconhece uma única seqüência específica de DNA (i.e., um único gene). A existência de uma única seqüência relativamente intacta, dentro de um fragmento de restrição no gel, tem sido exclusivamente identificada por hibridação com sonda de DNA específica. Em organismos haplóides somente uma banda foi incluída nos padrões RFLP-Southern blot hibridação, enquanto que em organismos diplóides, tal como *C. albicans*, uma ou duas bandas foram incluídas naqueles padrões. Contudo, o sítio de atuação de determinada endonuclease pode estar contido dentro de uma única seqüência de DNA correspondente ao local de hibridação com uma sonda específica que, conseqüentemente, poderia resultar na existência de mais do que duas bandas incluídas nos padrões RFLP-Southern blot hibridação. Várias sondas fungo-específica e espécie-específica foram desenvolvidas com bases nas áreas evolutivamente conservadas de genomas fúngicos e de determinadas espécies fúngicas, respectivamente (156,157). Sondas que hibridizam com seqüências únicas ou um único gene (single-gene probes) podem discriminar alguns isolados fúngicos com base no polimorfismo alélico. Estas sondas tendem a gerar padrões com uma ou duas bandas que, conseqüentemente, não fornecem um nível de complexidade de dados necessários para avaliar a distância genética. No entanto, várias sondas single-gene empregadas em conjunto podem fornecer resultados similares à queles obtidos por MLEE e gerar dados complexos o suficiente para refletir distância genética. Deste modo, sondas que hibridizam com seqüências repetitivas dispersas por todo genoma foram alvos de muitas pesquisas, uma vez que estas seqüências podem variar entre linhagens (8). Sonda de rDNA empregada para análises de Southern blot hibridação em DNA celular total de *C. albicans* demonstrou uma certa resolução em linhagens não relacionadas, cuja complexidade dos padrões de

hibridação foram equiparados com as sondas single-gene (158,159). Stein e colaboradores (1991) empregaram a sonda rDNA e demonstraram cinco diferentes padrões em dezoito isolados de *C. albicans* (160). A hibridação com a sonda rDNA do DNA de *C. albicans* digerido com EcoRI apresentou um padrão com no máximo três bandas, as quais foram comuns para linhagens aparentemente não relacionadas, em uma freqüência relativamente alta, sugerindo da existência de homoplasia (160, 161). rDNA e regiões de espaçamento (spacer regions) de rDNA também foram testados por sondas de DNA fingerprinting em outras infecções fúngicas além de *C. albicans*, porém em todos os casos não foram gerados padrões complexos o suficiente para considerar tais sondas um sistema de fingerprinting eficaz (162, 163, 164, 165, 166). A digestão de cistrons ribossômicos eucarióticos, os quais constituem seqüências repetitivas em tandem dispostas em grupos e normalmente separadas por seqüências de espaçamento (167, 168, 169, 170), por endonucleases gera fragmentos de tamanhos relativamente similares que resulta em padrões mais simples de Southern blot hibridação (i.e., padrões com poucas bandas). Conseqüentemente, sondas rDNA não têm sido tão efetivo para sistemas fingerprinting genotípicos em fungos. (8)

Alguns pesquisadores demonstraram a estrutura circular do genoma mitocondrial de *C. albicans*, cujo tamanho de 41 kb compreende extensas seqüências repetitivas em menor número de cópias do que o rDNA (171, 150,172). O DNA celular total de *C. albicans* digerido com EcoRI tem revelado padrões de Southern blot hibridação com sonda para DNA mitocondrial aparentemente mais complexos do que aqueles obtidos com uma sonda rDNA. Pesquisas têm demonstrado cinco bandas distintas, cujos padrões variaram entre os isolados de *C. albicans*, sugerindo que Southern blot hibridação com sonda de DNA mitocondrial apresenta efetividade na identificação de linhagens idênticas entre isolados independentes e na distinção entre linhagens não relacionadas (149, 150). Durante análise do tipo I e tipo II de

Candida stellatoidea, uma espécie filogeneticamente análoga a *C. albicans*, os padrões de hibridação com sonda de DNA mitocondrial do tipo I foram idênticos, enquanto aqueles do tipo II variaram. Em adição, os padrões de alguns isolados de *C. stellatoidea* tipo II foram indistinguíveis de alguns isolados de *C. albicans*, demonstrando uma falta de especificidade da espécie ou baixo poder de resolução do método, caso aceito *C. stellatoidea* como uma espécie independente. Neste estudo, a hipótese mais provável também foi postulada como *C. stellatoidea* tipo II representando um subgrupo de *C. albicans* (80), conforme sugerido em outros estudos (173). Por conseguinte, sondas de DNA mitocondrial e rDNA não foram comumente empregadas em amplos estudos epidemiológicos de infecções fúngicas, e nenhum destes métodos foi validado para os diferentes níveis de resolução genética (8).

As sondas de DNA 27A (175) e Ca3 (16, 17), para hibridação específica em genoma de *C. albicans*, foram clonadas quase que ao mesmo tempo durante o final de 1980 e, subsequentemente, foi demonstrado certa analogia entre tais sondas (19). Estas sondas contêm seqüências dos elementos repetitivos RPS e seqüências não-RPS de *C. albicans* (20) que, conseqüentemente, hibridizam grande parte das mesmas bandas durante ensaios de Southern blot hibridação. Entretanto, essas duas sondas não são idênticas. A sonda 27A contém seqüências downstream dos grupos RPS que hibridizam com bandas únicas, enquanto que a sonda Ca3 contém seqüências upstream dos grupos RPS que hibridizam com bandas únicas (19). Por comparação, a sonda Ca3 apresenta maior complexidade do que 27A, e ainda contém uma seqüência repetitiva adicional chamada seqüência B. Em média, seu padrão também apresenta maior complexidade e satisfaz os quatro requerimentos necessários para um efetivo método de DNA fingerprinting (12,8). As sondas Ca3 e 27A também foram empregadas em vários estudos epidemiológicos de *C. albicans* e a espécie filogeneticamente relacionada *C. dubliniensis* (176, 177, 178, 179, 180, 112, 181, 182, 183, 184, 185, 16, 186, 187, 188, 189, 17, 190,

191, 192, 193). A lógica e os métodos empregados para clonar e caracterizar as complexas sondas 27A e Ca3 foram relativamente confiáveis. Assim sendo, um ensaio de Southern blot hibridação de fragmentos digeridos com endonuclease, empregando sondas capazes de identificar seqüências repetitivas dispersas por todo genoma, poderia identificar a variabilidade entre isolados por intermédio de uma diversidade de loci espalhados. Contudo, tais sondas poderiam hibridizar com (i) seqüências adicionais menos variáveis, incluindo seqüências que variam como um resultado de polimorfismos alélicos, e com (ii) algumas seqüências hipervariáveis, revelando mudanças microevolucionárias dentro de uma linhagem. Todas estas informações têm sido fornecidas por um único padrão de Southern blot hibridação, o que representa a virtude destas complexas sondas. Uma sonda complexa deve gerar um padrão suficientemente complexo a fim de fornecer medidas corretas e sensíveis capazes de refletir o relacionamento dos isolados. A porção principal do padrão gerado deve ser relativamente estável com o passar do tempo para determinada linhagem. Em adição, a sonda poderia conter uma ou mais seqüências de hibridação com fragmentos monomórficos (i.e., fragmentos que exibem o mesmo tamanho em todas ou na maioria das linhagens dentro de uma espécie). Estas bandas monomórficas poderiam facilitar a normalização num padrão universal, cujo objetivo seria a estocagem computacional de dados (i.e., construção de uma base de dados auxiliada por computador) para subsequentes estudos comparativos e retrospectivos (8).

Sherer e Stevens (1988) demonstraram que a sonda 27A de 6.7 kb, clonada de uma linhagem clínica de *C. albicans* 616, apresenta uma seqüência repetitiva dispersa por todo o genoma. Eles analisaram dois clones por Southern blot hibridação com sonda 27A de fragmentos digeridos com *Sau3A* e demonstraram a existência de uma seqüência comum entre os dois clones e 27A154, a qual foi subsequentemente identificada como elemento repetitivo RPS por Iwaguchi e colaboradores (1992) (21). No contexto

epidemiológico e taxonômico, padrões de Southern blot hibridação com sonda 27A, de isolados atípicos de *C. albicans* provenientes de pacientes HIV-soropositivos, demonstraram características genéticas idênticas a *C. dubliniensis*, sugerindo também uma distribuição geográfica difundida desta espécie (192). Em adição a sonda 27A, seus padrões de Southern blot hibridação também mostraram maior poder discriminatório em linhagens clínicas de *C. albicans* quando comparados com os padrões de EK, REA com NotI e PCR fingerprinting (195). A sonda Ca3 de 11 kb196, primeiramente referida como JH3 durante ensaios sobre mudanças fenotípicas (phenotypic switching) em isolados de *C. albicans* causando vaginite17, foi clonada de uma linhagem de laboratório 3153A e encontra-se dispersa em sete de oito cromossomos de *C. albicans* (16). Anderson e colaboradores (1993) digeriram a sonda Ca3 com EcoRI e obtiveram sete fragmentos, os quais foram classificados em ordem decrescente de tamanho em A, B, C, D1, D2, E e F1. Posteriormente, estes fragmentos foram mapeados na direção 5' para 3'19. Quando o DNA da linhagem de *C. albicans* 3153A foi digerido com EcoRI e analisados pelos fragmentos A (~4.2 kb), B (~3 kb) e C (~2.9 kb) da sonda Ca3, três distintos padrões foram obtidos.

No entanto, a combinação destes padrões resultou na identificação de todas as principais bandas obtidas pelos padrões de hibridação com sonda Ca3 íntegra (22). O fragmento A gerou três distintos padrões (~5.8 kb; ~4.5 kb; ~5.8 e 4.5 kb) quando analisados por Southern blot hibridação de DNA digerido com EcoRI de isolados clínicos de *C. albicans*. Neste caso, o fragmento A identificou apenas um gene, cujos padrões representaram variações alélicas de apenas um locus gênico. O fragmento B gerou um padrão que incluiu mais da metade das bandas obtidas pelos padrões de hibridação com sonda Ca3 íntegra. A maioria dos padrões B foi polimórfico e representativo de muitas bandas moderadamente variáveis, as quais são necessárias para análises de agrupamento8, ou ainda, foram usadas durante a demonstração de paridade entre

MLEE, RAPD e Ca3 fingerprinting (12). Finalmente, o fragmento C gerou padrões que incluíram bandas de alta massa molecular, fortemente variáveis, as quais têm demonstrado imenso valor em análises microevolucionárias de linhagens infectantes (112, 92, 19, 159, 162). Durante a determinação da distribuição genômica das seqüências que hibridizam com os três principais fragmentos da sonda Ca3 (A, B e C), ensaios de Southern blot hibridação dos cromossomos de *C. albicans*, separados eletroforeticamente, foram investigados22. Sete distintas bandas cromossômicas da linhagem de *C. albicans* 3153A foram obtidas por eletroforese de campo alternado transverso (TAFE transverse alternating-field electrophoresis) e numeradas em ordem decrescente de tamanho. Como *C. albicans* possui oito cromossomos, a sobreposição de bandas possivelmente ocorreu no mínimo em uma posição (22). A sonda Ca3 íntegra mostrou forte hibridação com as bandas 1, 3, 5, 6 e 7. O subfragmento B mostrou forte hibridação com as bandas 5 e 7, e fraca hibridação com a banda 6. O subfragmento C mostrou forte hibridação com as bandas 1, 3 e 6, e fraca hibridação com as bandas 5 e 7. Estes resultados demonstraram que os subfragmentos B e C apresentam seqüências dispersas em mais do que um cromossomo, sendo que o subfragmento C, o qual contém seqüências RPS, foi mais disseminado do que o subfragmento B22.

Southern blot hibridação com a sonda Ca322, 16,17 tem sido empregada em vários estudos epidemiológicos e microevolucionários de isolados clínicos de *C. albicans* (178, 179, 112, 197, 198, 199, 184, 187, 200, 189, 201, 190, 193). A sonda Ca3 empregada durante ensaios de DNA digerido com EcoRI tem identificado acima de 20 bandas, as quais incluíram padrões monomórficos, moderadamente variáveis e hipervariáveis (186). Todos estes padrões foram empregados para avaliar o relacionamento de isolados clínicos, enquanto que os padrões hipervariáveis foram empregados para monitorar microevolução de linhagens infectantes e comensais de *C. albicans* (70, 112, 181, 189, 190). Análises de RAPD, MLEE e Southern

blot hibridação com sonda Ca3 apresentaram forte concordância nos resultados, durante análises de agrupamento de isolados orais e outros sítios anatômicos de *C. albicans* provenientes de três regiões geográficas dos Estados Unidos. Três principais grupos, contendo isolados de origens não relacionadas, foram gerados pelos métodos acima sem qualquer indicação de que algum loci analisado por MLEE corresponde às seqüências de amplificação por RAPD ou da sonda por Ca3. Em adição, mudanças microevolucionárias dentro de uma linhagem (origem relacionada) foram reveladas pelas análises de Southern blot hibridação com sonda Ca3 (alto poder resolutivo), MLEE (moderado poder resolutivo) e RAPD (moderado poder resolutivo) (12). Estas mudanças microevolucionárias também podem envolver reorganizações do tipo inserção ou deleção intracromossomal dos elementos RPS dispersos especificamente por toda parte do genoma de *C. albicans* (19). Isolados de *C. albicans* de vários sítios anatômicos provenientes de mulheres saudáveis foram comparados por Southern blot hibridação com sonda Ca3. De onze mulheres que abrigaram comensais em ambas as cavidades oral e vaginal, quatro apresentaram linhagens altamente similares, porém não idênticas, em sítios alternativos. Este fato tem sugerido a ocorrência de microevolução entre aquelas linhagens altamente similares, a partir de um progenitor que se adaptou em dois diferentes nichos do corpo. Em adição, tais populações divergentes poderiam ser distinguidas geneticamente (190). Recentemente, Schroepel e colaboradores (1994) empregaram a mesma técnica para acessar o relacionamento genético de linhagens de *C. albicans* isoladas de pacientes (linhagens mantidas e substituídas) e seus parceiros sexuais. No paciente em que as linhagens infectantes foram mantidas, houve mínimas mudanças genéticas em episódios sucessivos de candidíase vaginal. No paciente em que as linhagens infectantes foram substituídas por outras, uma infecção de transição envolveu uma população infectante geneticamente mista, e a substituição de linhagens aparentemente

tiveram origem a partir da cavidade oral dos parceiros sexuais. Estes resultados demonstraram que as linhagens de infecções recorrentes de candidíase vaginal são geneticamente instáveis, e que o tratamento com antifúngicos pode resultar em seleção de variantes previamente infectantes, ou substituição por linhagens geneticamente não relacionadas (189).

Recentemente, o relacionamento físico entre a sonda Ca3 (16), os grandes fragmentos genômicos de EcoRI que hibridizam com o fragmento C de Ca3 (22, 19), a sonda 27A (156), o fragmento HOK (32), e os elementos RPS (20,21) foram determinados (202,19). As sondas Ca3, 27A e HOK apresentam seqüências de elementos RPS e a margem upstream de C2 do grupo RPS. Por essa razão, todas estas três sondas identificam um grupo de bandas comuns em um Southern blot do DNA genômico digerido com EcoRI. Portanto, os elementos RPS empregados exclusivamente como sonda de DNA fingerprinting tendem a gerar padrões similares à queles obtidos com o fragmento C da sonda Ca3 (72, 133). Embora o padrão C apresente valiosa utilidade em análises microevolucionárias, com base na hipervariabilidade no comprimento de suas seqüências RPS localizadas em tandem em determinados locais do genoma (133), seu emprego como um método efetivo de DNA fingerprinting produz uma equivocada interpretação de isolados que não são altamente relacionados (133). O problema da utilização de uma sonda que contém elementos repetitivos dispersos no genoma foi recentemente demonstrado em *C. albicans*. Lasker e colaboradores (1992) clonaram o elemento repetitivo espécie-específico CARE-2 (1.06 kb) a partir do genoma de *C. albicans*. Os padrões de Southern blot hibridação demonstraram diferentes números de cópias CARE-2 sobre diferentes cromossomos de *C. albicans* (204). Padrões complexos também foram gerados por Southern blot hibridação com sonda CARE-2, em DNA digerido com EcoRI de vários isolados clínicos de *C. albicans*, os quais apresentaram aproximadamente o mesmo número de bandas daqueles padrões obtidos por Southern blot hibridação com sonda

Ca3, porém, em contraste com Ca3, cada padrão de banda CARE-2 foi variável (12). A sonda CARE-2 distinguiu isolados não relacionados e identificou a mesma linhagem em isolados independentes. Entretanto, enquanto MLEE, RAPD e Ca3 fingerprinting demonstraram paridade agrupando os isolados clínicos dentro de três grupos altamente similares, dois dos três grupos fragmentaram formando-se grupos de isolados menores e não relacionados no dendrograma CARE-2 (12). Deste modo, os padrões da sonda CARE-2 identificam somente fragmentos hipervariáveis que, conseqüentemente, tornam-se menos efetivo em agrupar isolados moderadamente relacionados (8).

Os resultados obtidos com a sonda CARE-2 (12) apontaram para uma concepção errônea com relação ao emprego de uma sonda de DNA fingerprinting. Existe certa tendência em reduzir uma sonda complexa de DNA fingerprinting a um elemento de repetição simples, como no caso da redução da sonda Ca3 ao elemento RPS, cuja base apoiou-se na noção equivocada de que o padrão mais variável corresponde ao melhor método de DNA fingerprinting para linhagens. Por outro lado, os padrões de bandas Ca3, analisados individualmente pelos seus subfragmentos quanto à variabilidade, revelaram subgrupos com hipervariabilidade, variabilidade moderada, baixa variabilidade e nenhuma variabilidade. Deste modo, estas informações tendem a fortalecer a sonda quanto aos vários níveis de resolução propostos para um método efetivo de DNA fingerprinting (8). Em adição, a redução da sonda Ca3 para RPS resulta em uma sonda convenientemente útil para estudos microevolucionários de linhagens (i.e., análise da hipervariabilidade) (133).

Conclusões

A revolução em biologia molecular tem aumentado dramaticamente a capacidade dos pesquisadores para estudar inúmeras infecções fúngicas, especialmente aquelas causadas pelo patógeno oportunista *C. albicans* e outras espécies de *Candida*. Múltiplos sistemas moleculares encontram-

se disponíveis para os propósitos científicos epidemiológicos, genéticos, evolutivos, taxonômicos e sistemáticos. No entanto, o emprego de um sistema adequadamente padronizado, compreendendo vários métodos fingerprinting genotípicos associados a um programa de base de dados universal tem sido o anseio de muitos micologistas moleculares. Para avaliar os níveis de resolução for necidos por um método fingerprinting genotípico, uma estratégia de validação tem sido delineada a qual compara dois ou mais métodos não relacionados. Para *C. albicans*, esta estratégia tem validado o emprego de MLEE, RAPD e Ca3, uma vez que estes métodos foram capazes de avaliar todos os níveis de resolução. Dentro do contexto epidemiológico, todos os isolados apresentam uma história, ambos para o hospedeiro e para o patógeno, a qual poderia ser mais explorada.

Cada linhagem submetida às análises pelos diferentes métodos fingerprinting genotípicos poderia ser registrada em programas de base de dados e submetida a uma comparação com os parâmetros dos hospedeiros (i.e., idade, sexo, peso, características médicas, condições predisponentes, artigos protéticos, localização geográfica, fatores socioeconômicos, associação com outros indivíduos) e as características do patógeno (i.e., padrões de assimilação de açúcares, antigenicidade, secreção de proteinases, padrões de susceptibilidade às drogas, formação de hifa, switching fenotípico). Estes procedimentos permitiriam a comparação atual e retrospectiva de uma seleção de linhagens clínicas e epidemiologicamente importantes, as quais poderiam apresentar uma ou várias características do hospedeiro ou patógeno. Em adição, a somatória deste crescente número de informações poderia contribuir ainda mais (i) para o entendimento da dinâmica dos organismos infecciosos em populações humanas, (ii) do complexo relacionamento entre comensalismo e infecção, (iii) dos mecanismos genéticos e evolucionários, ou ainda, (iv) identificar a origem de uma infecção e (v) monitorar a emergência de linhagens resistentes aos fatores ambientais impróprios.

Agradecimentos

Os autores agradecem pelo suporte financeiro garantido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESPProc. 00/03045-5).

Referências

1. Segal E, Baum GL. Pathogenic yeasts and yeast infections. Boca Raton (CRC): Ann Arbor; 1994. p.297.
2. Samaranayake LP. Oral candidosis: an old disease in new guises. *Dent Update* 1990; 17: 36-8.
3. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Pow EH, Beena VT, Yeung KW. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virusinfected southern Chinese cohort. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3296-3302.
4. Greenspan D, Greenspan JS. HIV related oral disease. *Lancet* 1996; 348: 729-733.
5. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit. Rev Oral Biol Med* 1999; 10: 359-383.
6. Holmstrup P, Axéll T. Classification and clinical manifestations of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 57-9.
7. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1661-1669.
8. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 322-370.
9. Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 1998; 28: 85-104.
10. Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 1335-1339.
11. Van Belkum A, Melchers W, de Pauw BE, Scherer S, Quint W, Meis JF. Genotypic characterization of sequential *Candida albicans* isolates from fluconazole-treated neutropenic patients. *J Infect Dis* 1994; 169: 1062-1070.
12. Pujol C, Joly S, Lockhart SR, Noel S, Tibayrenc M, Soll DR. Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2348-2358.
13. Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 126-146.
14. Gräser Y, Volovsek M, Arrington J, Schönian G, Presber W, Mitchell TG, et al. Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 12473-7.
15. Pujol C, Reynes J, Renaud F, Mallie M, Bastide JM. Genetic analysis of *Candida albicans* strains studies by isoenzyme electrophoresis. *J Mycol Med* 1993; 3: 14-9.
16. Sadhu C, Mceachern MJ, Rustchenko-Bulgac EP, Schmid J, Soll DR, Hicks JB. Telomeric and dispersed repeat

- sequences in *Candida* yeasts and their use in strain identification. *J Bacteriol* 1991; 173: 842-850.
17. Soll DR, Langtimm CJ, McDowell J, Hicks J, Galask R. High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1611-1622.
 18. Joly S, Pujol C, Schrö ppeL K, Soll DR. Development and verification of two species fingerprinting probes for *Candida tropicalis* amenable to computer analysis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3063-3071.
 19. Pujol C, Joly S, Notan B, Srikantha T, Soll DR. Microevolutionary changes in *Candida albicans* identified by the complex Ca3 fingerprinting probe involve insertions and deletions of the full-length repetitive RPS at specific genomic sites. *Microbiology* 1999; 145: 2635-2646.
 20. Chibana H, Iwaguchi SI, Homma M, Chindamporn A, Nakagawa Y, Tanaka K. Diversity of tandemly repetitive sequences due to short periodic repetitions in the chromosomes of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1994; 176: 3851-8.
 21. Iwaguchi SL, Homma M, Chibana H, Tanaka K. Isolation and characterization of a repeated sequence (RPS1) of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1992; 138: 1893-1900.
 22. Anderson J, Srikantha T, Morrow B, Miyasaki SH, White TC, Agabian N, Schmid J, Soll DR. Characterization and partial nucleotide sequence of the DNA fingerprinting probe Ca3 of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1472-1480.
 23. Arbeit DR. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. (coord). *Manual of clinical microbiology* Washington (ASM), 1995.
 24. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2465-6.
 25. Ayala FJ. *Molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland (Mass), 1976.
 26. Lewontin RC. *The genetic basis of evolutionary change*. New York: Columbia University Press, 1974.
 27. Nei M. *Molecular polymorphism and evolution*. Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1975.
 28. Nevo E, Beiles A, Ben-Shlomo R. The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates. *Lect Notes Biomath* 1980; 53: 13-213.
 29. Rattazzi MC, Scandalios JG, Whitt GS, Alan R. *Isozymes Current Topics in Biological and Medical Research*. New York: Liss, 1983.
 30. Selander RK, Whittam TS. Protein polymorphism and the genetic structure of populations. In: Nei, M.; Koehn, R.K. (coord) *Evolution of genes and proteins* Sinauer Associates, Sunderland, Mass, 1983.
 31. Selander RK, Lewin BR. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* 1980; 210: 545-7.
 32. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51: 873-884.

33. Boerlin P. Applications of multilocus enzyme electrophoresis in medical microbiology. *J Microbiol Meth* 1997; 28: 221-231.
34. Arnavielhe S, Blancark A, Mallié M, Gouin F, Ottomani A, Manalli JC, Bastide JM. Suivi mycologique d'infections à *Candida albicans* dans divers services hospitaliers. *Path. Biol* 1996; 44: 447-451.
35. Arnavielhe S, Blancark A, Mallié M, Quilici M, Bastide JM. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Candida albicans* isolates from three intensive care units. An epidemiological study. *Mycoses* 1997; 40: 159-167.
36. Barchiesi F, Arzeni D, Del Prete MS, Sinicco A, Falconi Di Francesco L, Pasticci MB, Lamura L, Nuzzo MM, Burzacchini F, Coppola S, Chiodo F, Scalise G. Fluconazole susceptibility and strain variation of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients with oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 541-8.
37. Bertout S, Renaud F, Swinne D, Mallie M, Bastide JM. Genetic multilocus studies of different strains of *Cryptococcus neoformans*: taxonomy and genetic structure. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 715-720.
38. Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Durussel C, Addo M, Pagani JL, Chave JP, Bille J. Cluster of oral atypical *Candida albicans* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1129-1135.
39. Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Durussel C, Addo M, Pagani JL, Chave JP, Bille J. Cluster of oral atypical *Candida albicans* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1129-1135.
40. Brandt ME, Hutwagner LC, Klug LA, Baughman WS, Rimland D, Graviss et al. Molecular subtype distribution of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 912-7.
41. Brandt ME, Bragg SL, Pinner RW. Multilocus enzyme typing of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2819-2823.
42. Caugant DA, Sandven P. Epidemiological analysis of *Candida albicans* strains by multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 215-220.
43. Doebbeling BN, Lehmann PF, Hollis RJ, Wu LC, Widmer AF, Voss A, Pfaller MA. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis with isoenzyme profiles as a typing system for *Candida tropicalis*. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 377-383.
44. Lehmann PF, Kemker BJ, Hsiao CB, Dev S. Isoenzyme biotypes of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2514-2521.
45. Lehmann PF, Wu LC, Mackenzie DWR. Isozyme changes in *Candida albicans* domestication. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2623-5.
46. Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1815-1821.
47. Mata AL, Rosa RT, Rosa EAR, Gonçalves RB, Höfling JF. Clonal variability among oral *Candida albicans* assessed by allozyme electrophoresis analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 350-4.

48. Pujol C, Reynes J, Renaud F, Raymond M, Tibayrenc M, Ayala FJ, et al. The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 9456-9.
49. Rosa EAR, Pereira CV, Rosa RT, Höfling JF. Evaluation of different dehydrogenases to recognize *Candida* species commonly isolated from human oral cavities. *Rev Argent Microbiol* 1999; 31: 165-172.
50. Rosa EAR, Rosa RT, Boriollo MFG, Bernardo WLC, Höfling JF. Oral *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* differentiation by multilocus enzyme electrophoresis and sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Rev Argentina Microbiol* 2003; 35: 24-8.
51. San Millan RM, Wu LC, Salkin IF, Lehmann PF. Clinical isolates of *Candida guilliermondii* include *Candida fermentati*. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 385-393.
52. Markert CL, Moller F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic, and species specific patterns. *Proc Natl Acad Sci* 1959; 45: 753-763.
53. Dixon H, Webb EC. *Enzymes*. New York: Academic Press, 1979.
54. Harris H. *Isoenzymes*. New York: Academic Press, 1975.
55. Markert CL. Biology of isoenzymes. In: Markert CL. *Isoenzymes*. New York: Academic Press, 1975.
56. Scandalios JG. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants; a review. *Biochem Genet* 1969; 3: 37-79.
57. Conkle MT, Hodgskiss PD, Nunnally LB, Hunter SC. Starch gel electrophoresis of conifer seeds; a laboratory manual. Berkeley, Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, U.S. Forest Service, U.S. Department of Agriculture (Gen. tech. rep. PSW-64), 1982.
58. Prakash S, Lewontin RC, Hubby JL. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV patterns of genetic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 1969; 61: 841-858.
59. Brown AJ, Langley CH. Re-evaluation of level of genic heterozygosity in natural populations of *Drosophila melanogaster* by twodimensional electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci*, 1979; 76: 2381-4.
60. Huettermann A, Volger C, Schorn R, Ahnert G, Ganser HG. Studies on isoenzyme polymorphism in *Fomes annosus*. *Eur J For Pathol* 1979; 9: 265-274.
61. Holmberg K, Feroze F. Comparative study of the GenePath group 4 reagent system and other CHEF systems for karyotype analysis of *Candida* spp. *J Clin Lab Anal* 1995; 9: 184-192.
62. Newman P. Variation amongst isozymes of *Rhynchosporium secalis*. *Plant Pathol* 1985; 34:329-337.
63. Racine RR, Langley CH. Genetic heterozygosity in a natural population of *Mus musculus* assessed using two-dimensional electrophoresis. *Nature* 1980; 283: 855-7.
64. WHITTAM, T.S.; OCHMAN, H.; SELANDER, R.K. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 80: 1751-5, 1983.

65. Rosa EAR, Rosa RT, Pereira CV, Höfling JF. Grouping oral *Candida* species by multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50: 1343-9.
66. Rosa EAR, Rosa RT, Pereira CV, Boriollo MFG, Höfling JF. Analysis of parity between proteinbased electrophoretic methods for characterization of oral *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 801-6.
67. Rosa EAR, Rosa RT, Pereira CV, Boriollo MFG, Höfling JF. Analysis of parity between proteinbased electrophoretic methods for characterization of oral *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 801-6.
68. Shannon MC, Ballal SK, Harris JW. Starch gel electrophoresis of enzyme from nine species of *Polyporus*. *Amer J Bot* 1973; 60: 96-100.
69. Shecter Y. Symposium on the use of electrophoresis in the taxonomy of algae and fungi. *Bull Torrey Bot Club* 1973; 100: 253-312.
70. Harris H, Hopkinson DA. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1976.
71. Micales JA, Alfenas AC, Bonde MR. Isoenzimas na taxonomia e na genética de fungos. In: Alfenas AC. (coord). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998.
72. Siciliano MJ, Shaw CR. Separation and visualization of enzymes on gels. In: Smith I. et al., Chromatographic and electrophoretic techniques. London: A.W. Heinemann Medical Books, 1976.
73. Murphy RW, Sites JW, Buth DG, Haufler CH. Proteins I: isoenzyme electrophoresis. In: Hillis DM, Mortiz C. (coord). Molecular systematics. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Mass, 1990.
74. Pasteur N, Pasteur G, Bonbomme F, Catalan J, Britton-Davidian J. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Technique et documentation. Paris : Lavoisier, 1987.
75. Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Goudet J, Durussel C, Pagani JL, Chave JP, Bille J. Typing *Candida albicans* oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1235-1248.
76. Hunter PR. A critical review of typing methods for *Candida albicans* and their applications. *Crit Rev Microbiol* 1991; 17: 417-434.
77. Racine RR, Langley CH. Genetic heterozygosity in a natural population of *Mus musculus* assessed using two-dimensional electrophoresis. *Nature* 1980; 283: 855-7.
78. SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R.. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37: 67-75.
79. Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Merz WG. Association of electrophoretic karyotype of *Candida stellatoidea* with virulence for mice. *Infect Immune*. 1988; 56: 1814-9.
80. Lasker BA, Carle GF, Kobayashi GS, Medoff G. Comparison of the separation of *Candida albicans* chromosome-sized DNA by pulsedfield gel electrophoresis

- technique. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 3783-3793.
81. Lott TJ, Boiron P, Reiss E. An electrophoretic karyotype for *Candida albicans* reveals large chromosomes in multiples. *Mol Gen Genet* 1987; 209: 170-4.
 82. Magee BB, Magee PT. Electrophoretic karyotypes and chromosome numbers in *Candida* species. *J Gen Microbiol* 1987; 133: 425-430.
 83. Merz WG, Connelly C, Hieter P. Variation of electrophoretic karyotypes among clinical isolates of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1988; 26: 842-5.
 84. Snell RG, Wilkins RJ. Separation of chromosomal DNA molecules from *C. albicans* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 4401-6.
 85. Suzuki T, Kobayashi I, Mizuguchi I, Banno I, Tanaka K. Electrophoretic karyotypes in medically important *Candida* species. *J Gen Appl Microbiol* 1988; 34: 409-416.
 86. Thrash-Bingham C, Gor man JA. DNA translocations contribute to chromosome length polymorphisms in *Candida albicans*. *Curr Genet* 1992; 22: 93-100.
 87. Vollrath D, Davis RW. Resolution of DNA molecules greater than 5 megabases by contour-clamped homogeneous electric fields. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 7865-7876.
 88. Sangeorzan JA, Zervos MJ, Donabedian S, Kauffman CA. Validity of contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis as a typing system for *Candida albicans*. *Mycoses* 1995; 38: 29-36.
 89. Bostock A, Khattak MN, Matthews R, Burnie J. Comparison of PCR fingerprinting, by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 2179-2184.
 90. Gottfredsson M, Cox GM, Per fect JR. Molecular methods for epidemiological and diagnostic studies of fungal infections. *Pathology* 1998; 30: 405-418.
 91. Magee PT, Bowdin L, Staudinger J. Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2674-9.
 92. Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeauvais P, et al. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol* 1998; 36: 249-257.
 93. Vazquez JA, Beckley A, Sobel JD, Zervos MJ. Comparison of restriction enzyme analysis versus pulsed-field gradient gel electrophoresis as a typing system for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1991; 29:962-7.
 94. Asakura K, Iwaguchi S, Homma M, Sukai T, Higashide K, Tanaka K. Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *C. glabrata*. *J Clin Microbiol* 1991; 137: 2531-8.
 95. Barchiesi F, Hollis RJ, Del Poeta M, Mcgough DA, Scalise G, Rinaldi MG, et al. Transmission of fluconazole-resistant *Candida albicans* between patients with AIDS and oropharyngeal candidiasis documented by pulsed-field gel electrophoresis. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 561-4.
 96. Berenguer J, Diaz-Guerra TM, Ruiz-Diez B, de Quir os JCB, Rodriguez-Tudela JO, Martinez-Suarez JV. Genetic dissimilarity of two fluconazole-resistant *Candida albicans* strains causing meningitis and oral

- candidiasis in the same AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1542-5.
97. BRANCHINI, M.L.; GEIGER, D.C.; FISCHMAN, O.; PIGNATARI, A.C. Molecular typing of *Candida albicans* strains isolated from nosocomial candidemia. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 1995; 37: 483-7.
98. Doi M, Mizuguchi I, Homma M, Tanaka K. Electrophoretic karyotypes of isolates of *Candida albicans* from hospitalized patients. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 133-140.
99. Doi M, Homma M, Iwaguchi SI, Horibe K, Tanaka K. Strain relatedness of *Candida albicans* strains isolated from children with leukemia and their bedside parent. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 2253-9.
100. Espinel-Ingroff A, Quart A, Steele-Moore L, Metcheva I, Buck GA, Bruzzese VL, Reich D. Molecular karyotyping of multiple yeast species isolated from nine patients with AIDS during prolonged fluconazole therapy. *J Med Vet Mycol* 1996; 34: 111-6.
101. Iwaguchi S, Homma M, Tanaka K. Variation in the electrophoretic karyotype analysed by the assignment of DNA probes in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1990; 136: 2433-2442.
102. Lischewski A, Ruhnke M, Tennagen I, Schönian G, Morschhauser J, Hacker J. Molecular epidemiology of *Candida* isolates from AIDS patients showing different fluconazole resistance profiles. *J Gen Microbiol* 1995; 33: 769-771.
103. Lupetti A, Guzzi G, Paladini A, Swart K, Campa M, Senesi S. Molecular typing of *Candida albicans* in oral candidiasis: karyotype epidemiology with human immunodeficiency virus-seropositive patients in comparison with that with healthy carriers. *J Gen Microbiol* 1995; 33: 1238-1242.
104. Mahrous M, Lott TJ, Meyer SA, Awant AD, Ahearn DG. Electrophoretic karyotyping of typical and atypical *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1990; 28: 876-881.
105. Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T, Michel-Briand Y. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1115-8.
106. Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Redding SW, Smith J, Farinacci G, Fothergill AW, Rinald MG. Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 59-64.
107. Vazquez JA, Sobel JD, Demetriou R, Vaishampayan J, Lynch M, Zervos M. Karyotyping of *Candida albicans* isolates obtained longitudinally in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* 1994; 170: 1566-9.
108. Voss A, Pfaller MA, Hollis RJ, RhineChalberg J, Doebbeling BN. Investigation of *Candida albicans* transmission in a surgical intensive care unit cluster by using genomic DNA typing methods. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 576-580.
109. Ramsey H, Morrow B, Soll DR. An increase in switching frequency correlates with an increase in recombination of the ribosomal chromosomes of *Candida albicans* strain 3153A. *Microbiology* 1994; 140: 1525-1531.
110. Rustchenko-Bulgac EP. Variations of *Candida albicans* electrophoretic

- karyotypes. *J Bacteriol* 1991; 173: 6586-6596.
111. Rustchenko-Bulgac EP, Sherman F, Hicks JB. Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1990; 172: 1276-1283.
 112. Lockhart S, Fritch JJ, Meier AS, Schroepel K, Srikantha T, Galask R, et al. Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1501-9.
 113. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 452-6.
 114. Cormican MG, Hollis RJ, Pfaller MA. DNA macrorestriction profiles and antifungal susceptibility of *Candida* (*Torulopsis*) *glabrata*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 25: 83-7.
 115. Defontain A, Coarer M, And JP, Bouchara. Contribution of various techniques of molecular analysis to strain identification of *Candida glabrata*. *Microb Ecol H Dis* 1996; 9: 27-33.
 116. Defontain A, Coarer M, And JP, Bouchara. Contribution of various techniques of molecular analysis to strain identification of *Candida glabrata*. *Microb Ecol H Dis* 1996; 9: 27-33.
 117. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Wenzel RP, Pfaller MA. An outbreak of *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 29: 147-153.
 118. King D, Rhine-Chalberg J, Pfaller MA, Moser SA, Merz, WG. Comparison of four DNA-based methods for strain delineation of *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1467-1470.
 119. Pontieri E, Gregori L, Gennarelli M, Cedia T, Novelli G, Dallapiccola B, et al. Correlation of SfiI macrorestriction endonuclease fingerprinting analysis of *Candida parapsilosis* isolates with source of isolation. *J Med Microbiol* 1996; 45: 173-8.
 120. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey, SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6531-5.
 121. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 7213-8.
 122. Caetano-Anollés G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *Genome Res* 1993; 3: 85-94.
 123. Bart-Delabesse E, Van Deventer H, Goessens W, Poirot, JL, Lioret N, Van Belkum A, et al. Contribution of molecular typing methods and antifungal susceptibility testing to the study of a candidemia cluster in a burn care unit. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3278-3283.
 124. Bonacorsi SP, Munck A, Gerardin M, Doit C, Brahimi N, Navarro J, et al. In situ management and molecular analysis of candidaemia related to a totally implantable vascular access in a cystic fibrosis patient. *J Infect* 1996; 33: 49-51.
 125. Clemons KV, Feroze F, Holmberg K, Stevens DA. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic

- methods. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1332-6.
126. Del Castillo L, Bikandi J, Nieto A, Quindos G, Sentandreu R, Ponton J. Comparison of morphotypic and genotypic methods for strain delineation in *Candida*. *Mycoses* 1997; 40: 445-450.
127. Gyanchandani A, Khan ZK, Farooqui N, Goswami M, Ranade SA. Rapid analysis of *Candida albicans* strains recovered from immunocompromised patients (ICP) reveals an apparently non-random infectivity of the strains. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 44: 19-27.
128. Holmberg K, Feroze F. Evaluation of an optimized system for random amplified polymorphic DNA (RAPD)-analysis for genotypic mapping of *Candida albicans* strains. *J Clin Lab Anal* 1996; 10: 59-69.
129. Howell SA, Anthony RM, Power E. Application of RAPD and restriction enzyme analysis to the study of oral carriage of *Candida albicans*. *Lett. Appl. Microbiol* 1996; 22: 125-8.
130. Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3249-3254.
131. Robert F, Lebreton F, Bougnoux ME, Paugam A, Wassermann D, Schlotterer M, et al. Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2366-2371.
132. Steffan P, Vazquez JA, Boikov D, Xu C, Sobel JD, Akins RA. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2031-9.
133. Tietz HJ, Kussner A, Thanos M, de Andrade MP, Presber W, Schonian G. Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of *Candida albicans* from Africa. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2462-5.
134. Cobb BD, Clarkson JM. A simple procedure for optimizing the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 3801-5.
135. Gottfredsson M, Cox GM, Perfect JR. Molecular methods for epidemiological and diagnostic studies of fungal infections. *Pathology* 1998; 30: 405-418.
136. Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL. Artifactual variation in randomly amplified polymerase DNA banding patterns. *BioTechniques* 1993; 14: 214-7.
137. Loudon KW, Coke AP, Burnie JP. "Pseudoclusters" and typing by random amplification of polymorphic DNA of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Pathol* 1995; 48:183-4.
138. Loudon KW, Coke AP, Burnie JP, Lucas GS, Liu Yin JA. Invasive aspergillosis: clusters and sources? *J Med Ve. Mycol* 1994; 32: 217-224.
139. Meunier JR, Grimont PA. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res Microbiol* 1993; 144 373-9.
140. Bart-Delabesse E, Boiron P, Carlotti A, Dupont B. *Candida albicans* genotyping in studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2933-7.

141. Bart-Delabesse E, Boiron P, Carlotti A, Dupont B. *Candida albicans* genotyping in studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2933-7.
142. Khatib R, Thirumoorthi MC, Riederer KM, Sturm L, Oney LA, Baran JR. J Clustering of *Candida* infections in the neonatal intensive care unit: concurrent emergence of multiple strains simulating intermittent outbreaks. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 130-4.
143. Pfaller MA, Cabezudo I, Hollis R, Huston B, Wenzel RP. The use of biotyping and DNA fingerprinting in typing *Candida albicans* from hospitalized patients. *Diag Microbiol Infect Dis* 1990 ; 13 : 481-9.
144. Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 675-9.
145. Smith RA, Hitchcock CA, Evans EG, Lacey CJ, Adams DJ. The identification of *Candida albicans* strains by restriction fragment length polymorphism analysis of DNA. *J. Med Vet Micol* 1989; 27: 431-4.
146. Tanaka K. Strain-relatedness among different populations of the pathogenic yeast *Candida albicans* analyzed by DNA-based methods. *Nagoya J Med Sci* 1997; 60: 1-14.
147. Iwaguchi S, Homma M, Tanaka K. Clonal variation of chromosome size derived from the rDNA cluster region in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1992; 138: 1177-1184.
148. Su CS, Meyer SA. Characterization of mitochondrial DNA in various *Candida* species: isolation, restriction endonucleases reaction, size and base composition. *Int J Syst Bacteriol* 1991; 41: 6-14.
149. Olivo PD, Mcmanus EJ, Riggsby WS, Jones JM. Mitochondrial DNA polymorphism in *Candida albicans*. *J Infect Dis* 1987; 156: 214-5.
150. Wills JW, Lasker BA, Sirotkin K, Riggsby WS. Repetitive DNA of *Candida albicans*: nuclear and mitochondrial components. *J Bacteriol* 1984; 157: 918-924.
151. Pfaller MA, Messer SA, Houston A, RangelFrausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, et al. National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. *Diag Microbiol Infect Dis* 1998 ; 31 : 289-296.
152. Fox BC, Mobley HL, Wade JC. The use of a DNA probe for epidemiology studies of candidiases in immunocompromised hosts. *J Infect Dis* 1989; 159: 488-494.
153. Wilkinson BM, Morris L, Adams DJ, Evans EG, Lacey CJ, Walmsley RM. A new, sensitive polynucleotide probe for distinguishing *Candida albicans* strains and its use with a computer assisted archiving and pattern comparison system. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 123-131.
154. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
155. Mitchell TG, Sandin RL, Bowman BH, Meyer W, Merz WG. *Molecular Mycology: DNA probes and applications of PCR technology*. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 351-366.
156. Oren I, Manavathu EK, Lerner SA. Isolation and characterization of a species-specific DNA probe for *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 7113-6.

157. Weissman Z, Berdicevsky I, Cavari B. Molecular identification of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 205-7.
158. Magee BB, D'souza TM, Magee PT. Strain and species identification by restriction length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. *J Bacteriol* 1987; 169: 1639-1643.
159. Mercure S, Montplaisir S, Lemay G. Correlation between the presence of a self-splicing intron in the 25S rDNA of *C. albicans* and strain susceptibility to 5-fluorocytosine. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 6020-7.
160. Stein GE, Sheridan VL, Magee BB, Magee PT. Use of rDNA restriction fragment length polymorphisms to differentiate strains of *Candida albicans* in women with vulvovaginal candidiases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1991; 14: 459-464.
161. Whelan WL, Kirsch DR, Kwon-Chung KJ, Wahl SM, Smith PD. *Candida albicans* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: absence of a novel or hypervirulent strain. *J Infect Dis* 1990; 162: 513-8.
162. Whelan WL, Kirsch DR, Kwon-Chung KJ, Wahl SM, Smith PD. *Candida albicans* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: absence of a novel or hypervirulent strain. *J Infect Dis* 1990; 162: 513-8.
163. Carlotti A, Grillot R, Couble A, Villard J. Typing of *Candida krusei* clinical isolates by restriction endonucleases analysis and hybridization with the CkF1,2 DNA probe. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1691-9.
164. Fraser VJ, Keath EJ, Powderly WG. Two cases of blastomycosis from a common source: use of DNA restriction analysis to identify strains. *J Infect Dis* 1991; 163: 1378-1381.
165. Spitzer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 1989; 57: 1409-1412.
166. Spreadbury CL, Bainbridge BW, Cohen J. Restriction fragment length polymorphisms in isolates of *Aspergillus fumigatus* probed with part of the intergenic spacer region from the ribosomal RNA gene complex of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 1990; 136: 1991-4.
167. Glover DM. Genes for ribosomal DNA. In: Maclean M, Gregory SP, Flavell RA. (coord). *Eukaryotic genes: their structure and regulation*. Butterworth & Co., Cambridge, United Kingdom, 1983.
168. Hatlan LE, Attardi G. Preparation of the HeLa cell genome complementary to tRNA and 5SRNA. *J Mol Biol* 1971; 56: 535-554.
169. Schweizer E, Mackechnie C, Halvorson HD. The redundancy of ribosomal and transfer RNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 1969; 40: 261-278. (SEGAL; BAUM, 1994)
170. Vlad M. Quantitative studies of rDNA in amphibians. *J Cell Sci* 1977; 24: 109-118.
171. Scherer S, Magee RT. Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 1990; 54: 226-241.
172. Wills JW, Troutman WB, Riggsby WS. Circular mitochondrial genome of *Candida albicans* contains a large inverted duplication. *J Bacteriol* 1985; 164: 7-13.

173. Lacher DA, Lehmann PF. Application of multidimensional scaling in numerical taxonomy: analysis of isoenzyme types of *Candida* species. *Ann Clin Lab Sci* 1991; 21: 94-103.
174. Pujol C, Renaud F, Mallie M, Meeus T, Bastide JM. Atypical strains of *Candida albicans* recovered from AIDS patients. *J Med Vet Mycol* 1997; 35: 115-121.
175. Scherer S, Stevens DA. A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 1452-6.
176. Anthony RM, Midgley J, Sweet SP, Howell SA. Multiple strains of *Candida albicans* in the oral cavity of HIV positive and HIV negative patients. *Microbiol Ecol Health Dis* 1995 8: 23-30.
177. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS* 1997; 11: 557-567.
178. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE., Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS* 1997; 11: 557-567.
179. Kleinegger C, Lockhart SR, Vargas K, Soll DR. Frequency, intensity, species and strains of oral yeast vary as a function of host age. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2246-2254.
180. Kuehnert MJ, Clark E, Lockhart SR, Soll DR, Chi J, Jarvis WR. *Candida albicans* endocarditis traced to a contaminated aortic valve allograft: implications for regulation of allograft processing. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 688-691.
181. Lockhart SR, Reed BD, Pierson CL, Soll DR. Most frequent scenario for recurrent *Candida* vaginitis is strains maintenance with "substrain shuffling": demonstration by sequential DNA fingerprinting with probes Ca3, C1, and CARE2. *J Clin.Microbiol* 1996; 34: 767-777.
182. Mccullough MJ, Ross BC, Dwyer BD, Reade PC. Genotype and phenotype of oral *Candida albicans* from patients infected with the human immunodeficiency virus. *Microbiology* 1994; 140: 1195-1202.
183. Mercure S, Poirier S, Lemay G, Auger P, Montplaisic S, Repentigny L. Application of biotyping and DNA typing of *Candida albicans* to the epidemiology of recurrent vulvovaginal candidíasis. *J Infect Dis* 1993; 168: 502-7.
184. Pfaller MA, Lockhart SR, Pujol C, SwailsWenger JA, Messer SA, Edmond MB, et al. Hospital specificity, region specificity, and fluconazole-resistance of *Candida albicans* bloodstream isolates. *J Clin Microbiol* 1998 ; 36: 1518-1529.
185. Pierson DL, Mehta SK, Magge BB, Mishra SK. Person-to-person transfer of *Candida albicans* in the spacecraft environment. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 145-150.
186. Schmid J, Voss E, Soll DR. Computer-assisted methods for assessing *Candida albicans* strain relatedness by Southern blot hybridization with repetitive sequence Ca3. *J. Clin Microbiol* 1990; 28: 1236-1243.
187. Schmid J, Rotman M, Reed B, Pierson CL, Sol, DR. Genetic similarity of *Candida albicans* strains from vaginitis patients and their partners. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 39- 46.
188. Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Wouters L, Goossens,H. Isolation of *Candida* species on media with and without added fluconazole

- reveals high variability in relative growth susceptibility phenotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1625- 1635.
189. Schroepel K, Rotman M, Galask R, Mac K, Soll DR. The evolution and replacement of *C. albicans* strains during recurrent vaginitis demonstrated by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2646-2654.
190. Soll DR, Galask R, Schmid J, Hanna C, Mac K, Morrow B. Genetic dissimilarity of commensal strains of *Candida* spp. carried in different anatomical localizations of the same healthy women. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1702-1710.
191. Sullivan D, Bennett D, Henman M, Harwood P, Flint S, Mulcahy F, et al. Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2124-2133.
192. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman D. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV infected individuals. *Microbiology* 1995; 141: 1507-1521.
193. White TC, Pfaller MA, Rinaldi MC, Smith J, Redding S. Stable azole drug resistance associated with a substrain of *Candida albicans* from an HIV-infected patient. *Oral Dis.* 1997; 3: 102-9.
194. Sullivan D, Haynes K, Bille J, Boerlin P, Roder o L, Lloyd S, et al. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 960-4.
195. Diaz-Guerra TM, Martinez-Suarez JV, Laguna F, Rodriguez-Tudela JL. Comparison of four molecular typing methods for evaluating genetic diversity among *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency viruspositive patients with oral candidiases. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 856-861.
196. Sol, DR, Staebell M, Langtimm CJ, Pfaller M, Hicks J, Rao TVG. Multiple *Candida* strains in the course of a single systemic infection. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1448-1459.
197. Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR. Defenses against oral *Candida* carriage break down in the elderly. *J Dent Res* 1999; 78 :857-868.
198. Marco F, Lockhart SR, Pfaller MA, Pujol C, Rangel-Frausto,MS, W iblin T, et al. Elucidating the origins of nosocomial infections with *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the complex probe Ca3. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2817-2828.
199. Odds F, Schmid J, Soll DR. Epidemiology of *Candida* infections in AIDS In: Bossche HV. (coord). *Mycoses in AIDS patients* New York: Plenum, 1990.
200. Schmid J, Tay YP, Wan L, Carr M, Parr D, Mckinney W. Evidence for nosocomial transmission of *Candida albicans* obtained by Ca3 fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 1223-1230.
201. Soll DR. DNA fingerprinting of *Candida albicans*. *J Mycol Med* 1993; 3: 37-44.
202. Chibana H, Magee BB, Grindle S, Ran Y, Scherer S, Magee PT. A physical map of chromosome 7 of *Candida albicans* . *Genetics* 1998; 149: 1739-1752.

203. Lasker BA, Page LS, Lott TJ, Kobayashi GS. Isolation, characterization, and sequencing of *Candida albicans* repetitive element 2. *Gene* 1992; 116: 51-7.

Recebido em / Received in: 18.01.2005

Aceito em / Accepted in: 22.02.2005

Recebido em 12/04/2005; aceito em 17/04/2005

Received in 04/17/2005; accepted in 47/17/2005