

JANAINA APARECIDA DE OLIVEIRA RODRIGUES

BIÓLOGA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS E
SOROLÓGICOS NA CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES
DE *Candida* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE
HUMANOS**

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de Mestre em
Biologia e Patologia Buco-Dental**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**PIRACICABA
2000**



JANAINA APARECIDA DE OLIVEIRA RODRIGUES
BIÓLOGA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS E
SOROLÓGICOS NA CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES
DE *Candida* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE
HUMANOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de Mestre em
Biologia e Patologia Buco-Dental

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 06/05/00


Assinatura do Orientador

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Francisco Höfling
Prof. Dr. Celso Paulino da Costa
Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

PIRACICABA
2000

8248002

CHAMADA:
 UNICAMP
 R. 618a
 Ex.
 IMBO BC/ 41591
 VOC. 278/00
 C ☐ D ☒
 RECO R. 611,00
 ATA 14-07-00
 CPD

CM-00142373-6

Ficha Catalográfica

R618a

Rodrigues, Janaina Aparecida de Oliveira.

Avaliação de métodos bioquímicos e sorológicos na caracterização de espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal de humanos. / Janaina Aparecida de Oliveira Rodrigues. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.

114p. : il.

Orientador : Prof. Dr. José Francisco Höfling.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Leveduras (Fungos). 2. Antígenos – Imunologia. 3. Eletroforese em gel. I. Höfling, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2000, considerou a candidata JANAINA APARECIDA DE OLIVEIRA RODRIGUES aprovada.

1. Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING

2. Profa. Dra. DENISE MADALENA PALOMARI SPOLIDÓRIO

3. Prof. Dr. CELSO PAULINO DA COSTA

Dedico esse trabalho,

Aos meus pais, **Lucila e João Manoel**, pelo exemplo de vida, por compartilharem comigo minhas emoções e pelo incentivo para prosseguir o meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José F. Höfling pela orientação e confiança.

Aos Professores Doutores Celso P. da Costa (FOP-UNICAMP) e Denise M. P. Spolidorio (UNESP-Araraquara) por aceitar participar da banca examinadora para avaliação deste trabalho.

À Professora Doutora, Darcy O. Tosello (FOP-UNICAMP), coordenadora do Curso de Pós-Graduação, pelo apoio.

Ao Professor Doutor Flávio C. A. Tavares da ESALQ-USP, por permitir que parte do trabalho fosse desenvolvido no Laboratório de Genética de leveduras.

Aos Professores Doutores, Sérgio R. P. Line, Ricardo Colleta e Reginaldo Bruno Gonçalves (FOP-UNICAMP), Ana M. Sell, Rozangela Verlengia pela colaboração neste trabalho.

Ao Professor Doutor Jorge A. M. Rezende do Laboratório de Virologia (ESALQ-USP) pela inestimável ajuda no andamento desse trabalho.

Às Professoras Doutoras Maria C. F. de Arruda Veiga, Fernanda K. Marcondes e Cláudia H. Tambeli (FOP-UNICAMP), da área de Fisiologia por permitir a manutenção dos animais no biotério.

Aos amigos Luiz H. Gomes e Keila M. R. Duarte, meus agradecimentos hoje e sempre pelos ensinamentos.

Ao Quelmo S. de Novaes pelo auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas de laboratório, Marcelo F. Boriollo, Edvaldo R. Rosa, Cássio V. Pereira, Cristina C. Rodrigues, Daniela Moreira, Meire T. Rosa, Alessandra S. Campos e Marcelo Napimoga pela amizade.

Aos colegas Jonas A. R. Paschoal, Felipe G. Andralion, Fábio H. B. da Silva e Gildemberg A. L. Junior pelo apoio e amizade durante o período de convívio.

À amiga Hannah C. Silva que muito me incentivou no desenvolvimento desse trabalho e aos colegas de turma, Wagner C. R. Junior e Nadja R. de Melo.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP, Anderson L. Teixeira e as Senhoras Wilma C. Ferraz e Elza M. Thomazini, pela colaboração neste trabalho.

À técnica do laboratório de genética de leveduras (ESALQ-USP) Ana Maria B. Giacomelli, sempre pronta a auxiliar na realização deste trabalho.

Ao Emílio C. Salles do Centro de Processamento de Dados (FOP-UNICAMP), pelo auxílio neste trabalho na parte de informática.

Aos bioteristas da FOP – UNICAMP Wanderlei F. Vieira e Luiz G. do Amaral, pela colaboração nos cuidados com os animais, sem estes o presente trabalho não teria se realizado.

Aos técnicos do Laboratório de Isótopos Estáveis, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), Sr. José A. Bonassi e Sra. Maria A. Z. Perez, pelo fornecimento de nitrogênio líquido.

À Fundação André Tosello, pelo fornecimento das linhagens-tipo empregadas nesse trabalho.

À todos aqueles que de alguma forma auxiliaram na realização desse trabalho.

À CAPES, pela concessão de bolsa mestrado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1: Relação das espécies de <i>Candida</i> sp. isoladas da cavidade oral de humanos, linhagens-tipo e a referência extra-genérica empregadas nos experimentos.	48
FIGURA 1: Método de extração e obtenção de antígenos.	51
TABELA 2: Relação das espécies, coloração e morfologia da cultura obtida no teste de crescimento em meio de cultivo cromogênico (CHROMagar <i>Candida</i>®).	52
TABELA 3: Esquema de imunização usado na produção de anticorpos policlonais.	54
TABELA 4 – Relação das amostras de leveduras submetidas à identificação presuntiva em meio cromogênico.	62
TABELA 5: Concentração protéica em mg/mL dos extratos das amostras, submetidas a 5, 10 e 60 minutos de centrifugação a 105.000 g.	63
FIGURA 2: Teste imunoenzimático (ELISA) com anticorpos policlonais em reação com antígenos de <i>C. albicans</i> (CBS-562).	64
FIGURA 3: Teste imunoenzimático (ELISA) com anticorpos policlonais em reação com antígenos de <i>C. albicans</i> (97-a).	65

FIGURA 4: Teste imunoenzimático (ELISA) com anticorpos policlonais AS-3(42) em reação com antígenos diluídos CBS-562, 97-a, CBS-573 e IZ-1339..	66
FIGURA 5: Teste imunoenzimático (ELISA) com antissoro AS-3 (42) em reação com antígenos de <i>Candida</i> (1 a 18) e <i>K. marxianus</i> (19) obtidos em diferentes tempos de centrifugação.	67
FIGURA 6: Teste imunoenzimático (ELISA) com antissoro AS-4(42) em reação com antígenos de <i>Candida</i> (1 a 18) e <i>K. marxianus</i> (19), obtidos em diferentes tempos de centrifugação.	68
TABELA 6: Dosagem de IgG purificada em coluna de Sefarose-proteína A...	68
FIGURA 7: Teste imunoenzimático (ELISA) com soro bruto AS-3(42) e purificado (IgGs) em reação com antígenos das 19 linhagens de leveduras testadas.	69
FIGURA 8: Teste imunoenzimático (ELISA) com soro bruto AS-4(42) e purificado (IgGs) em reação com antígenos de 19 linhagens de leveduras testadas.	70
FIGURA 9: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de extratos protéicos das linhagens (97-a) e (CBS-573).	71
FIGURA 10: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) dos extratos protéicos das linhagens de leveduras obtidos por centrifugação a 105.000 g por 60 minutos; MMM) Marcador de massa molecular, Linhagens 1) CBS-562, 2) 97-a, 3) F-72, 4) E-72, 5) FCF-405, 6) FCF-152), 7) 1-b, 8) CBS-94, 9) FCF-430 e 10) Ct-4.....	72

FIGURA 11: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) dos extratos protéicos das linhagens de leveduras obtidos por centrifugação a 105.000 g por 60 minutos; MMM) Marcador de massa molecular, Linhagens 11) CBS-604, 12) 21-c, 13) 7-a, 14) 4-c, 15) 17-b, 16) CBS-566, 17) CBS-573, 18) 1M-90 e 19) IZ-1339. 73

FIGURA 12: Diagrama do perfil eletroforético (SDS-PAGE) das bandas protéicas das linhagens CBS-562, 97-a, F-72, E-37, FCF-405, FCF-152, 1-b, CBS-94 e FCF-430 e Ct-4. 75

FIGURA 13: Diagrama do perfil eletroforético (SDS-PAGE) das bandas protéicas das linhagens CBS-604, 21-c, 7-a, 4-c, 17-b, CBS-566, CBS-573, 1M-90 e IZ-1339. 76

FIGURA 14: Dendrograma de similaridade dos perfis eletroforéticos obtidos das 19 linhagens de leveduras analisadas, utilizando-se o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM). 78

LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E UNIDADES

A₁ = coelho 1;

A₂ = coelho 2;

A₃ = coelho 3;

A₄ = coelho 4;

AS = Antissoro;

AS-3(42) = Antissoro do coelho 3 da coleta do 42^o dia de imunização;

AS-4(42) = Antissoro do coelho 4 da coleta do 42^o dia de imunização;

AMV = nepovírus do mosaico arábico - “arabics mosaic nepovirus”;

B = linfócito B;

BSA = Soro Albumina Bovina;

CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Netherlands;

D. O. = Densidade Ótica;

DNA = ácido desoxirribonucleico – “Desoxiribonucleic Acid”;

ELISA = Imunoensaio de Ligação Enzimática – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”;

g = grama;

°C = escala Célsius de temperatura;

g = gravidade (unidade de força centrífuga);

EDTA = Etilenodiamina-tetraacetato;

FIG. = Figura;

HIV = vírus da imunodeficiência humana – “Human Immunodeficienty Virus”;

h = horas;

Ig = Imunoglobulina;

IgGs = Imunoglobulinas G;

J = coeficiente de similaridade “Jaccard”;

kDa = kilodaltons;

Kg = quilograma;

MMM = marcador de massa molecular;

M. C. L. = Meio Completo para Levedura;

µg = micrograma;

µL = microlitro;

µm = micrômetro;

mA = miliamper;

mg = miligrama;

mL = mililitro;

mm = milímetro;

mM = milimolar;

min. = minutos;

M = molar;

N = Normal;

nm = nanômetro;

NTSYS-pc = Sistema de análise multivariada e taxonomia numérica - “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System-personal computer”;

OPD = Orto-fenilenodiamina;

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida - “Polyacrylamide Gel Electrophoresis”;

PBS = Tampão Salina Fosfato - “Phosphate Buffer Saline”;

PBS-T-G = tampão Salina Fosfato-Tween 20-Gelatina;

pH = potencial hidrogeniônico;

q.s.p. = quantidade suficiente para;

r = coeficiente de correlação baseado no momento de Person;

RAPD = polimorfismo de DNA amplificado ao acaso - “Random Amplified Polymorphic DNA”;

rpm = rotações por minuto;

RRV = vírus do mosaico em anel - “Raspberry Ringspot nepovirus”;

S = grau de similaridade;

SD = Sedimento;

SN_A = Sobrenadante-Antígeno;

SN_D = Sobrenadante Descartado;

SDS = dodecil sulfato de sódio - “Sodium Dodecyl Sulfate”;

SM = coeficiente de similaridade “Simple Matching”;

SAHN-clustering = desempenho sequencial de aglomeração hierárquica de grupos - “Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested”;

T = linfócito T;

TAB. = Tabela;

TEMED = N, N, N¹, N¹-Tetrametil-etilenodiamina;

Tris = tris (hidroximetil) aminometano;

UPGMA = Método de agrupamento pareado sem peso com significado aritmético - “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”;

YPD = meio extrato de levedura-peptona-glucose - “Yeast Peptone Dextrose”.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	15
LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E UNIDADES.....	19
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4. RESULTADOS.....	61
5. DISCUSSÃO.....	79
6. CONCLUSÕES.....	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
8. APÊNDICE.....	107

RESUMO

O projeto de pesquisa teve como objetivo a avaliação de métodos bioquímicos e sorológicos na caracterização de espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal de humanos, com ênfase na Taxonomia, Sistemática e estudos epidemiológicos. As linhagens empregadas são representativas de 5 espécies de *Candida*: 97-a, F-72, E-37, 17-b e CBS-562^T (*C. albicans*), FCF-405 e FCF-152 e CBS-566^T (*C. guilliermondii*), 21-c, 7-a e CBS-604^T (*C. parapsilosis*), 1M-90, 4-c e CBS-573^T (*C. krusei*), 1-b, FCF-430, Ct-4 e CBS-94^T (*C. tropicalis*). Como controle negativo foi empregada a linhagem IZ-1339 (*Kluyveromyces marxianus*). Os métodos bioquímicos e sorológicos utilizados, se basearam no cultivo em meio cromogênico CHROMagar *Candida*®, ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) e eletroforese de proteínas SDS-PAGE. Os resultados obtidos nos testes com CHROMagar *Candida*® revelaram especificidade para as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*; as espécies *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* apresentaram coloração rosa e creme respectivamente, o que não é específico para essas espécies. O método SDS-PAGE revelou diferenças significativas nos perfis eletroforéticos dos extratos protéicos intracelulares obtidos, apresentando diminuição no número de bandas protéicas em relação ao aumento do tempo de centrifugação. Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) não revelaram

diferenças na reatividade para os extratos, expressa em densidade ótica (D. O.), quando comparados. Em ordem decrescente de especificidade o SDS-PAGE mostrou-se mais eficiente na caracterização dos isolados agrupando-os em espécies, seguida do uso do CHROMagar Candida[®] que apresentou maior especificidade para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, mas não para as demais espécies. O método de ELISA utilizando anticorpos policlonais, se mostrou pouco efetivo na identificação das espécies por apresentar um alto grau de reação cruzada com outras leveduras.

ABSTRACT

This work had the purpose to evaluate biochemistry and serological methods to characterize *Candida* species from human oral cavity, emphasizing taxonomy, systematic and epidemiological studies. The strains used represent the five *Candida* species: 97-a, F-72, E-37, 17-b and CBS-562^T (*C. albicans*), FCF-405 and FCF-152 and CBS-566^T (*C. guilliermondii*), 21-c, 7-a and CBS-604^T (*C. parapsilosis*), 1M-90, 4-c and CBS-573^T (*C. krusei*), 1-b, FCF-430, Ct-4 and CBS-94^T (*C. tropicalis*). As negative control the strain IZ-1339 (*Kluyveromyces marxianus*) were used. The biochemical and serological methods used were based upon the growth in chromogenic medium CHROMagar Candida[®], ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and protein electrophoresis (SDS-PAGE). The method CHROMagar Candida[®] showed specificity for the *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei* species but it was not able to identify the *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* species, since it showed rose and vanilla color, respectively, which is not specific for these two species. The SDS-PAGE showed significative differences in the electrophoretic patterns from the proteic cellular extracts, showing a decrease of the number of bands compared to the increase of the centrifugation time. The ELISA could not present differences among the cell extracts, expressed in O.D., when compared. In an increasing order of specificity, the SDS-PAGE

seemes to be the more efficient for the strains characterization, being able to group the species, followed by the CHROMagar Candida[®] which showed specificity for the *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*, but not for the remaining species studied. The ELISA using polyclonal antibodies was ineffective to identify species due to the high level of cross-reaction.

1. INTRODUÇÃO

Dentre todos os seres vivos, os fungos e leveduras fazem parte de um reino próprio: o reino Fungi, apresentando características morfológicas muito particulares, o que faz com que as vezes, possam ser prontamente reconhecidos.

As leveduras são microrganismos comuns na cavidade bucal, vivendo de maneira comensal ou parasitária, sobretudo as do gênero *Candida*. O mais freqüente desses microrganismos que tem sido isolado é *Candida albicans*, o qual tem sido associado à doenças infecciosas, em indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes. Fatores predisponentes como leucemia, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), juntamente com procedimentos cirúrgicos extensivos ou administração de antibióticos, assim como transplante de órgãos associado ao emprego de medicamentos imunossupressores, favorecem o desenvolvimento de sua ação patogênica, causando patologias diversas para o homem, particularmente a candidíase, micose superficial de maior freqüência na boca. Outros eventos biológicos locais como uso de próteses e presença de cárie, predispõem à candidíase demonstrando a sua importância na cavidade bucal. Estas patologias têm requerido o aprimoramento de métodos para caracterização desses microrganismos, com ênfase em estudos clínicos, taxonômicos e epidemiológicos.

Em laboratórios clínicos e de pesquisa, a forma mais eficaz para identificação presuntiva de *C. albicans* tem sido o teste de tubo germinativo, embora este seja um teste rápido, podem ocorrer problemas na interpretação, como resultados falso positivo ocasionados pelo aumento do tempo de incubação e falsos negativos devido à grande quantidade de inóculo. Além disso, o tempo necessário para detalhamento no exame ao microscópio por indivíduos não especializados pode levar a resultados errôneos.

Outros métodos como: estudo da macro e micromorfologia, provas bioquímicas e fisiológicas - auxonograma, produção de urease, obtenção de clamidósporo - entre outros, são também empregados para identificação de leveduras. Porém estes métodos requerem várias etapas, as vezes necessitando vários dias de trabalho para tipificação de uma única cepa.

Nas últimas décadas, métodos bioquímicos e sorológicos tais como: testes fermentativos, pesquisa de antígenos e/ou anticorpos e eletroforese têm despertado o interesse de pesquisadores e clínicos na identificação de células leveduriformes.

Com base na literatura disponível e com o objetivo de contribuir com os estudos de identificação e caracterização desses microrganismos, métodos como a análise presuntiva em meio cromogênico (CHROMagar Candida[®]), ensaio imunoenzimático (ELISA) e eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram avaliados, empregando-se isolados de *Candida* provenientes da cavidade bucal de humanos. Com os resultados do emprego dessas técnicas, procurou-se estabelecer também, as relações de afinidade fenética entre os isolados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os fungos filamentosos, os cogumelos e as leveduras fazem parte dos Mycobionta, com aproximadamente 70.000 espécies (CARLILE & WATKINSON, 1994). Produzem esporos e corpos de frutificação tendo como substância de reserva glicogênio e lipídios. Apresentam-se formando corpo vegetativo, ou então, formando estruturas leveduriformes (células “ovaladas”). O corpo vegetativo desses microrganismos é formado de modo geral por filamentos ramificados, com crescimento apical, denominados hifas. Estas, por sua vez, podem ser septadas ou não (cenocíticas). Quando se agrupam, formam os micélios, que quando possuem as estruturas de reprodução do fungo, são denominados de reprodutivos ou aéreos com formação de esporos e, quando penetram no meio de cultura para retirar os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento, de vegetativos. Além dos fungos filamentosos, existem as leveduras, organismos que têm sido vistos como importantes agentes patogênicos dos seres vivos.

As espécies do gênero *Candida* – de modo geral – são dimórficas; na forma de levedura apresentam-se como células globosas, Gram positivas, ovaladas ou alongadas, medindo em média 3 a 7 micrômetros de largura por 3 a 14 micrômetros de comprimento (MEYER *et al.*, 1984). Quando na forma

de micélio, apresentam-se como pseudohifas, podendo formar hifas verdadeiras, que se alongam a partir das leveduras (ODDS, 1987).

As leveduras do gênero *Candida* acham-se amplamente espalhadas na natureza, sendo que algumas espécies vivem como saprófitas ou parasitas no homem e em outras espécies animais de sangue quente (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990a). A espécie de maior importância do ponto de vista médico, *Candida albicans*, está associada obrigatoriamente a seres humanos ou outros animais homotermos (SHEPERD *et al.*, 1985) e sua forma leveduriforme vive normalmente na orofaringe, cavidade bucal e peribucal, nas dobras da pele, na secreção brônquica, trato genito-urinário e gastrointestinal de humanos (LACAZ, 1980). Entretanto, formas miceliais desse microrganismo também são encontradas em tecidos infectados (BURNIE *et al.*, 1985). Particularmente em relação à boca, as leveduras são fungos pertencentes à microbiota bucal normal de indivíduos saudáveis. A *C. albicans* é a espécie dominante na cavidade bucal, constituindo de 60 a 70% do total dos fungos isolados (STENDERUP, 1990) sendo que *C. glabrata* e *C. tropicalis* vêm em sequência, seguidos de outras espécies de *Candida* e os gêneros *Rhodotorula* e *Saccharomyces*, que são de ocorrência rara e transitória. A *C. albicans* tem sido isolada de crianças e adultos em várias circunstâncias (RUSSEL & LAY, 1973; LAY & RUSSEL, 1977; ARENDOF & WALKER, 1980; BERKICEVSKY *et al.*, 1980; BERDICEVSKY *et al.*, 1984; MOREIRA, 1997).

Em condições normais, o organismo mantém esses microrganismos como comensais, entretanto, alterações locais ou sistêmicas favorecem o desenvolvimento da sua ação patogênica, causando patologias para o homem, particularmente a candidíase (ALY *et al.*, 1975; KIMURA & PEARSALL,

1978; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990b). As razões pelas quais *C. albicans* está presente em portadores sadios não estão claramente definidas, porém sugere-se que fatores nutricionais, interações com a microbiota bacteriana e presença de anticorpos na saliva possam contribuir para sua evidência na cavidade bucal (STENDERUP, 1990).

A ocorrência cada vez maior de infecções ocasionadas por *Candida*, associada aos novos conhecimentos micológicos, etiopatogenéticos, clínicos, patológicos, imunológicos e terapêuticos sobre essa doença, tem justificado o grande interesse de pesquisas com esses microrganismos, os quais têm sido estudados do ponto de vista morfológico, citológico, fisiológico, patológico, imunológico, de diagnóstico, taxonômico, etc. (TASCHDJAN *et al.*, 1960; GORDON & LITTLE, 1963; AHEARN, 1970; PITT & MILLER, 1970; JOSHI *et al.*, 1973; SANDULLA, 1974; AXELSEN, 1976; MCGINNIS, 1976; GUNASEKARAN & HUGHES, 1977).

A avaliação resultante do conjunto dos caracteres obtidos pelas provas quantitativas e qualitativas no estudo das leveduras, permite a seleção das espécies em diferentes gêneros. Desta forma, a tipagem das cepas é obtida através da avaliação do conjunto das características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, genéticas, tipo de reprodução, aspectos macromorfológicos dos cultivos, exigências nutricionais, osmofilia, reações com soros específicos, etc. As afinidades taxonômicas das espécies de *Candida* com outras leveduras foram inicialmente esclarecidas pelos estudos mais precisos de seus ciclos de vida. No entanto, a identificação e caracterização desses microrganismos pelos métodos convencionais, é morosa e trabalhosa, sendo que tem sido propostas várias técnicas para a identificação rápida das espécies do gênero *Candida*, especialmente a *C. albicans*, por ser

esta a que determina maior número de infecções, tanto no homem como nos animais, sendo considerada a mais patogênica de todas (LACAZ, 1980).

A maioria das candidíases (90%) é causada por *C. albicans* (WINNER, 1975). Outras espécies de *Candida* encontradas nas infecções humanas são *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. kefyr*, (SAMARANAYAKE & MACFARLANE, 1990) e tem sido mostrado que muitos indivíduos podem abrigar mais de uma dessas espécies ao mesmo tempo, sendo que em pacientes hospitalizados e imunocomprometidos, a ocorrência desses microrganismos é mais comum (ODDS, 1987).

A existência intrabucal na forma comensal desses organismos, ocorre em pelo menos 50% da população, e possivelmente mais que 90% dos indivíduos saudáveis podem ser potencialmente portadores desses microrganismos (ODDS, 1987). Tradicionalmente, nos laboratórios clínicos e de pesquisa, a forma mais eficaz para identificação presuntiva de isolados de *C. albicans* tem sido o teste de tubo germinativo. Como descrito por RINALDI (1993), a formação de tubo germinativo em *C. albicans* requer que as leveduras estejam em correto estado nutritivo, na presença de um indutor (por exemplo, soro ou outras formulações químicas que mimetizam o soro) numa temperatura maior que 33⁰ C e um pH próximo do neutro. Embora esse seja um teste rápido, a interpretação errônea de alongamentos de blastoconídios (falso positivo), devido ao aumento do tempo de incubação ou falsos negativos devido a grande quantidade de inóculo, podem acarretar problemas na identificação. Isso juntamente com o tempo necessário para detalhamento no exame ao microscópio por indivíduos não especializados, pode tornar esse teste passível de erro em trabalhos de laboratório. Tem sido relatado que 5% das *C. albicans* isoladas são tubo germinativo negativos (SALKIN *et al.*, 1987; QUINDOS *et al.*, 1997).

A identificação dos fungos leveduriformes se faz também, pelo estudo de sua macro e micromorfologia, provas bioquímicas e fisiológicas como auxonograma, zimograma, produção de urease, obtenção de clamidósporos, formação de tubos germinativos, etc (KREJER-VAN RIJ, 1984; ODDS, 1991). Apesar desses serem métodos convencionais e de importância na identificação desses organismos, envolvem uma série de etapas que consomem vários dias de trabalho para a tipificação de uma cepa.

Com base em características fisiológicas e bioquímicas, existem meios diferenciais (com substratos cromogênicos) nos quais as colônias tomam diferentes colorações, como o meio de Pagano e Levin com trifeniltetrazólio que se reduz a trifenilformazana. Nesse meio, segundo sua capacidade de redução, as colônias tomam uma coloração variando de roxo a rosa claro (PAGANO & LEVIN, 1958). Outro meio cromogênico é o agar BIGGY (meio de Nickerson) com sulfito de bismuto, onde a cor das colônias variam podendo ser bege (ou marrom) ao negro (MENDEL *et al.*, 1960; O'BREIN, 1964). Também existem meios para identificação específica de *C. albicans* que utilizam azul de anilina ou ácido fosfomolibdico (COSTAS & de LOURDES BRANCO, 1964; GOLDSCHMIDT *et al.*, 1991; QUINDÓS *et al.*, 1992). Entretanto, esses meios não são implantados na rotina de laboratórios para identificação presuntiva de espécies leveduriformes, porque só permitem diferenciar algumas espécies e as vezes apresentam resultados falso positivo ou falso negativos. Os sistemas comerciais de que se dispõe atualmente, permitem uma rápida identificação para um determinado espectro de leveduras de interesse clínico, uns mais amplos que outros dependendo da marca, porém resultam num custo elevado para sua utilização massiva em laboratórios de microbiologia.

Na busca e avaliação de métodos rápidos para o isolamento e identificação de leveduras de interesse clínico, GIUSIANO & MANGIATERRA (1998) relataram o uso de um meio cromogênico que se destina à diferenciação e identificação de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (ODDS & BERNAERTS, 1994; PFALLER *et al.*, 1996), concluindo que esse meio é de grande utilidade para facilitar o isolamento, diferenciação e identificação presuntiva e rápida, tanto de cepas puras como de cultivos mistos de espécimes clínicos. Isto é importante para amostras de pacientes imunocomprometidos onde a necessidade de um diagnóstico correto e rápido é de fundamental importância.

Do ponto de vista sorológico, foi por volta de 1938, que Jelinek (cf. JOLY, 1954) demonstrou que as reações sorológicas são um recurso fundamental para se classificarem as leveduras, justificando que os microrganismos apresentam grande variabilidade e inconstância de caracteres celulares, fatores de erros na sistemática morfológica. O melhor conhecimento da estrutura antigênica das espécies de *Candida* permitiria a compreensão dos fenômenos imunológicos desencadeados nos hospedeiros - homem e animais - bem como o aprimoramento no preparo de antígenos com finalidade imunodiagnóstica e como critério taxonômico para a classificação das leveduras.

Segundo KEMP & SOLOTOROVSKY (1963), foi Benham, em 1935, quem primeiro sugeriu a existência de um grupo de antígenos e que mostrou a dificuldade em se diagnosticar por aglutinação, devido a reatividade cruzada entre as diferentes espécies, demonstrando a inespecificidade, devido a reação cruzada entre *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces* e *Hansenula*. Hasenclever e Mitchell demonstraram a existência de dois grupos antigênicos em *Candida*

albicans através da aglutinação de leveduras em presença de soros imunes. Um tendo estrutura antigênica idêntica à *C. tropicalis*, denominado sorotipo A, e outro idêntico à *C. stellatoidea*, o sorotipo B. Esse fato sugeriu haver uma relação antigênica entre *C. tropicalis* e *C. stellatoidea*. Em outro trabalho publicado por HASENCLEVER & MITCHELL (1961b) utilizando-se de ratos e de coelhos, como modelos experimentais, observaram a igual letalidade para os sorotipos A e B de *C. albicans* e uma provável menor virulência para as espécies *C. tropicalis* e *C. stellatoidea*.

No que diz respeito aos estudos sorológicos para a caracterização de leveduras do gênero *Candida*, em 1955, TSUCHIYA *et al.* realizaram a análise antigênica por aglutinação em lâmina, de sete espécies do gênero *Candida*. Foi avaliada a termoestabilidade e termolabilidade desses antígenos. Os autores observaram a ocorrência de nove classes de antígenos termoestáveis e de três classes de antígenos termolábeis, entre as sete espécies estudadas. *C. albicans* e *C. tropicalis* foram diferenciadas pelos antígenos termoestáveis.

GORDON *et al.* (1967) citam que Benham em 1935, também descobriu que células de *Torulopsis glabrata* possuíam antígenos em comum com *C. albicans*, e baseando-se nos estudos anteriores de Hasenclever & Mitchell e nos de Tsuchiya, Fukazawa & Kawakita, os quais avaliaram as relações antigênicas entre *Torulopsis glabrata* e várias espécies de *Candida*, sugeriram um protocolo para a diferenciação por imunofluorescência, de *C. albicans* (sorotipos A e B), *C. tropicalis* e *C. stellatoidea*. GORDON *et al.* (1967) enfatizam que os estudos com aglutinação, realizados por Hasenclever, indicam que *C. albicans* sorotipo A e *C. tropicalis* apresentam grande similaridade antigênica, mas que pelos estudos de Tsuchiya, Fukazawa, Miyazaki & Kawakita e pelos de Kemp & Solotorovsky, é possível fazer-se a

distinção sorológica entre ambas as espécies. Citam que, Kaplan & Kaufman e Gordon estabeleceram que é possível diferenciar *C. tropicalis* de *C. albicans* e de *C. stellatoidea*, através do uso de anticorpos fluorescentes, provavelmente pelo fato da parede celular de *C. albicans* possuir pelo menos um polissacarídeo antigênico a mais que a *C. tropicalis*, fato esse posteriormente relatado por Müller & Bürger's.

A sorologia é uma linha de investigação que foi introduzida nos laboratórios de pesquisa para auxiliar o trabalho do patologista. Através da leitura dos trabalhos publicados no início desse século, verifica-se que o desenvolvimento dessa técnica parece ter se originado da necessidade de uma ferramenta auxiliar no trabalho de identificação e caracterização de agentes patogênicos. Assim a estrutura antigênica de leveduras do gênero *Candida* tem sido objeto de numerosos estudos, que demonstram a existência de antígenos citoplasmáticos de natureza protéica, e de antígenos polissacarídeos na parede celular (HASENCLEVER & MITCHELL, 1961a; HASENCLEVER & MITCHELL, 1961c; BIGUET *et al.*, 1962; KEMP & SOLOTORVSKY, 1963; SUMMERS *et al.*, 1964).

Os estudos referentes à determinação da estrutura antigênica de espécies do gênero *Candida* têm sido efetuados principalmente com aquelas de interesse médico, dentre as quais, especialmente a *C. albicans*. A metodologia utilizada varia de acordo com a natureza química dos antígenos e com a localização dos mesmos nas células ou nos filtrados de cultura. O primeiro passo no estudo da estrutura antigênica consiste na obtenção de antígenos, levando-se em consideração a célula total, partes da mesma ou o meio em que foi cultivada. Na parede celular dos fungos existe um predomínio de constituintes antigênicos de natureza polissacarídica, que formam complexos

com proteínas. Como ocorre nos antígenos pneumocócicos, os determinantes antigênicos dos polissacarídeos da parede celular são em geral responsáveis pelo tipo-especificidade da célula fúngica. Quanto ao antígeno citoplasmático, há predomínio de constituintes de natureza protéica, dentre os quais normalmente encontram-se aqueles responsáveis pela espécie-especificidade. Proteínas e polissacarídeos são encontrados também nos filtrados de cultura, resultantes do metabolismo celular ou de constituintes desagregados da parede celular. Na obtenção de antígenos metabólicos, faz-se necessária a determinação da fase máxima de crescimento do fungo, pois, se decorrido um tempo superior a essa, a célula sofre processo de autodegradação, liberando componentes antigênicos que eventualmente podem ser diferentes daqueles normalmente eliminados (LACAZ, 1980).

Vários são os métodos empregados na extração de antígenos, podendo estar envolvidos processos físicos e químicos (FUKAZAWA *et al.* 1968a; SUZUKI & SUNAYAMA, 1968). A liberação de antígenos citoplasmáticos é feita por rompimento de célula através de diferentes métodos, tais como: sonicação, congelamento e descongelamento sucessivos ou trituração mecânica (KEMP & SOLOTOROVSKY, 1963; VENEZIA & ROBERSON, 1974; SYVERSON *et al.*, 1975). Quando o objetivo é a obtenção de antígenos metabólicos (TRAN VAN KY *et al.*, 1963; TRAN VAN KY *et al.*, 1969), o fungo é cultivado em meio líquido, o mais simples possível dentro de suas necessidades nutritivas, a fim de que componentes do meio tenham o mínimo de interferência nas determinações posteriores, não provocando reações inespecíficas, se o mesmo for utilizado nas provas sorológicas. É importante que sejam tomados cuidados especiais durante a extração de antígenos protéicos a fim de evitar a desnaturação dos mesmos, sobretudo se houver interesse em preservar suas atividades enzimáticas.

Os métodos imunológicos oferecem valiosos subsídios para propósitos analíticos, necessitando-se obter antissoros com alta especificidade para os antígenos em estudo. Dessa forma, a caracterização dos antígenos presentes em determinada espécie de *Candida*, permite estabelecer relações dessa com outras pertencentes ao mesmo gênero ou gêneros diferentes. A importância do isolamento e emprego de antígenos específicos em provas sorológicas, deve ser considerada cuidadosamente, pois vários problemas podem ser solucionados vantajosamente com uma metodologia menos trabalhosa. Em muitas situações é preferível lançar mão de antissoros monoespecíficos obtidos a partir de imunizações com um antígeno purificado, a usar antígenos de referência. Além da dificuldade na obtenção, os antígenos de maneira geral, são menos estáveis do que antissoros (LACAZ, 1980).

Na obtenção de soros hiperimunes, devem ser considerados a natureza química do imunógeno, o emprego ou não de adjuvantes, o animal a ser utilizado, bem como a via de inoculação. O termo adjuvante deriva do latim “adiuvare”, que significa auxiliar e se refere ao fato de que quando antígenos solúveis são ministrados experimentalmente, misturados a componentes bacterianos que agem como adjuvantes, a resposta mediada por células T e B é muito maior (ROITT, 1999). Quando o objetivo é a obtenção de antissoros contendo anticorpos precipitantes, os extratos antigênicos aquosos são extremamente superiores às células íntegras e a via subcutânea preferível à endovenosa (BIGUET *et al.*, 1965). É conveniente imunizar vários animais simultaneamente, devido a consideráveis individualidades biológicas dos mesmos. Os anticorpos do antissoro de coelho pertencentes a classe IgG são mais específicos contra antígenos de leveduras que os das demais classes de imunoglobulinas (FUKAZAWA *et al.*, 1968a; FUKAZAWA *et al.*, 1968b). Quando o imunógeno é dotado de baixa atividade, decorrente de sua própria

natureza, ou à alterações sofridas durante o processo de extração, o mesmo pode ser conjugado a moléculas carreadoras, aumentando assim sua atividade (CHAPENTIER & FONTANGES, 1977). Esses imunógenos de baixa atividade, (haptenos) possuem baixa massa molecular, aproximadamente menores que 1 kDa (Kilodaltons), por isso não apresentam sozinhos antigenicidade. Quando ligados frequentemente por ligações covalentes a moléculas carreadoras como proteínas, possuem capacidade de estimular a resposta imune (ROITT, 1999).

Os critérios sorológicos para classificação de leveduras parecem superiores a outras provas, tais como assimilação de carboidratos e variações morfológicas, como podemos observar pela extensa literatura disponível, o que justifica, de certa forma, os esforços científicos nessa linha de investigação. TASCHDJAN *et al.* (1972) reuniram estudos de vários pesquisadores, que mostram a possibilidade de detecção de antígenos citoplasmáticos via testes de imunoprecipitação, aglutinação e imunofluorescência indireta. Em contrapartida, a detecção positiva de precipitinas contra mananas de parede celular, parece não ser de grande importância, devido a concentração elevada no soro de indivíduos normais.

Estudos recentes conduzidos por PONTON *et al.* (1993), demonstraram que antígenos das duas fases morfológicas da *C. albicans*, o blastósporo e o tubo germinativo, são sempre observáveis nos tecidos infectados, sendo usados numa variedade de testes sorológicos para atender necessidades diagnósticas. Contudo a maioria dos testes usados na sorologia da *Candida* carece de especificidade. Antígenos expressos especificamente na superfície da parede do tubo germinativo podem ser empregados na pesquisa taxonômica das espécies, se empregados anticorpos monoclonais purificados. O uso de anticorpos conjugados com marcadores em imunoensaios de ligação

enzimática como ELISA ("Enzyme-linked Immunosorbent Assay") melhoraram consideravelmente a sensibilidade dos testes sorológicos convencionais (CLARK & ADAMS, 1977; AL MOUDALALL *et al.*, 1984; KITAJIMA, 1991), podendo ser identificadas desse modo, quantidades bastante pequenas de antígenos fúngicos, com um consumo mínimo de reagentes e antissoros, sendo de grande validade também para outros microrganismos que ocorrem em baixas concentrações, como por exemplo os vírus.

JONES *et al.* (1989) fizeram, através de anticorpos monoclonais e soros policlonais a diferenciação dos vírus: nepovírus do mosaico arábico AMV ("arabics mosaic nepovirus") e vírus do mosaico em anel - RRV ("raspberry ringspot nepovirus") que atacam cultivares de framboesa. O problema original consistia em diferenciar cepas dos vírus em cultivares de framboesa cultivadas na Inglaterra e Escócia, através de infecção natural, inoculação em plantas saudáveis e inoculação em planta-teste de *Rubus*. Através de testes sorológicos com soros policlonais e monoclonais, puderam ser feitas diferenciações entre isolados desses vírus em diferentes locais onde se cultivam diversas variedades de framboesa.

As informações acumuladas que envolvem a biologia molecular têm propiciado grandes avanços no desenvolvimento de técnicas de alta sensibilidade na identificação e caracterização de microrganismos, particularmente fungos filamentosos e leveduras (HALL *et al.*, 1969, LENNETE *et al.*, 1987; VANCANNEYT *et al.*, 1991).

Vários pesquisadores (HALL, 1969; SHECHTER, 1973; VANCANNEYT *et al.*, 1991) têm utilizado a análise das proteínas, na taxonomia dos fungos, tendo-se em vista que cada enzima é codificada por uma sequência de nucleotídeos controlados por um gene. Ao se comparar a

estrutura de uma enzima, estamos comparando indiretamente, a própria estrutura do material genético que está sendo expresso, avaliando-se dessa forma as relações fenético-taxonômicas dos grupos. As proteínas podem ser analisadas por diversos métodos, incluindo dentre eles a determinação de sua estrutura primária (composição e seqüência dos aminoácidos e os padrões digitais dos peptídeos), pela eletroforese, pela cromatografia e por outras técnicas baseadas em suas propriedades físicas, imunológicas ou catalíticas. Dentre as técnicas que se utilizam de suas propriedades físicas, a que vem sendo mais utilizada é a eletroforese em suporte de gel. Extratos brutos são fracionados eletroforicamente no gel, que é depois corado para detectar os sítios de localização das proteínas.

No que concerne as leveduras, LENNETE *et al.* (1987) ressaltam que a composição química de suas paredes celulares tem sido estudada, demonstrando muito bem que nas bactérias e em certos fungos, as diferenças nessa composição, especialmente de aminoácidos e de carboidratos, trazem importantes auxílios para sua taxonomia. A parede celular da maior parte das leveduras é constituída de mananas, quitina e glucana, sendo que todas as espécies do gênero *Candida*, apresentam esses três componentes. HALL *et al.* (1969) desenvolveram estudos taxonômicos empregando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, para a identificação de proteínas de fungos do gênero *Phytophthora*, conseguindo encontrar diferenças entre as bandas protéicas de espécies diferentes. Vários outros autores descobriram que os padrões de proteínas, variam menos nas espécies que entre diferentes espécies, de tal forma que passam a produzir ao menos uma banda protéica característica e reconhecida para cada espécie em particular.

Alguns autores têm alertado para a necessidade do desenvolvimento e padronização de todas as etapas da eletroforese de proteínas totais em géis de

poliacrilamida, visando o incremento da resolução, sensibilidade, reprodutibilidade e redução de custos dessa técnica (AMES, 1974; BRUNEAU & GUINET, 1989; GOMES, 1995; HÖFLING *et al.*, 1996; ROCHELLE, 1996; ROSA *et al.*, 1997). Além disso, GLYNN & REID (1969) e SHECHTER (1973) já haviam demonstrado, que diferentes composições nutricionais dos meios de cultivo, variações na temperatura de incubação e a idade das culturas, podem influir diretamente na síntese de proteínas, o que gera uma inconstância nos perfis eletroforéticos. Concomitantemente, GOMES (1995) aponta para o fato de colorações a base de prata serem mais sensíveis que outras colorações, aumentando a quantidade de bandas e a possibilidade de observação de polimorfismo entre as amostras submetidas à eletroforese de proteínas totais. Em adição, VANCANNEYT *et al.* (1991) relataram que para a obtenção de um padrão de bandejamento bem definido e reprodutível, faz-se necessária a extração das proteínas quando as células encontram-se em fase de crescimento logarítimo, pois células em fase estacionária de crescimento, fornecem perfis protéicos mais difusos, com degradação de proteína de maiores massas moleculares e um acúmulo de proteínas degradadas e peptídios na região de menores massas moleculares, no eletroforegrama.

Variações da técnica original de eletroforese de proteínas totais, permitiram o estudo das variabilidades intra e interespecífica de isolados de leveduras do gênero *Candida*. LEE *et al.* (1986) propuseram um sistema de caracterização de isolados de *C. albicans* baseado na separação eletroforética das proteínas totais, seguida da transferência para uma membrana de nitrocelulose onde as proteínas foram reveladas através da combinação com conjugados de imunoglobulinas policlonais-fosfatase alcalina, que fornecem complexos corados ("Western blot"). Os autores observaram a ocorrência de

16 sorotipos distintos dentre 190 isolados. Esses mesmos isolados foram submetidos à técnica de aglutinação desenvolvida por HASENCLEVER & MITCHELL (1961a) e produziram apenas 2 grupos de sorotipos, demonstrando de tal forma, a maior capacidade do procedimento eletroforético na diferenciação de isolados de uma mesma espécie. Um segundo experimento foi conduzido com a separação das proteínas dos isolados por SDS-PAGE e posterior coloração com Coomassie blue. Os resultados foram idênticos aos do primeiro experimento, com a obtenção de 16 perfis eletroforéticos diferentes.

Estudos conduzidos por PONTON & JONES (1986) envolveram o emprego da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e "Western-blot" para pesquisar a presença de glicoproteínas de parede características das fases leveduriformes e micelial de *C. albicans* sorotipo A. Uma glicoproteína de alta massa molecular (235.000 Da) e outra de 19.000 Da, foram observadas no extratos de células colhidas na fase micelial mas não foram identificadas em extratos de células leveduriformes, demonstrando assim existirem diferenças químico-estruturais entre as células nos dois momentos do dimorfismo. CASANOVA & CHAFIN (1991), trabalhando com a técnica de "Western blot" para glicoproteínas extraídas de paredes de células íntegras e rompidas, também concluíram que a composição da parede celular dessas leveduras é determinante na interação fungo-epitélio.

Visando uma aplicação da eletroforese no entendimento da biodiversidade do meio intrabucal, MAIDEN & TANNER (1991), trabalhando com amostras de leveduras isoladas da cavidade bucal, utilizaram-se da eletroforese em gel de poliacrilamida, seguida da coloração por prata para suas identificações. Obtiveram padrões de bandas protéicas cujas massas moleculares variaram entre 29kDa e 116 kDa, suficientes para a análise

diferencial entre as leveduras. Esses autores ressaltaram a alta especificidade da técnica, somada à rápida obtenção de um grande número de dados com significância classificatória.

Em uma publicação de VANCANNEYT *et al.* (1991), foi proposta a utilização de eletroforese de proteínas totais de diversos gêneros e espécies de leveduras de importância médica e industrial, com a finalidade de promover a diferenciação e caracterização das mesmas. Esses autores ressaltam a importância da inclusão de linhagens-tipo (“type-strain”), com a finalidade de caracterizar os grupos formados, no momento da construção de fenogramas de similaridade. Estabeleceram critérios de reprodutibilidade para a avaliação do padrão de bandas conduzido em diferentes géis, e concluíram que, eletroforese de proteínas totais em SDS-PAGE em sistema descontínuo (LAEMMLI, 1970) pode ser uma ferramenta útil e conveniente na taxonomia de leveduras e pode ser empregada como procedimento de rotina na identificação de isolados, uma vez que se tenha uma base de dados de eletroforegramas-referência.

MACDONELL & COLWELL (1985) discorrendo sobre o emprego da taxonomia numérica na sistemática microbiana, descreveram que foi na virada do século que os métodos quantitativos começaram a ser aplicados na taxonomia. Os autores citam as publicações de Sneath e Michener & Sokal como sendo as pioneiras no emprego desse novo recurso. Porém o uso da análise numérica só se tornou mais utilizada com o surgimento do computador, que contribuiu reduzindo o tempo da análise, a possibilidade de redução dos erros nos cálculos e ampliando a análise de um grande número de amostras simultaneamente.

A análise de grupos formados a partir das combinações entre linhagens através de coeficientes de similaridade, tem sido empregada na eletroforese

associada ao processamento das informações via computador, com resultados satisfatórios em estudos de sistemática de bactérias (TANNER, 1986; COSTAS *et al.*, 1987), de fungos filamentosos (JONES & NOBLE, 1982) e de leveduras (SHECHTER *et al.*, 1972; VANCANNEYT *et al.*, 1991; VANCANNEYT *et al.*, 1992; GOMES, 1995; ROCHELLE, 1996; ROSA, 1997).

Em um grande número de casos, é agora sabido que eletroforegramas unidimensionais de proteínas celulares totais discriminam, tanto, quanto, as informações derivadas de dados de hibridação DNA-DNA (KERSTERS & DE LEY, 1975; CATO *et al.*, 1982 e KERSTERS, 1985). Linhagens bacterianas com 90-100% de seqüências homólogas de DNA, geralmente apresentam padrões protéicos quase idênticos e linhagens com pelo menos 70% de homologia de bases de DNA tendem a ter perfis protéicos similares. Essas observações são, de acordo com KERSTERS (1985), os maiores pilares nos quais a aplicação da eletroforese de proteínas em sistemática microbiana está embasada. A comparação dos padrões eletroforéticos é uma técnica com resolução taxonômica satisfatória, que é aplicável ao nível de espécies, subespécies ou biotipos.

Num estudo sobre métodos empregados para caracterização de leveduras, GOMES (1995) descreve que metodologias como SDS-PAGE e a técnica de análise genética baseada em marcadores RAPD (polimorfismo do DNA amplificado ao acaso), são as que fornecem resultados mais refinados, quando se avalia linhagens com pouca diversidade. Além disso, conclui que é necessário sempre a utilização de mais de um método, a fim de se comparar os resultados e compensar as limitações de um com o outro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

No presente trabalho, foram empregadas treze linhagens de leveduras do gênero *Candida* pertencentes à micoteca da disciplina de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP isoladas da cavidade bucal de pacientes clinicamente saudáveis. As linhagens-tipo de *Candida* spp. foram obtidas junto à Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, na cidade de Campinas-SP e a linhagem de *Kluyveromyces marxianus* IZ-1339, cedida pelo Prof. Dr. Flávio Cesar Almeida Tavares do Laboratório de Genética de Leveduras da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), conforme a (TAB.1).

TABELA 1: Relação das espécies de *Candida* sp. isoladas da cavidade bucal de humanos, linhagens-tipo e a referência extra-genérica empregadas nos experimentos.

AMOSTRAS	CÓDIGO DE ORIGEM
<i>C. albicans</i>	CBS-562
<i>C. albicans</i>	97-a
<i>C. albicans</i>	F-72
<i>C. albicans</i>	E-37
<i>C. albicans</i>	17-b
<i>C. guilliermondii</i>	CBS-566
<i>C. guilliermondii</i>	FCF-405
<i>C. guilliermondii</i>	FCF-152
<i>C. parapsilosis</i>	CBS-604
<i>C. parapsilosis</i>	21-c
<i>C. parapsilosis</i>	7-a
<i>C. krusei</i>	CBS-573
<i>C. krusei</i>	1M-90
<i>C. krusei</i>	4-c
<i>C. tropicalis</i>	CBS-94
<i>C. tropicalis</i>	1-b
<i>C. tropicalis</i>	FCF-430
<i>C. tropicalis</i>	Ct-4
<i>K. marxianus</i>	IZ-1339

3.2. Manutenção das cepas

As linhagens foram mantidas durante toda a execução dos experimentos em duas coleções:

3.2.1. Na primeira, as amostras foram semeadas em meio completo para levedura (M.C.L.), como estabelecido por NEDER (1992), contendo peptona e extrato de levedura, em tubos de rosca (13x100 mm) e levadas à estufa a 37° C durante 24-72 horas para o desenvolvimento celular. Após o crescimento, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente durante 30 dias, quando a coleção foi então renovada.

3.2.2. Na outra coleção as amostras foram mantidas em tubos de rosca (13x100 mm) contendo meio M.C.L., e recobertas com óleo mineral estéril, à temperatura ambiente. Esta coleção foi renovada a cada 6 meses.

3.3. Extração celular e obtenção de antígenos

3.3.1. Extração celular

Amostras de cultura mantidas segundo descrição do item 3.2.1, foram inoculadas em frascos com 400 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%, bacto-peptona 2% e glicose 2%) (CASANOVA & CHAFFIN, 1991; ASAKURA *et al.*, 1991) e mantidos sob agitação constante em Incubadora “Shaker” (Nova Técnica Instrumentos e Equipamentos de Laboratório Ltda) a 37° C e 150 rpm, por 18 horas. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 3000 g, por 5 minutos (Centrífuga 215 – Fanen Ind. e Com.), de acordo com WALTERS & BLOBEL (1986). Para remoção de restos de meio de cultivo e possíveis metabólitos extracelulares, os sedimentos foram lavados três vezes com salina estéril gelada (AXELSEN, 1973). A cada

centrifugação foi descartado o sobrenadante, e após a última centrifugação, 5g do sedimento (SD) foi removido (FIG. 1).

3.3.2. Obtenção dos antígenos

Células de leveduras (5g) foram transferidas para um almofariz, adicionando-se, a seguir, pequenos volumes de nitrogênio líquido (GOMES, 1995). Após a completa evaporação do nitrogênio, o material resultante foi macerado com pistilo por aproximadamente 3 minutos, e os lisados acrescidos de 5 mL de salina estéril gelada. Aliquotas dos lisados foram submetidas a três diferentes tempos de centrifugações, 5, 10 e 60 minutos, coletando-se os sobrenadantes. As centrifugações foram feitas a 105.000g e 4⁰ C em ultracentrifuga (Beckman L8-60M, com rotor SW 41.Ti.). Como resultado deste procedimento, ocorre a formação de um sobrenadante claro no tubo entre duas zonas turvas e um sedimento. Essas duas camadas foram evitadas na pipetagem do fluido claro (AXELSEN, 1973). Todos os sobrenadantes foram filtrados em membranas Millex de 0,22 μ m (Millipore) para garantir a esterilização (BURNIE *et al.*, 1985; GUINET *et al.*, 1979) e foram armazenados a -75 ⁰C em tubos de 1,5 mL para serem utilizados posteriormente nos ensaios de ELISA e SDS-PAGE. As aliquotas das linhagens CBS-562 e 97-a submetidas a 60 minutos de centrifugação (AXELSEN, 1973) foram utilizadas também como antígenos na imunização de coelhos (FIG. 1). A concentração protéica das amostras foi determinada pelo método de BRADFORD (1978).

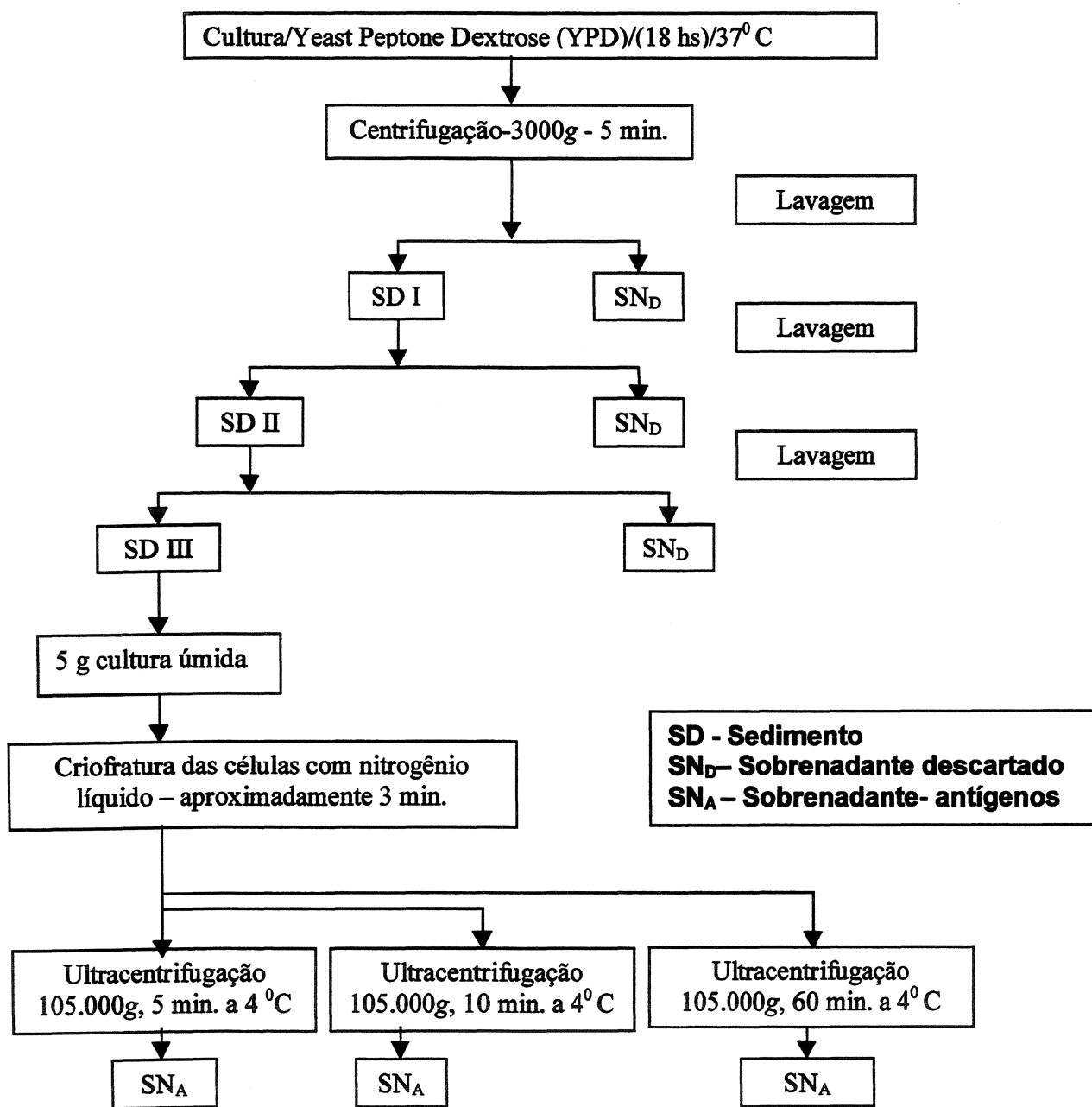


FIGURA 1: Método de extração e obtenção de antígenos.

3.4. Método de identificação por meio de cultivo cromogênico

O meio de cultura cromogênico CHROMagar Candida[®] (Probac do Brasil) é um método de identificação presuntiva destinado ao isolamento e diferenciação de algumas espécies de *Candida* sp. Em uma placa de meio de cultura cromogênico foram estriados, os isolados de cavidade bucal de *Candida*, as linhagens-tipo e *k. marxianus* descritas na TAB. 1. A placa foi mantida a 37 °C e após 48 horas, foi observada a coloração e morfologia das colônias conforme a TAB. 2 (ODDS & BERNAERTS, 1994; BEIGHTON *et al.*, 1995; BAUMGARTNER *et al.*, 1996; PFALLER *et al.*, 1996; GIUSIANO & MANGIATERRA, 1998).

TABELA 2: Relação das espécies, coloração e morfologia da cultura obtida no teste de crescimento em meio de cultivo cromogênico (CHROMagar Candida[®]).

Espécie	Coloração da colônia	Morfologia da colônia
<i>Candida albicans</i>	Verde Claro	Lisa
<i>Candida parapsilosis</i>	Branco, Creme ou Rosa	Lisa
<i>Candida tropicalis</i>	Azul Acinzentado	Lisa
<i>Candida krusei</i>	Rosa	Rugosa
<i>Candida guilliermondii</i>	Púrpura, Rosa claro	Lisa
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	*	*

*Dado não disponível na literatura

3.5. Sorologia

3.5.1. Produção de anticorpos policlonais

3.5.1.1. Método de imunização com *C. albicans*, linhagem-tipo CBS-562 e para a linhagem isolada de cavidade bucal, 97-a

Foram utilizados, para a produção de anticorpos policlonais, dois coelhos fêmeas da raça Nova Zelândia, pesando em média 2,8 Kg com 2 meses de idade, que receberam as designações A₂ e A₃. Injeções intramusculares de 0,5 mg/mL de antígenos da linhagem-tipo CBS-562 emulsionados com adjuvante de Freund incompleto estéril (25% lanolina + 75% nujol) foram aplicadas na região próxima aos linfonodos dos membros posteriores (OLIVEIRA, 1975), e repetidas a intervalos de 15 dias. Outros dois coelhos, designados A₁ e A₄, foram imunizados com antígenos da linhagem *C. albicans* 97-a, repetindo-se o mesmo esquema de imunização anterior (TAB. 3).

Os antissoros produzidos foram codificados com as letras maiúsculas AS seguido de um hífen, o número do animal imunizado e entre parênteses o dia da coleta do antissoro.

3.5.1.2. Sangria e conservação dos soros

Antes de se iniciar o calendário de imunização para obtenção de antissoros contra antígenos da linhagem-tipo de *C. albicans* CBS-562 e da linhagem *C. albicans* 97-a; foi feito um pequeno corte longitudinal na veia marginal da orelha dos coelhos e recolhido o sangue (10 a 20 mL) em frascos de vidro (BURNIE *et al.*, 1985), separando-se o soro que foi usado como controle negativo nas reações sorológicas. Após a primeira imunização, foram

feitas sangrias a intervalos semanais obtendo-se o antissoro (AS), os quais foram posteriormente utilizados nas reações sorológicas. O sangue coletado permaneceu por uma ou duas horas a temperatura ambiente, e o soro foi obtido após centrifugação a 4000 g durante 5 minutos. Estes foram então aliquotados e conservados em freezer a -75°C .

TABELA 3: Esquema de imunização usado na produção de anticorpos policlonais.

Coelho	Dia da 1 ^a injeção	Dia da 2 ^a injeção	Dia da 3 ^a injeção	Dose*	Linhagem
A ₁	15-04-98	30-04-98	15-05-98	0.5	97-a
A ₂	15-04-98	30-04-98	15-05-98	0.5	CBS-562
A ₃	15-04-98	30-04-98	15-05-98	0.5	CBS-562
A ₄	15-04-98	30-04-98	15-05-98	0.5	97-a

*Dose = mg/mL/ membro posterior

3.5.2. Determinação do título dos antissoros

Os títulos de anticorpos produzidos pelos coelhos imunizados com antígenos de *C. albicans* foram mensurados através de testes de dupla difusão em gel de ágar a 1% (OUCHTERLONY, 1949; OUCHTERLONY, 1962) e através do ensaio imunoenzimático (ELISA) (CROWTHER, 1995).

3.5.2.1. Dupla difusão em ágar

Os testes de dupla difusão foram feitos em gel de agarose 1% com tampão PBS 0,001 M pH 7,0 (HÖFLING, 1975), sobre lâminas de

microscópio. Os anticorpos obtidos foram diluídos seguindo-se uma progressão geométrica de razão 2, a partir de uma diluição 1:2 em tampão fosfato, e colocados em orifícios no gel dispostos ao redor de um orifício central contendo o antígeno. Os orifícios foram preenchidos com 10 µL da suspensão de anticorpos ou de antígeno. A diluição máxima na qual ainda foi visível a linha de precipitação, foi considerada como o título dos anticorpos obtidos (HARAKAVA, 1993).

3.5.2.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Placas de poliestireno de 96 orifícios foram sensibilizadas com os antígenos de *C. albicans* CBS-562 e 97-a, colocando-se 50µL por poço, e incubando por 1 hora a 37°C.

Após a sensibilização, os sítios ativos remanescentes no plástico foram bloqueados com 200µL de tampão Bloqueio (APÊNDICE 3.2) por poço, por mais uma hora a 37°C. Em seguida, as placas foram vertidas descartando-se o líquido em excesso, e as diluições dos soros de coelho anti-*C. albicans* (a serem testados) foram adicionadas às placas, em duplicata, e incubados por uma hora a 37°C. Os orifícios foram então lavados com 200µL de PBS-T-G (APÊNDICE 3.3) por 3 vezes. e secados com papel absorvente até que o excesso de líquido fosse eliminado. A seguir, fez-se a incubação (uma hora a 37°C) com conjugado anti-IgG de coelho-peroxidase (Pierce, Lote nº 931207162) diluído 1:500 (conforme instruções do fabricante). Após mais 3 lavagens com PBS-T-G, a reação foi revelada com orto-fenilenodiamina (OPD) e H₂O₂, diluído em tampão de OPD (APÊNDICE 3.4) no escuro por 2 a 3 minutos, quando foi bloqueada com solução “STOPPER” para OPD

(APÊNDICE 3.5), procedendo-se a leitura em leitor de microplaca (Bio-Rad Model 550) a 492 nm.

3.5.3. Análise dos antígenos em reação aos anticorpos policlonais produzidos

Ensaio imunoenzimático (ELISA) realizados conforme o item anterior, foram analisados, utilizando-se os extratos protéicos descrito no item 3.3.2 em reação aos antissoros produzidos.

3.5.4. Purificação de soro de coelho anti-*C. albicans* em Proteína A

Os soros dos coelhos foram purificados em uma coluna de sefarose-proteína A (Affi-gel protein A agarose, Bio-Rad, cat. n° 153-6153) segundo OI & HERZENBERG, (1980). A coluna, preparada com 5 cm, foi lavada com 100mL de solução de Tris-HCl 1M pH 9.0 (APÊNDICE 3.6) e pulsionada por bomba peristáltica. O soro foi preparado, antes de passar pela coluna, adicionando-se para cada 1,5 mL de soro, 4 mL da solução de Tris-NaCl 0,2M pH 8.2 (APÊNDICE 3.7) e filtrado em membrana 0,22µm.

Em sistema fechado 5,5 mL da solução contendo o soro, foram passados pela coluna por duas horas, com auxílio de bomba peristáltica. Após esse período, a coluna foi lavada com 100 mL de tampão Tris-NaCl 0,2 M pH 8.2 para a remoção das impurezas contidas no soro, ficando retidas na coluna apenas imunoglobulinas do tipo IgG. A coluna foi eluída com tampão Glicina-NaCl 0,2M pH 3,0 (APÊNDICE 3.8). O eluato foi recolhido em alíquotas de 2 mL em 10 tubos contendo 50 µL do tampão Tris-HCl. Um tubo controle

recebeu 50 μL do tampão Tris-HCl 1M pH 9.0 acrescido de 2 mL de tampão Glicina-NaCl 0,2M.

De cada tubo, foi retirada uma alíquota de 20 μL para realização do teste de quantificação protéica (BRADFORD, 1978). Os tubos correspondentes às amostras dos orifícios que adquiriram coloração azul, foram separados e submetidos a uma diálise em membrana de celulose, em 1 litro de tampão PBS pH 7,3, por uma noite a 5°C sob agitação. Após este período, a solução de PBS foi trocada e a diálise seguiu-se por mais 3 horas. As amostras foram então recolhidas em tubos estéreis e lidas em espectrofotômetro a 280 nm, onde a relação D.O./mg de IgG utilizada foi de 1,3:1. As amostras foram separadas em alíquotas (1 mg/mL de IgG do soro) e armazenadas a -20 °C.

3.5.5. Ensaio imunoenzimático quantitativo

Neste ensaio, os anticorpos purificados conforme o item 3.5.4, foram utilizados em concentrações pré-estabelecidas de 1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ em reação com os antígenos centrifugados a 105.000g por 60 minutos obtidos conforme o item 3.3.2. O soro bruto diluído a 1:200, foi utilizado nessa reação para ser comparando com o soro purificado.

3.6. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Extratos protéicos obtidos conforme o item 3.3.2 em diferentes tempos de centrifugação, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.6.1. Preparo das amostras

À 500 μL dos sobrenadantes protéicos obtidos a partir das culturas de leveduras, conforme descrito no item 3.3.2, adicionou-se a mesma proporção de tampão de amostra (ALFENAS *et al.*, 1991). Em seguida, as misturas foram fervidas por 10 minutos. Essas, foram ajustadas à concentração protéica de 800 $\mu\text{g/mL}$ (AMES, 1974) e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.6.2. Eletroforese

As amostras foram submetidas à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em sistema tampão descontínuo, de acordo com LAEMMLI (1970), em cuba de acrílico descrita por STUDIER (1973), de dimensões 180 x 160 mm, com placas de vidro de 165mm x 145 mm e espaçadores de 1 mm de espessura. Utilizaram-se dois tipos de géis adaptados por LAEMMLI (1970), o gel empilhador 4% e o gel separador a 12%.

Foram transferidos 20 μL das amostras para as canaletas do gel empilhador e cobertas com tampão de corrida, o qual também foi adicionado nos recipientes superior e inferior da cuba. A primeira canaleta ficou sempre reservada para a adição de 10 μL do padrão de massa molecular (Pharmacia-LMW – COD. 17-0446-01). Estabeleceu-se inicialmente uma corrida a 80 volts e 40 mA para o gel empilhador durante 20 minutos, elevando-se posteriormente a voltagem a 120volts e 60 mA para o gel separador, que foi mantida até o término da corrida eletroforética. Essas proporções foram previamente definidas para dois géis de 1 mm.

3.6.3. Método de coloração por prata

O método utilizado de coloração por prata foi realizado segundo DION & PONENTI (1983) e GOTTLIEB & CHAVKO (1987).

Após a corrida eletroforética o gel foi transferido para uma solução fixadora (APÊNDICE 7.1) permanecendo “overnight”. Após esse período a solução foi descartada e o gel foi lavado em água deionizada e logo em seguida uma solução incubadora (APÊNDICE 7.2) foi adicionada por 20 minutos; 3 lavagens sucessivas de 15 minutos foram efetuadas em água deionizada antes da coloração. Adicionou-se ao gel a solução de prata (APÊNDICE 7.3) por 20 minutos, e novamente o gel foi lavado. Uma solução reveladora (APÊNDICE 7.4) foi adicionada e o gel foi mantido em movimento constante até o aparecimento das bandas protéicas. Para bloquear o processo de coloração do gel, a solução reveladora foi descartada e substituída pela solução “stop” (APÊNDICE 7.5) por 10 minutos, sendo posteriormente descorado por lavagem em água corrente por 1 hora. O gel foi então guardado em solução de glicerol a 10%.

3.7. Análise numérica dos perfis eletroforéticos das proteínas

Os dados obtidos dos perfis eletroforéticos das amostras submetidas a 105.000g por 60 minutos conforme o item 3.6, foram utilizados para a análise numérica.

Para tanto, os géis foram interpostos entre duas folhas de filme para transparência, e a imagem foi capturada em um “twin-scanner”(Scan Jet 4C e adaptador para transparência HP 4C. Hewlett Packard Co.) onde suas imagens positivas foram processadas através do software Kodak Digital Science 1D™

originando os valores das massas moleculares das bandas protéicas de cada amostra em relação a linha distal de migração do corante azul de bromofenol presente no tampão de amostra.

As bandas protéicas, representadas pelos valores de massas moleculares tiveram suas distâncias de migração convertidas em valores numéricos que receberam representações 1 (um) e 0 (zero), para a presença e ausência das bandas respectivamente, numa comparação entre os perfis eletroforéticos. O conjunto dessas informações gerou uma matriz de dados binários que foi plotada no sistema NTSYS-pc versão 1.70 (Applied Biostatistics, 1992), empregando-se o programa QUALITATIVE e o coeficiente de similaridade SM (Simple Matching Coefficient), que gerou uma matriz de similaridade entre as amostras.

Através do mesmo sistema computacional, a matriz de similaridade foi transferida para o programa SAHN-Clustering (desempenho seqüencial e aglomeração hierárquica de grupos), e pelo método de agrupamento UPGMA (FARRIS, 1969; SNEATH & JOHNSON, 1972; SNEATH & SOKAL, 1973), obteve-se um dendrograma que possibilita a avaliação dos graus de similaridade fenética existente entre as amostras utilizadas neste experimento.

4. RESULTADOS

4.1. Teste cromogênico (CHROMagar Candida®)

As linhagens das espécies, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *K. marxianus* descritas no TAB. 1 foram inoculadas em meio CHROMagar Candida® e os resultados foram avaliados. Os dados obtidos neste teste, mostraram a formação de cinco grupos de microrganismos com relação a coloração e morfologia das colônias, entre as 19 linhagens empregadas como mostra a TAB. 4. Dentre estes, três grupos mostraram colônias com colorações e morfologia específicas para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

TABELA 4 – Relação das amostras de leveduras submetidas à identificação presuntiva em meio cromogênico.

Grupo	Código de Origem	Coloração	Morfologia
I	CBS-562, 97-a, F-72, E-37, FCF-405, FCF-152 e 1-b	Verde Claro	Lisa
II	CBS-94, FCF-430 e Ct-4	Azul Acinzentado	Lisa
III	CBS-566, 1M-90 e IZ-1339	Rosa Claro	Lisa
IV	CBS-573	Rosa Claro	Rugosa
V	CBS-604, 21-c, 7-a, 4-c e 17-b	Crema	Lisa

4.2. Determinação da concentração protéica dos antígenos

Os valores de concentrações protéicas obtidas pelos diferentes tempos de centrifugações foram determinadas através do método de BRADFORD (1978) em microplaca de 96 orifícios a 540 nm, e estão relacionados na TAB. 5. Estes valores foram utilizados para o cálculo da concentração dos antígenos CBS-562 e 97-a destinados à imunização dos coelhos.

TABELA 5: Concentração protéica em mg/mL dos extratos das amostras, submetidas a 5, 10 e 60 minutos a 105.000 g.

Código de Origem	Concentrações protéicas em mg/mL		
	5 minutos	10 minutos	60 minutos
CBS-562	5,75	2,71	2,2
97-a	4,30	2,95	1,57
F-72	6,22	4,39	3,32
E-37	3,56	2,39	2,14
17-b	4,28	3,20	1,73
CBS-566	4,58	2,82	2,59
FCF-405	6,90	6,04	4,75
FCF-152	4,75	4,23	3,56
CBS-604	5,36	4,48	3,16
21-c	3,49	2,35	1,48
7-a	4,79	2,42	2,09
CBS-573	9,13	5,15	3,23
1M-90	7,73	5,12	4,05
4-c	4,75	2,75	0,98
CBS-94	4,47	3,33	1,74
1-b	2,17	1,36	0,82
FCF-430	5,87	4,73	2,21
Ct-4	4,28	4,01	1,7
IZ-1339	6,22	6,03	5,56

4.3. Imunização

Os antíssoros produzidos nos animais A₂ e A₃ contra a linhagem CBS-562 e nos animais A₁ e A₄ contra a linhagem 97-a, obtidos durante o período de imunização (49 dias), foram testados contra ambos antígenos, através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para verificar a produção de anticorpos.

No 14^o dia de imunização, observou-se uma resposta positiva nos animais injetados com os antígenos de *C. albicans*. A partir do 35^o dia, os coelhos A₁ e A₂ apresentaram um decréscimo na produção de anticorpos enquanto que os animais A₃ e A₄ ainda apresentaram um aumento na resposta, como está expresso nas (FIG. 2 e 3).

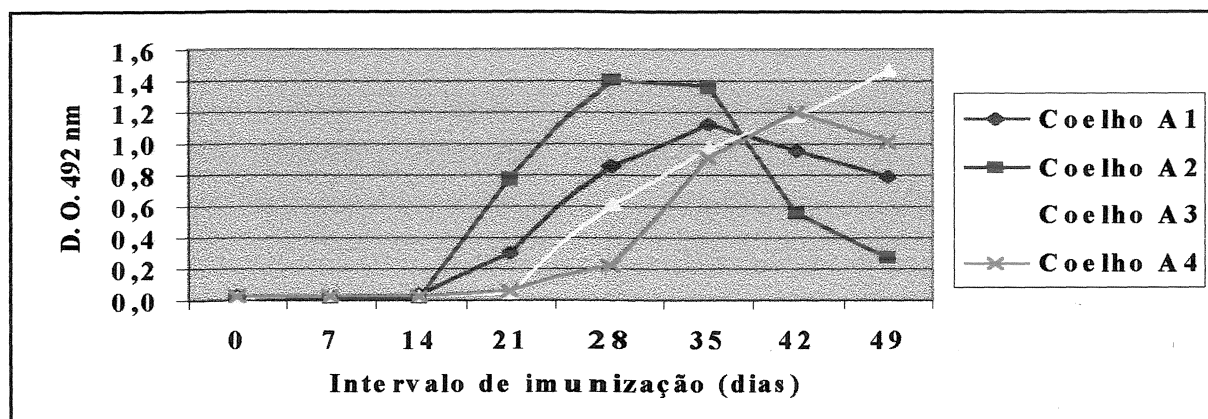


FIGURA 2: Teste imunoenzimático (ELISA) com anticorpos policlonais em reação com antígenos de *C. albicans* (CBS-562).

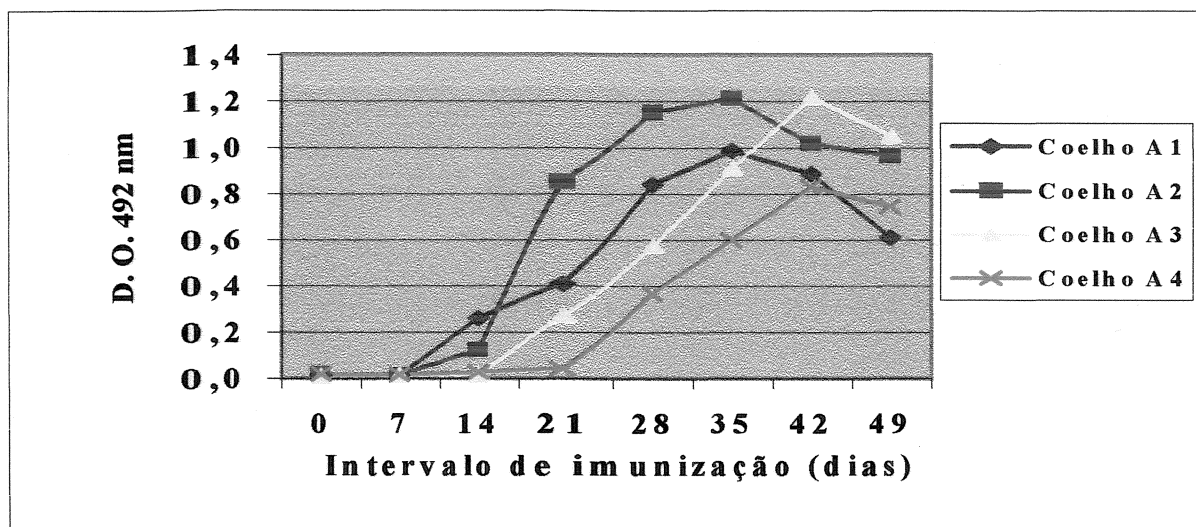


FIGURA 3: Teste imunoenzimático (ELISA) com anticorpos policlonais em reação com antígenos de *C. albicans* (97-a).

4.4. Otimização do teste imunoenzimático (ELISA)

Na otimização dos ensaios por ELISA, foram padronizadas as diluições ideais dos antígenos, dos antissoros produzidos e selecionado o melhor animal imunizado para cada antígeno.

4.4.1. Escolha dos animais

Os soros obtidos dos animais imunizados com as linhagens CBS-562 e 97-a, respectivamente: (A₃ e A₄), foram selecionados para os testes imunoenzimáticos posteriores por apresentarem melhor título de anticorpos.

4.4.2. Diluição dos antissoros

A melhor diluição do antissoro para reagir com antígenos citoplasmáticos das leveduras, foi estabelecida em 1:200, após realização de vários testes (ELISA) partindo de 1:100 a 1:800 da diluição do antissoro. Os soros escolhidos para as reações subseqüentes, foram os coletados no 42^o dia de imunização por apresentar altos títulos.

4.4.3. Diluição do antígeno

Para estabelecer a concentração ideal dos antígenos citoplasmáticos usados nos testes sorológicos, foram testadas as linhagens CBS-562 e 97-a (ambas utilizadas para imunização); CBS-573, que apresentou a maior concentração protéica e IZ-1339, como controle negativo.

A FIG. 4 expressa os resultados obtidos nos testes de padronização na diluição dos antígenos em reação com o antissoro AS-3(42) produzido pela inoculação com as linhagens de *C. albicans*. A melhor diluição do antígeno obtida foi de 1:100, não apresentando diferença significativa em relação às amostras menos diluídas.

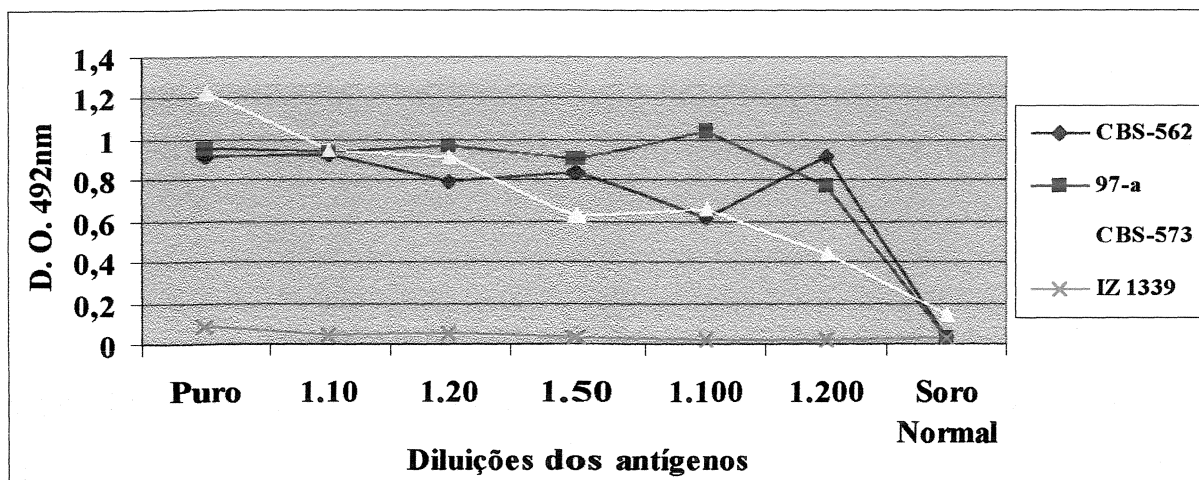


FIGURA 4: Teste imunoenzimático (ELISA) com anticorpos policlonais AS-3(42) em reação com antígenos diluídos CBS-562, 97-a, CBS-573 e IZ-1339.

4.5. Dupla difusão em ágar

Os testes de dupla difusão em ágar 1%, foram menos efetivos para mostrar os títulos de imunizações dos coelhos nesse experimento e, portanto, foram desconsiderados.

4.6. Testes sorológicos (ELISA) com antígenos obtidos em diferentes tempos de centrifugações

Antígenos das 19 linhagens citadas no TAB. 1, obtidos em diferentes tempos de centrifugações, foram testados em reação aos antissoros coletados no 42^o dia de imunização dos animais A₃ e A₄, denominados AS-3(42) e AS-4(42), respectivamente.

Os resultados obtidos encontram-se nas (FIG. 5 e 6).

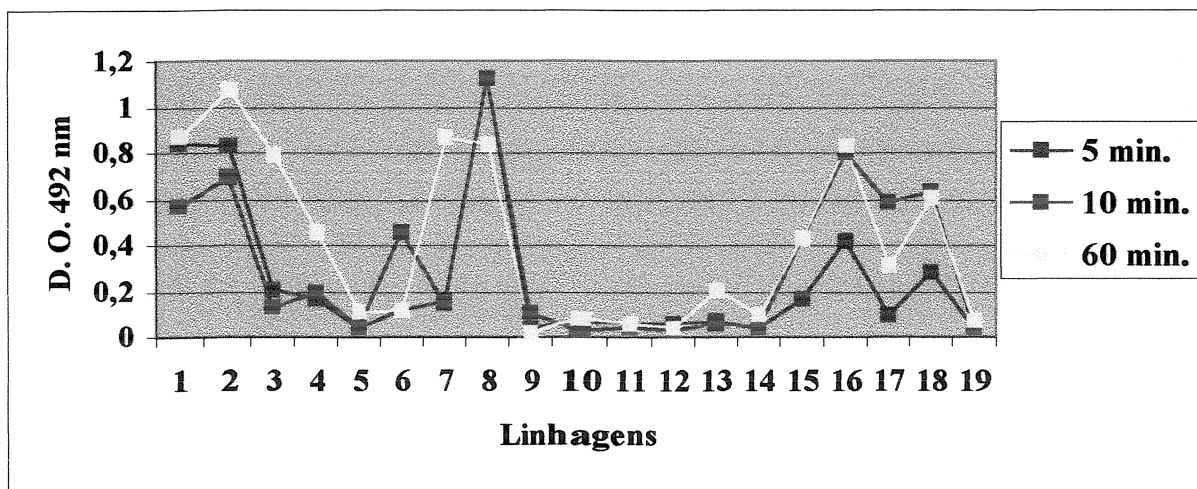


FIGURA 5: Teste imunoenzimático (ELISA) com antissoro AS-3 (42) em reação com antígenos de *Candida* (1 a 18) e *K. marxianus* (19) obtidos em diferentes tempos de centrifugação.

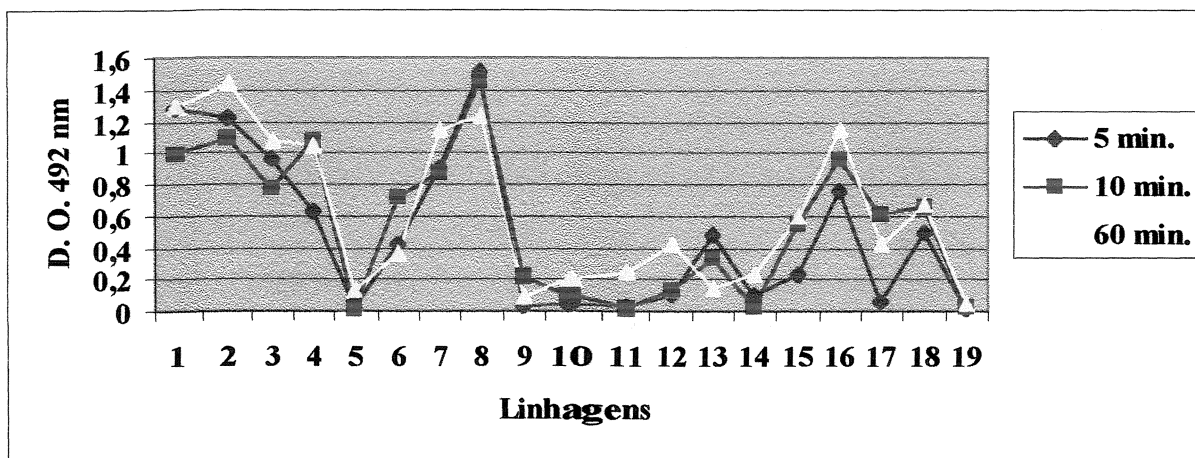


FIGURA 6: Teste imunoenzimático (ELISA) com antissoro AS-4(42) em reação com antígenos de *Candida* (1 a 18) e *K. marxianus* (19), obtidos em diferentes tempos de centrifugação.

4.7. Purificação das IgG

A purificação de IgG em coluna de Sefarose-proteína A usando-se 1,5 mL de soro bruto dos animais A₃ e A₄, deu origem aos resultados descritos na TAB. 6.

TABELA 6: Dosagem de IgG purificada em coluna de Sefarose-proteína A.

Animal	D. O. a 280 nm	mg IgG/mL*
A ₃	1.9231	1,48
A ₄	2,1560	1,66

* mg de IgG/mL segue a equação: 1,3 D. O. = 1 mg/mL de IgG.

4.8. Testes imunoquantitativos

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram feitos com soro purificado anti-*C. albicans* em reação com antígenos relacionados no TAB. 1. A FIG. 7, expressa os resultados obtidos com antissoro purificado do animal A₃ e a FIG. 8 expressa os resultados obtidos em reação ao antissoro purificado do animal A₄. As IgGs purificadas foram testadas nas concentrações de 1 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL, comparando-se com o soro bruto (diluído 1:200), onde foi constatado que 10 µg/mL seria a quantidade ideal de IgG que reage com os antígenos. Menores concentrações como 1µg e 5µg/mL não mostraram um nível de reação considerável.

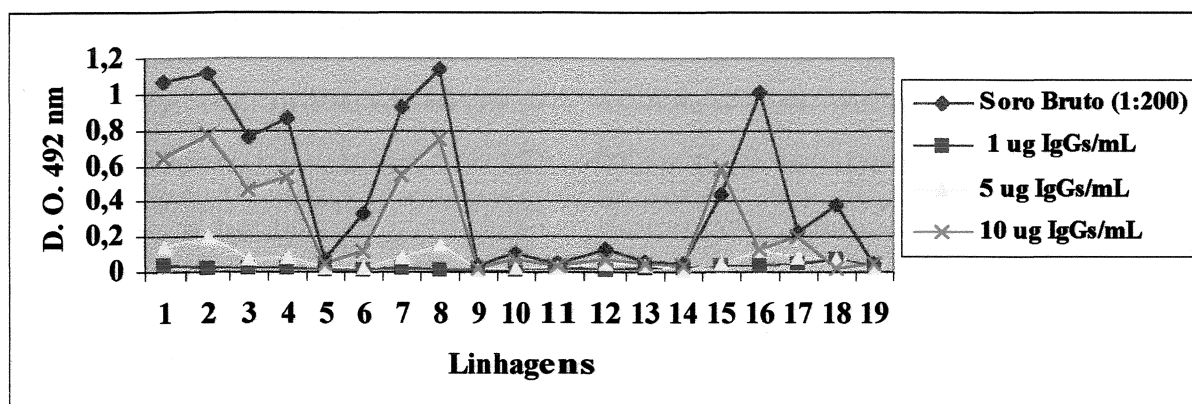


FIGURA 7: Teste imunoenzimático (ELISA) com soro bruto AS-3(42) e purificado (IgGs) em reação com antígenos das 19 linhagens de leveduras testadas.

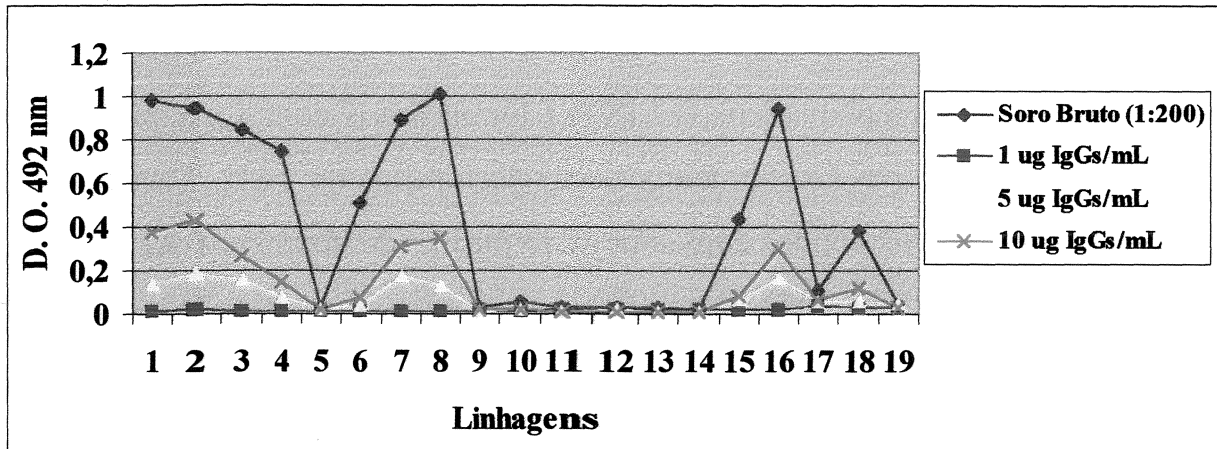


FIGURA 8: Teste imunoenzimático (ELISA) com soro bruto AS-4(42) e purificado (IgGs) em reação com antígenos de 19 linhagens de leveduras testadas.

4.9. Eletroforese de proteínas intracelulares - SDS-PAGE

A FIG. 9 mostra os resultados do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, das amostras 97-a e CBS-573, submetidas a 105.000 g por 5, 10 e 60 minutos corados por prata, usando-se um marcador de massa molecular variando de 14,4 a 94 kDa (MMM). Testes semelhantes foram também levados a efeitos com as demais linhagens descritas na (TAB. 1).

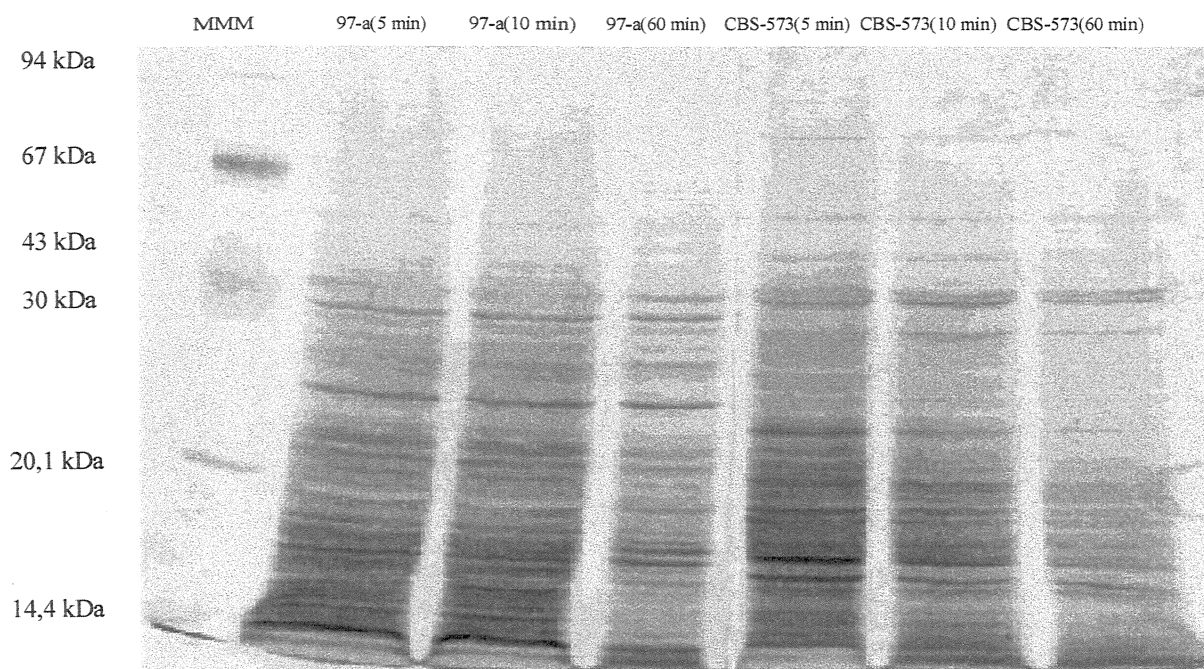


FIGURA 9: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de extratos protéicos das linhagens (97-a) e (CBS-573).

As FIG. 10 e 11, expressam os resultados do perfil eletroforético de antígenos citoplasmáticos a 105.000 g por 60 minutos corados por prata, dos sobrenadantes protéicos das leveduras, usando-se um marcador de massa molecular variando de 14,4 a 94 kDa (MMM).

O GEL 1 (FIG. 10) indica os resultados do perfil eletroforético (SDS-PAGE) dos extratos protéicos de 10 linhagens de leveduras obtidas a 105.000g por 60 minutos. Linhagens 1) CBS-562, 2) 97-a, 3) F-72, 4) E-72, 5) FCF-405, 6) FCF-152), 7) 1-b, 8) CBS-94, 9) FCF-430 e 10) Ct-4 enquanto que os resultados das amostras 11) CBS-604,12) 21-c, 13) 7-a, 14) 4-c, 15)17-b, 16) CBS-566, 17) CBS-573, 18) 1M-90 e 19) IZ-1339 estão expressas no GEL 2 (FIG. 11). Diferenças qualitativas entre as espécies foram observadas em relação aos padrões protéicos obtidos nos dois géis, mostrando as diferenças interespecíficas quando as linhagens foram comparadas.

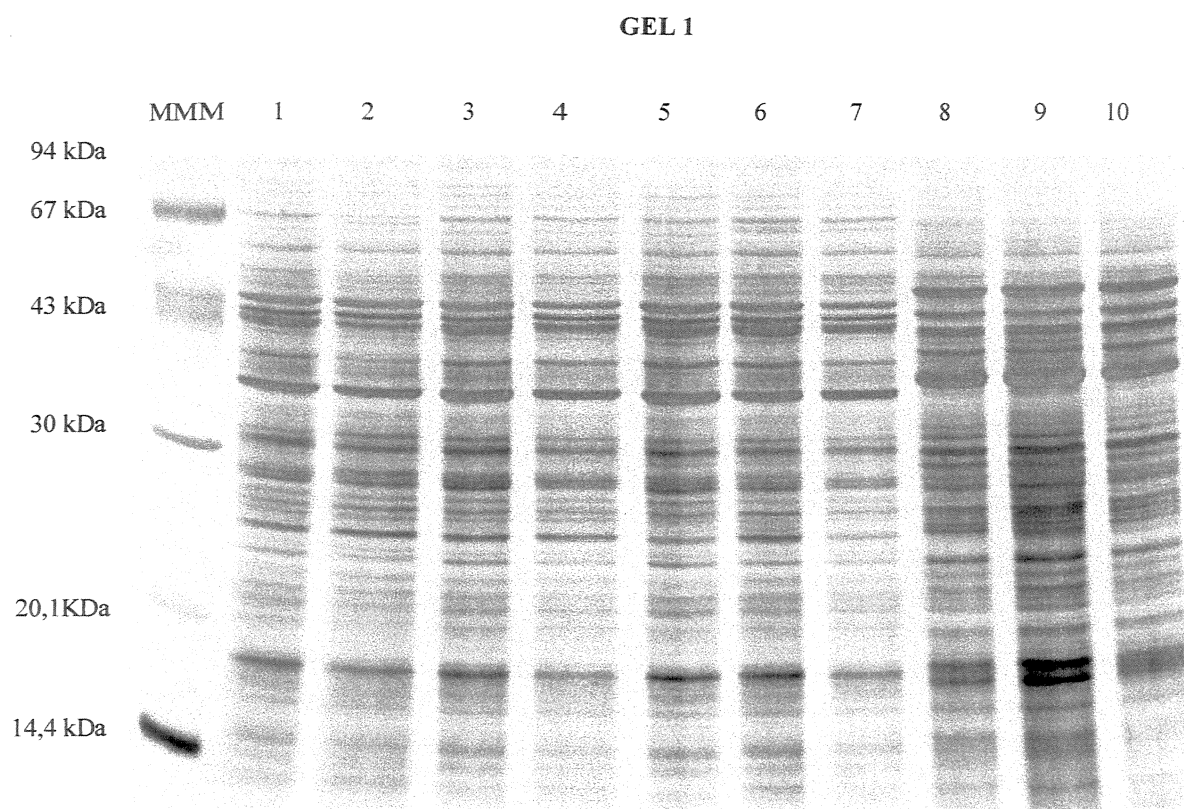


FIGURA 10: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) dos extratos protéicos das linhagens de leveduras obtidos por centrifugação a 105.000 g por 60 minutos; MMM) Marcador de massa molecular, Linhagens 1) CBS-562, 2) 97-a, 3) F-72, 4) E-72, 5) FCF-405, 6) FCF-152), 7) 1-b, 8) CBS-94, 9) FCF-430 e 10) Ct-4.

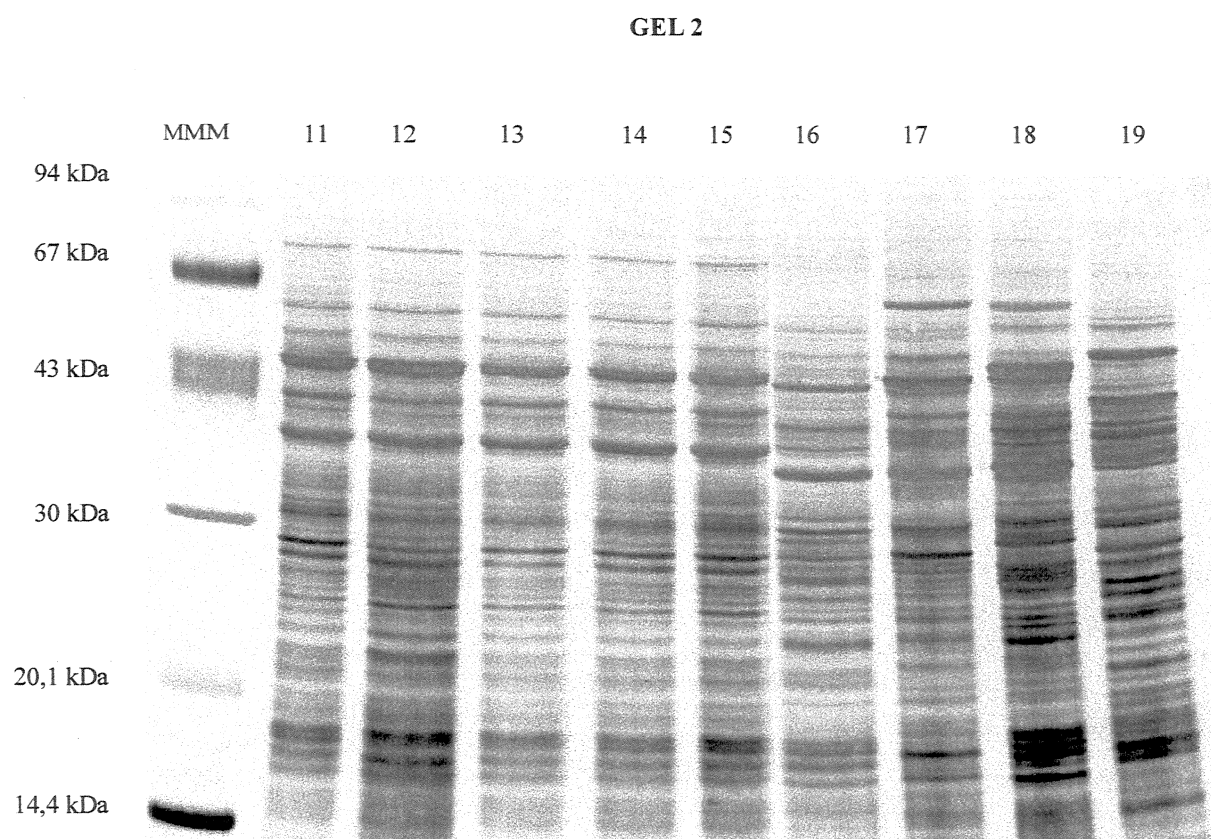


FIGURA 11: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) dos extratos protéicos das linhagens de leveduras obtidos por centrifugação a 105.000 g por 60 minutos; MMM) Marcador de massa molecular, Linhagens 11) CBS-604, 12) 21-c, 13) 7-a, 14) 4-c, 15) 17-b, 16) CBS-566, 17) CBS-573, 18) 1M-90 e 19) IZ-1339.

4.11. Diagrama de bandas

Na eletroforese por SDS-PAGE de proteínas solúveis das amostras coradas com nitrato de prata os géis foram analisados pelo programa Kodak Digital Science 1DTM, que permitiu a obtenção de 2 diagramas de bandas, que estão expressos nas FIG. 12 e 13 mostrando a presença ou ausência dessas bandas nos géis.

O diagrama da FIG. 12, mostra os resultados indicativos da presença e/ou ausência de bandas das linhagens (CBS-562, 97-a, F-72, E-37, FCF-405, FCF-152 e 1-b) analisadas pelo programa, apresentando o mesmo padrão (25 bandas), enquanto que 3 linhagens (CBS-94, FCF-430 e Ct-4) apresentaram 28 bandas.

O diagrama da FIG. 13, mostra os resultados indicativos da presença e/ou ausência de bandas das linhagens (CBS-604, 21-c, 7-a, 4-c e 17-b) analisadas pelo programa, apresentando 27 bandas, e as linhagens CBS-566, CBS-573, 1M-90 e IZ-1339, apresentaram um número de 23, 27, 31 e 28 bandas, respectivamente.

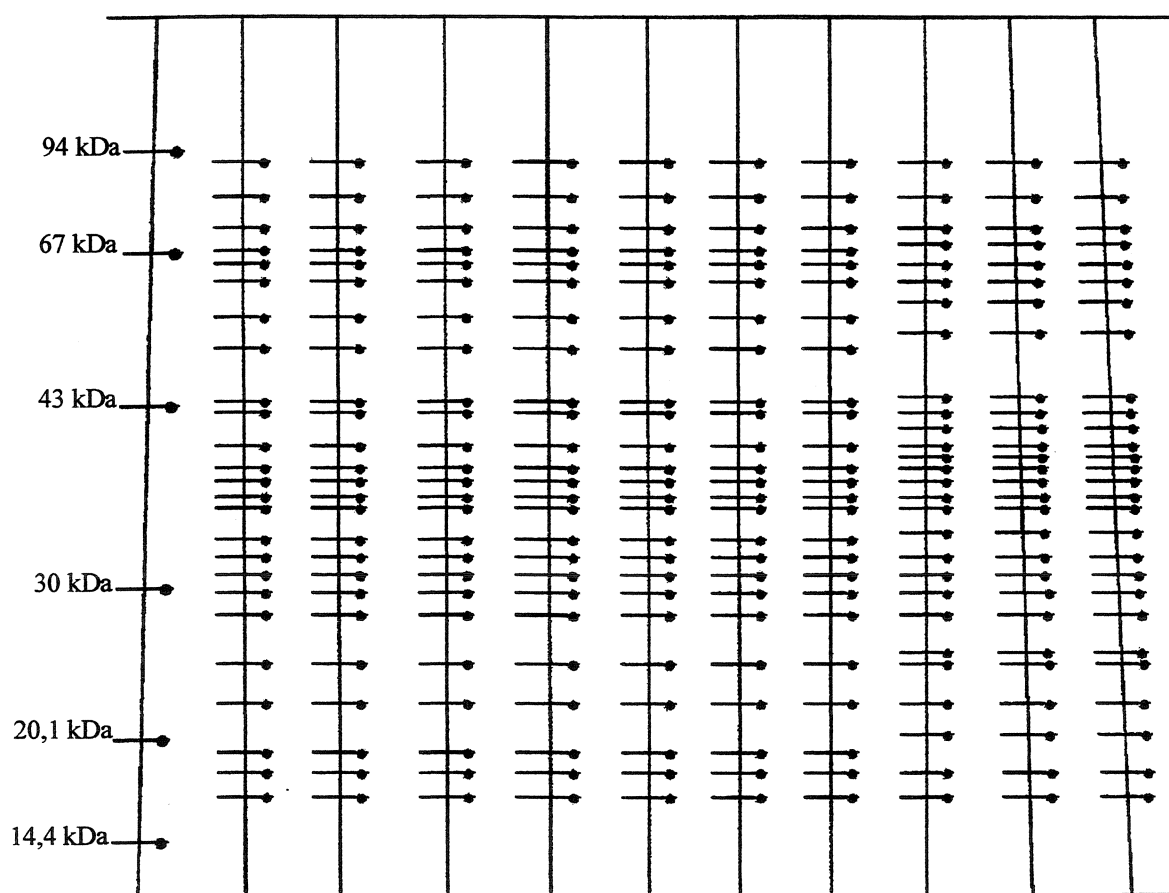


FIGURA 12: Diagrama do perfil eletroforético (SDS-PAGE) das bandas protéicas das linhagens CBS-562, 97-a, F-72, E-37, FCF-405, FCF-152, 1-b, CBS-94 e FCF-430 e Ct-4.

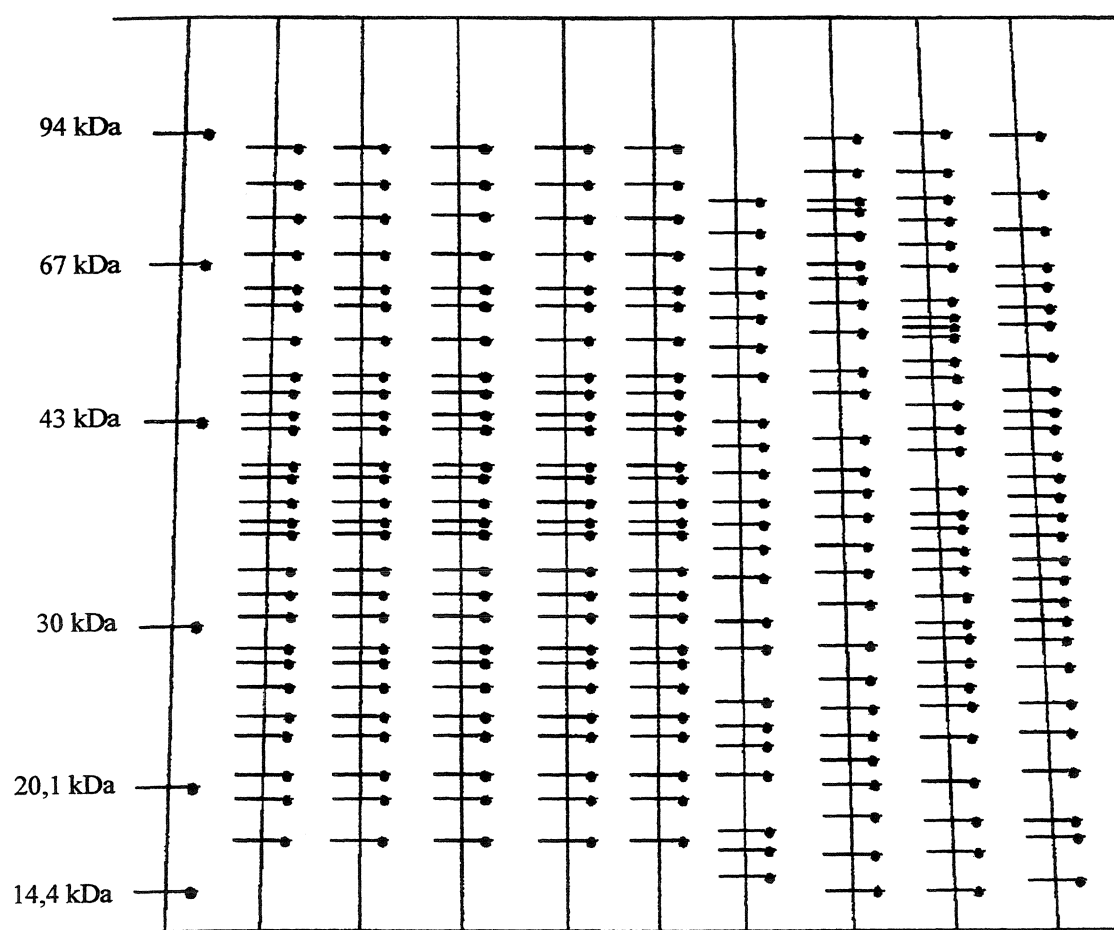


FIGURA 13: Diagrama do perfil eletroforético (SDS-PAGE) das bandas protéicas das linhagens CBS-604, 21-c, 7-a, 4-c, 17-b, CBS-566, CBS-573, 1M-90 e IZ-1339.

4.12. Dendrograma

Amostras das 19 linhagens de leveduras, submetidas à extração de proteínas intracelulares, centrifugadas por 60 minutos e analisadas por SDS-PAGE, permitiram a obtenção de perfis eletroforéticos característicos das linhagens em particular, os quais foram analisados pelo programa NTSYS-pc versão 1.70, que forneceu as massas moleculares das bandas de proteínas em relação as massas moleculares padrões (MMM) conhecidas empregadas no gel. Esses dados permitiram a construção de uma matriz de dados binários, onde os valores 0 e 1, puderam ser analisados 2 a 2. O uso do coeficiente de similaridade SM (Simple Matching), e do método de agrupamento UPGMA, possibilitou a formação de uma matriz de similaridade e o agrupamento das amostras empregadas.

Este procedimento, permitiu a formação de III grupos, envolvendo linhagens-tipo de *Candida* sp. Grupo I com 7 linhagens de *C. albicans* (CBS-562, 97-a, F-72, E-37, FCF-405, FCF-152 e 1-b) agrupadas com um $S_{SM} = 1,000$, Grupo II com 3 linhagens de *C. tropicalis* (CBS-94, FCF-430 e Ct-4) com $S_{SM} = 1,000$, Grupo III com cinco linhagens de *C. parapsilosis* (CBS-604, 21-c, 7-a, 4-c e 17-b) com $S_{SM} = 1,000$. As linhagens de *C. guilliermondii* (CBS-566), *C. krusei* (CBS-573), *K. marxianus* (IZ-1339) e 1M-90 não se agruparam a outras linhagens, quando comparadas conforme mostra a (FIG. 14).

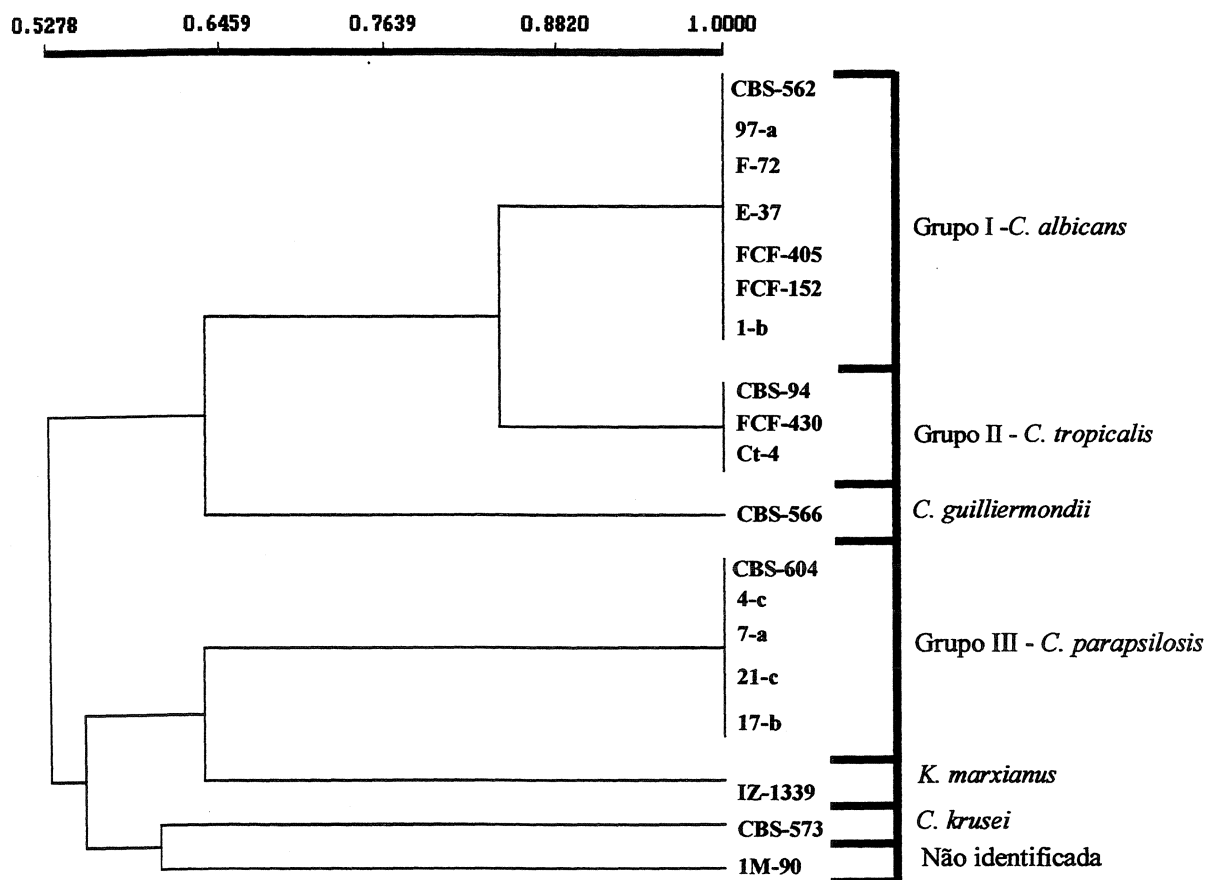


FIGURA14: Dendrograma de similaridade dos perfis eletroforéticos obtidos das 19 linhagens de leveduras analisadas, utilizando-se o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM).

5. DISCUSSÃO

O meio diferencial, CHROMagar Candida[®] tem sido empregado em laboratórios clínicos como rotina, sendo um meio sólido composto por peptona, glucose, ágar, cloranfenicol e uma mistura cromogênica, que pode ser usado no isolamento e identificação presuntiva de *Candida* spp. e a diferenciação destas espécies de outras leveduras baseando-se, na diferença de cores produzidas nas colônias pela reação de enzimas espécie-específicas com substratos cromogênicos (ODDS & BERNAERTS, 1994).

As 19 linhagens empregadas neste trabalho, previamente identificadas bioquimicamente e descritas na TAB. 1, foram testadas neste meio CHROMagar Candida[®] e os resultados obtidos podem ser observados na TAB. 4. Pode-se detectar a formação de 5 grupos, de acordo com a coloração e a morfologia das colônias apresentadas, como descrevem (ODDS & BERNAERTS 1994; BEIGHTON *et al.*, 1995; BAUMGARTNER *et al.*, 1996; PFALLER *et al.*, 1996 e GIUSIANO & MANGIATERRA 1998) tais como: coloração verde claro (lisa); azul acinzentado (lisa); rosa claro (lisa); rosa claro (rugosa) e creme (lisa), envolvendo as amostras (CBS-562, 97-a, F-72, E-37 (*C. albicans*), 1-b (*C. tropicalis*), FCF-405 e FCF-152 (*C. guilliermondii*)); (CBS-94, FCF-430 e Ct-4 (*C. tropicalis*)); 1M-90 (*C. krusei*), CBS 566 (*C. guilliermondii*), IZ-1339 (*K. marxianus*); CBS-573 (*C.*

krusei) e (CBS-604, 21-c, 7-a (*C. parapsilosis*), 4-c (*C. krusei*) e 17-b (*C. albicans*)), respectivamente.

Linhagens anteriormente identificadas como *C. guilliermondii* (FCF-405 e FCF-152) e *C. tropicalis* (1-b) (TAB. 1), foram classificadas por este método como *C. albicans*. As linhagens 17-b de *C. albicans* e 4-c de *C. krusei*, apresentaram coloração creme, atípica destas espécies e a amostra 1M-90 identificada como *C. krusei*, revelou colônias com coloração rosa claro e lisas, ao invés de colônias rosa claro rugosas, típica desta espécie. Esses dados mostram que o método de identificação CHROMagar Candida® possui maior sensibilidade para as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, mas não para as demais espécies testadas. Nossos resultados foram semelhantes aos de MERLINO *et al.* (1998) e ODDS & BERNAERTS (1994) entre outros autores (PFALLER *et al.*, 1996; BEIGHTON *et al.*, 1995) na identificação destas espécies, demonstrando que este meio cromogênico apresenta uma alta especificidade para *C. albicans* (aproximadamente 100%) e distinção presuntiva para *C. tropicalis* e *C. krusei* pelas suas cores e morfologia diferenciais de suas colônias das de outras espécies de leveduras. Estes resultados sugerem que o uso desse meio é limitado e de preferência deve ser associado à outras técnicas e métodos, quando a identificação envolver estudos que impliquem a presença de várias espécies, e não de uma espécie em particular, como por exemplo *C. albicans*.

A aplicação de outras técnicas como o teste imunoenzimático (ELISA), tem sido um recurso sorológico importante em estudos epidemiológicos e de diagnóstico, na caracterização de leveduras e outros microrganismos PINTER *et al.* (1995) e DUARTE (1995), levando-se em conta ser um teste que possui uma alta sensibilidade, avalia grande quantidade de amostras num curto espaço de tempo, com um pequeno consumo de reagentes e consequentemente

apresenta baixo custo. A sensibilidade do teste pode ser aumentada ainda mais com a purificação de uma classe de imunoglobulina como as do tipo IgG de outras, eliminando também restos de hemácias e leucócitos, além de lipídios que são moléculas que diminuem a sensibilidade do teste, segundo (HARLOW & LANE, 1988).

Antes da avaliação dos testes imunoenzimáticos (ELISA) para a caracterização das amostras de leveduras, estas foram preparadas baseando-se no método descrito por AXELSEN (1973) para a extração de proteínas intracelulares, obtidas por ultracentrifugação a 105.000 g por 60 minutos. Outros autores como PINTER *et al.* (1995) indicam, no entanto, a obtenção de sobrenadantes protéicos através de um menor tempo (30 minutos) de centrifugação. Testes com sobrenadantes obtidos por centrifugação a 5 minutos e 10 minutos (105.000 g), tempo ainda menor, permitiram a obtenção de resultados semelhantes na reatividade dos soros produzidos quando comparados por ELISA, como se observa nas FIG. 5 e 6, o que sugere ser os tempos citados, suficientes para o preparo de antígenos com potencial imunogênico adequado na produção de anticorpos, para fins sorológicos.

Os testes imunoenzimáticos (ELISA), empregando-se anticorpos policlonais produzidos contra antígenos citoplasmáticos de duas linhagens de *C. albicans*, com antígenos obtidos por centrifugação a 5, 10 e 60 minutos objetivando-se avaliar a capacidade de diferenciação de *C. albicans* de outras espécies de *Candida* sp., demonstraram reação cruzada entre as espécies empregadas, tanto com o soro bruto (1:200) quanto purificado (10µg/mL), como mostram as FIG. 5, 6, 7 e 8. Os resultados obtidos nestes testes, foram semelhantes aos encontrados em pesquisas empregando-se outros métodos sorológicos, como: imunoeletroforese simples (BIGUET *et al.*, 1962), imunoeletroforese bidimensional linear (AXELSEN, 1976) e

imunoeletroforese cruzada (GUINET *et al.*, 1979), detectando-se reação cruzada entre os extratos citoplasmáticos solúveis obtidos a 105.000 g por 60 minutos de centrifugação, principalmente entre *C. albicans* e *C. tropicalis*, indicativo da existência de antígenos comuns entre estas duas espécies. Estes dados permitem no entanto, sugerir que a técnica de ELISA possa ser usada, talvez, como um teste preliminar na triagem de amostras inter-específicas, as quais se deseja diferenciar, anterior ao emprego de técnicas que envolvam biologia molecular, com potencial de resolução intra-específica e que têm sido usadas como rotina nos laboratórios clínicos e de pesquisa.

A eletroforese de proteínas totais, foi utilizada como um terceiro método na caracterização dos 19 isolados, por ser amplamente utilizado em pesquisas que envolvem taxonomia e caracterização de microrganismos tais como bactérias, (KERSTERS & DE LEY, 1975; COSTAS *et al.*, 1987; COSTAS *et al.*, 1989) e diferentes espécies de leveduras (VANCANNEYT *et al.*, 1991; ANTONSSON *et al.*, 1994; GOMES, 1995).

O emprego da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) combinado com a análise numérica dos perfis eletroforéticos das bandas protéicas (FIG. 10, 11, 12 e 13) das 19 linhagens de leveduras, baseando-se no coeficiente de similaridade Simple Matching (SM) e no método de agrupamento UPGMA, originou um dendrograma de similaridade, observado na FIG. 14, onde pode-se observar a formação de III grupos entre os isolados de *Candida* sp., envolvendo as linhagens-tipo de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, quando comparadas.

A linhagem-tipo de *C. albicans* (CBS-562) se agrupou com 6 isolados (97-a, F-72, E-37, FCF-405, FCF-152 e 1-b) formando o grupo I, a linhagem-tipo de *C. tropicalis* (CBS-94) se agrupou com 2 isolados (FCF-430 e Ct-4) formando o grupo II e a linhagem-tipo de *C. parapsilosis* (CBS-604) se

agrupou com 4 isolados (21-c, 7-a, 4-c e 17-b) formando o grupo III. Cada um desses grupos teve um grau de similaridade (S) de $S_{SM} = 1,000$ (100%). As linhagens usadas como linhagens-tipo *C. guilliermondii* (CBS-566), *C. krusei* (CBS-573) e *K. marxianus* (IZ-1339), e um isolado de cavidade oral 1M-90, não se agrupam com outras linhagens a nível de espécie, como podemos observar na FIG. 14.

Os graus de similaridade ao nível de espécie foram semelhantes aos encontrados por um estudo sistemático feito por VANCANNEYT *et al.* (1991). Os grupos de *C. albicans* e *C. tropicalis* formados nos estudos desses autores, relacionam-se com $S_{SM} = 0,840$, enquanto em nosso experimento o valor de similaridade para essas espécies foi de $S_{SM} \geq 0,844$. Embora o coeficiente de correlação usado pelos mesmos, tenha sido baseado no momento de Person (r), que emprega caracteres quantitativos considerando somente presença de bandas, nós aplicamos uma análise qualitativa, baseando-se na presença (1) e ausência (0) de um determinado caráter, que se expressam na matriz de dados binários. Nossos resultados foram, no entanto, superiores à aqueles encontrados por SHECHTER *et al.* (1972) os quais estudaram proteínas ácidas e básicas não desnaturadas, aplicando-se o coeficiente de associação (similaridade) Jaccard (J) que exclui as combinações negativas – obtendo-se para as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* um grau de associação $S_J \geq 0,40$ mostrando que *C. guilliermondii* relaciona-se às espécies anteriores com $S_J \geq 0,32$ e *C. tropicalis* se associando por último com $S_J \geq 0,25$. Com esses resultados, os autores concluíram que *C. krusei* e *C. parapsilosis* são mais aparentadas seguidas, pela *C. albicans*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*. Esses resultados, aparentemente divergentes, podem estar relacionados ao uso de um coeficiente de associação diferente daquele que nós aplicamos (SM), associado às

condições de cultivo, modo de extração das proteínas intracelulares, preparo das amostras, e princípios da separação eletroforética, fatores estes que segundo KERSTERS (1985), podem influenciar nos resultados finais da análise numérica.

Os resultados da SDS-PAGE, através da análise do perfil eletroforético dos sobrenadantes, obtidos em três diferentes tempos de ultracentrifugação, mostraram diferenças significativas na concentração protéica das bandas e também no desaparecimento de algumas, como mostra a FIG. 9. Isso se deve provavelmente, ao longo tempo (60 minutos) de centrifugação, onde algumas proteases atuam degradando proteínas, mesmo sob refrigeração, além disso, a alta velocidade empregada, também contribuiu para o desaparecimento de bandas que foram com certeza carreadas junto com os debris celulares (BRUCE ALBERTS *et al.*, 1989), o que sugere, portanto, não haver necessidade das amostras serem submetidas a longos tempos de centrifugação. As amostras centrifugadas a 105.000 g por 60 minutos, utilizadas na produção do soro policlonal, e aplicadas no teste de ELISA, revelaram na eletroforese uma perda de proteínas. Pesquisas semelhantes, levadas à efeito por DUARTE (1996) submetendo as amostras à uma centrifugação de 13.000 g por 5 minutos, demonstraram que não há perdas de proteínas durante o processo de centrifugação, sugerindo que o tempo de centrifugação e consequentemente o preparo de antígenos na produção de anticorpos, pode ser um fator limitante em testes sorológicos.

A análise dos resultados obtidos na avaliação dos métodos CHROMagar Candida[®], ELISA e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), com ênfase na identificação e caracterização de espécies de leveduras com propósitos clínicos e de pesquisa, levados à efeito neste trabalho, permitem considerar que a técnica de SDS-PAGE, se mostra mais adequada

para fins de estudos taxonômicos, epidemiológicos e de aplicação clínica.

Anticorpos policlonais, em reação com antígenos obtidos de extratos protéicos intracelulares de espécies de leveduras submetidos à testes imunoenzimáticos, como o método de ELISA, apresentam reação cruzada entre as espécies, indicando a necessidade do isolamento de anticorpos puros, que tanto podem reagir com antígeno-específicos ou inespecíficos, ou então, a produção de anticorpos monoclonais a partir de células em cultura, amplamente disseminada em muitas ciências biológicas, nas quais o anticorpo é empregado como uma sonda altamente específica.

O método de identificação CHROMagar Candida[®], demonstra especificidade para as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, mas não para outras espécies de *Candida* sp. o que o torna menos adequado para a identificação de amostras diversificadas ou contendo várias espécies deste gênero.

6. CONCLUSÕES

O método de identificação CHROMagar Candida® demonstra maior especificidade para as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, mas não para as demais espécies testadas.

Os anticorpos policlonais produzidos para a espécie *C. albicans*, reagem com os antígenos homólogos, mas apresentam reação cruzada com outras espécies de *Candida*.

A técnica de SDS-PAGE aplicada com extratos protéicos citoplasmáticos, permitiu a obtenção de perfis eletroforéticos, que submetidos à análise numérica, originou um dendrograma que indica as relações de afinidades fenéticas entre espécies de *Candida*, necessários aos estudos taxonômicos, epidemiológicos e de sistemática.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. AHEARN, D.G. Systematics of yeasts medical interest. *In*: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF MYCOSES, 1970, Washington. **Proceedings**. Washington : Pan American Health Organization, 1970. p. 64-70.
2. AL MOUDALLAL, Z. *et al.* Comparative sensitivity of different ELISA procedures for detecting monoclonal antibodies. **Dev. Biol. Stand.**, Basel, v. 57, p. 35-40, 1984.
3. ALBERTS, B. *et al.* **Molecular biology of the cell**. 2nd ed. New York : Garland, 1989. 1219p.
4. ALFENAS, A.C. *et al.* **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa : Universidade Federal de Viçosa, 1991. 245p.
5. ALY, R. *et al.* Correlation of human “*in vivo*” and “*in vitro*” cutaneous antimicrobial factors. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 131, n. 5, p. 579-583, 1975.
6. AMES, G.F.L. Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 249, n. 2, p.

* De acordo com a NBR-6023 de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

7. ANTONSSON, B. *et al.* Protein kinase C in yeast. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, n. 24, p. 16821-16828, 1994.
8. ARENDOF, T.M.; WALKER, D.M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 1-10, 1980.
9. ASAKURA, K. *et al.* Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeast *Candida albicans* and *C. glabrata*. **J. Gen. Microbiol.**, Cambridge, v. 137, pt. 11, p. 2531-2538, 1991.
10. AXELSEN, N.H. Quantitative Immunelectrophoretic methods as tools for a polyvalent approach to standardization in the immunochemistry of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 7, p. 949-960, 1973.
11. _____. Analysis of human *Candida* precipitins by quantitative immunelectrophoresis. **Scand. J. Immunol.**, Oxford, v. 5, p. 177-190, 1976.
12. BAUMGARTNER, C., FREYDIERE, A.N., GILLE, Y. Direct identification and recognition of yeast from clinical material by using *albicans* ID and CHROMagar *Candida* plates. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 34, p. 454-456, 1996.
13. BEIGHTON, D. *et al.* The use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, p. 3025-3027, 1995.
14. BERKICEVSKY, I. *et al.* Oral *Candida* in asymptomatic wearers. **Int. J. Oral Surg.**, Copenhagen, v. 9, p. 113-115, 1980.

15. BERKICEVSKY, I. *et al.* Oral *Candida* in Children. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 57, p. 37-40, 1984.
16. BIGUET, J., TRAN VAN KY, P., ANDRIEU, S. Étude électrophorétique et immunochimique comparée de antigènes de quelques levures du genre *Candida* (*C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. macedoniensis*) **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 17, p. 239-254, 1962.
17. _____. *et al.* Étude immunoélectrophorétique de la nature et de l'ordre d'apparition des anticorps précipitants du sérum de lapin en fonction de leur mode d'immunisation contre *C. albicans*. **Saboraudia**, Oxford, v. 4, p. 178-157, 1965.
18. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1978.
19. BRUNEAU, S., GUINET, R. Rapid Identification of medically important yeast by electrophoretic protein patterns. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 58, p. 329-334, 1989.
20. BUDTZ-JØRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeast infections. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 48, p. 61-69, 1990a.
21. _____. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 48, p. 37-42, 1990b.

22. BURNIE, J.P. *et al.* Use of immunoblotting to identify antigenic differences between the yeast and mycelial phases of *Candida albicans*. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 38, p. 701-706, 1985.
23. CARLILE, M.J., WATKINSON, S.C. **The fungi**. London : Academic, 1994. 482p.
24. CASANOVA, M., CHAFFIN, W.L. Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. **J. Gen. Microbiol.**, Cambridge, v. 137, p. 1045-1051, 1991.
25. CATO, E.P. *et al.* Electrophoretic study of *Clostridium* species. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 15, p. 688-702, 1982.
26. CHARPENTIER, C., FONTANGES, R. Mise en évidence du caractère hapténique des peptidomanaus de deux levures: *Saccharomyces oviformis* et *Candida mycodernia*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 61, p. 143-150, 1977.
27. CLARK, M.F., ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay for detection of plant viruses. **J. Gen. Virol.**, London, v. 34, p. 475-483, 1977.
28. COSTAS, M., HOLMES, B., SLOSS, L.L. Numerical analysis of electrophoretic patterns of *Providencia rustigianni* strains from human diarrhoea and other sources. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 63, p. 319-328, 1987.
29. COSTAS, M. *et al.* Evaluation of numerical analysis of SDS-PAGE of protein patterns for typing *Enterobacter cloacae*. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 103, p. 265-274, 1989.

- 30.COSTAS, S.O., LOURDES BRANCO, C. Evaluation of a molybdenum culture medium selective and differential for yeast. **J. Pathol. Bacteriol.**, Edinburgh, v. 87, p. 428- 431, 1964.
- 31.CROWTHER, J.R. **ELISA** : theory and practice. Totowa : Humana, 1995. 223p.
- 32.DION, A.S., POMENTI, A.A. Ammoniacal silver staining of proteins: mechanism of glutaraldehyde enhancement. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 129, p. 490-496, 1983.
- 33.DUARTE, K.M.R. **Produção de anticorpos monoclonais contra o vírus do mosaico do tomateiro (ToMV)**. Piracicaba, 1995. 84p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP.
- 34._____. **Anticorpos monoclonais aplicados à agricultura**. Piracicaba : ESALQ, 1996. 48p.
- 35.FARRIS, J.S. On the cophenetic correlation coefficient. **Syst. Zool.**, Washington, v. 18, p. 279-285, 1969.
- 36.FUCAZAWA, Y. *et al.* Immunological specificity of soluble polysaccharides of *Candida albicans*. **Jpn. J. Microbiol.**, Tokyo, v. 12, p. 283-292, 1968a.
- 37.FUCAZAWA, Y., SHINODA, T., TSUCHIYA, T. Response and specificity of antibodies for *Candida albicans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 95, p. 754-763, 1968b.

38. GIUSIANO, G.E., MANGIATERRA, M.L. Differentiation e identification presuntiva rápida com el medio CHOMagar candida. **Rev. Argent. Microbiol.**, Buenos Aires, v. 30, p. 100-103, 1998.
39. GLINN, A.N., REID, J. Electrophoretic patterns of soluble fungal proteins and their possible use as taxonomic criteria in teh genus *Fusarium*. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v. 47, p. 1823-1831, 1969.
40. GOLDSCHMIDT, M.C. *et al.* New aniline blue dye medium for rapid identification and islation of *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 29, p. 1095-1099, 1991.
41. GOMES, L.H. **Avaliação de quatro métodos para a caracterização de leveduras.** Piracicaba, 1995. 89p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP.
42. GORDON, M.A., LITTLE, G.N. Effective dehydrated media – with surfancts for identification of *Candida albicans*. **Saboraudia**, Oxford, v. 2, p. 171-175, 1963.
43. _____, ELLIOT, J.C., HAWKINS, T.W. Identification OF *Candida albicans*, other *Candida* species and *Torulopsis glabrata* by means of immunofluorescence. **Saboraudia**, Oxford, v. 5, p. 323-328, 1967.
44. GOTLIEB, M., CHAVKO, M. Silver staining of and denatured eucaryotic DNA in agarose gels. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 165, p. 33-37, 1987.

45. GUINET, R. *et al.* Identification par immunoélectrophorèse bidimensionnelle d'antigènes pariétaux solubles spécifiques de *Candida tropicalis*. **Ann. Microbiol.**, Paris, v. 130B, p. 433-442, 1979.
46. GUNASEKARAN, M., HUGHES, A. Simple liquid medium for chlamidospore formation in *Candida albicans*. INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS, 2., 1977, Flórida. **Abstracts**. Flórida : University of Florida, 1977. Vol. A-L, p. 249.
47. HALL, R., ZENTMYER, G.A., ERWIN, D.C. Approach to taxonomy of *Phytophthora* through acrylamide gel-electrophoresis of proteins. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 59, p. 770-774, 1969.
48. HAKAKAVA, R. Estudos sorológicos sobre o fungo *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. e sobre suas interação com plantas do gênero *Coffea*. Piracicaba, 1993. 75p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP.
49. HARLOW, E., LANE, D. **Antibodies** : a laboratory manual. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726p.
50. HASENCLEVER, H.F., MITCHELL, W. Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of antigenic groups in *Candida albicans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 82, p. 570-573, 1961^a.
51. _____, _____. Antigenic studies of *Candida*. III. Antigenics relation of *Candida* : antigenic relation of *C. albicans* group A and Group B to *Candida stellatoidea* and *Candida tropicalis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 82, p. 574-577, 1961b.

52. HASENCLEVER, H.F., MITCHELL, W. Antigenic studies of *Candida*. II. Comparative Pathogenicity of *C. Albicans* GROUP A, GROUP B and *C. Stellatoidea*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 82, p. 578-581, 1961c.
53. HÖFLING, J.F. **Reações sorológicas com antígenos presentes em sementes de *C. arabica* L.** Campinas, 1975. 45p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.
54. _____ F. *et al.* Avaliação de diferentes metodologias para extração de proteínas intracelulares de leveduras do gênero *Candida*. **Rev. Ciênc. Tecnol.**, Piracicaba, v. 5, n. 2, p. 67-77, 1996.
55. JOLY, S. **Levantamento de leveduras ocorridas em frutos maduros: sua posição sistemática.** Piracicaba, 1954. 154p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- USP.
56. JONES, A.T., MITCHELL, M.J., BROWN, J.F. Infectibility of some new raspberry cultivars with arabic mosaic and raspberry ringspot viruses and further evidence for variation in British isolates of these two nepoviruses. **Ann. Appl. Biol.**, Cambridge, v. 115, p. 57-69, 1989.
57. JONES, M.G., NOBLE, W.C. An electrophoretic study of enzymes as a tool in the dermatophytes. **J. Gen. Microbiol.**, Cambridge, v. 120, p. 1101-1107, 1982.
58. JOSHI, K.R., GAVIN, J.B., BREMMER, D.A. The formation of germ tubes by *Candida albicans* in various peptone-media. **Saboraudia**, Oxford, v. 11, p. 259-262, 1973.

- 59.KEMP, G., SOLOTOROVSKY, L. Localization of antigens in mechanically disrupted cell of certain species of the genera *Candida* and *Torulopsis*. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 93, p. 305-314, 1963.
- 60.KERSTERS, K. Numerical methods in the classification of bacteria by protein electrophoresis. In: GOODFELLOW, M., JONES, D., PRIEST, F.G. **Computer-assisted bacterial systematics**. London : Academic Press, 1985. p. 337-368.
- 61._____, DE LEY, J. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic proteins patterns. **J. Gen. Microbiol.**, Cambridge, v. 87, p. 333-342, 1975.
- 62.KIMURA, L.H., PEARSALL, N.N. Adherence of *Candida albicans* to human bucal ephitelial cells. **Infect. Immun.**, Washington, v. 21, p. 64-68, 1978.
- 63.KITAJIMA, E.W. Novas abordagens na diagnose de doenças incitadas por fitoviroses. **Fitopatol. Bras.**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 4, 1991.
- 64.KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeast** : a taxonomica study. 3th ed. Amsterdam : Elsevier Science, 1984. p. 585-613.
- 65.LACAZ, C.S. **Candidiases**. São Paulo : E.P.U./EDUSP, 1980. 190 p.
- 66.LAEMMLI, U.K. Cleavage of strutural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- 67.LAY, K.M., RUSSEL, C. *Candida* species and yeasts in month of infants from a special care of a maternity hospital. **Arch. Dis. Child.**, London, v. 52, p. 794-804, 1977.

- 68.LEE, W., BURNIE, J., MATHEWS, R. Fingerprinting *Candida albicans*. **J. Imm. Meth.**, Amsterdam, v. 93, p. 177-182, 1986.
- 69.LENNETE, E.H. *et al.* **Manual de microbiologia clínica**. 4. ed. Buenos Aires : Méd. Pan-americana, 1987. 228p.
- 70.MACDONELL, M.T., COLWELL, R.R. The contribution of numerical taxonomy to the systematics of Gram-negative bacteria. *In*: GOODFELLOW, M., JONES, D., PRIEST, F.G. **Computerassisted systematics**. London : Academic Press, 1985. p. 107-136.
- 71.MAIDEN, M.F.J., TANNER, A. Identification of oral yeasts by polyacrilamide gel electrophoresis. **Oral Microbiol. Immun.**, Copenhagen, v. 6, p. 187-190, 1991.
- 72.MENDEL, E.B., HARBERMAN, S., HALL, D.K. Isolation of *Candida* from clinical specimen. Comparative study of Pagano-Levin and Nickerson's culture media. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 16, p. 180-184, 1960.
- 73.McGINNIS, M.R. **Laboratory procedures in clinical mycology**. Chapel Hill : The University of North Carolina, 1976. p. 01-d3; d6-d10; d20-d21.
- 74.MERLINO, J., TAMBOSIS, E., VEAL, D. Chromogenic tube test for presumptive identification or confirmation of isolates as *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 4, p. 1157-1159, 1998.

75. MEYER, W.G., AHEARN, D.G., YARROW, D.G. The genus *Candida* Berkhout. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeast : a taxonomic study**. 3th ed. Amsterdam : Elsevier Science, 1984. p. 585-613.
76. MOREIRA, D. **Prevalência de *Candida* na cavidade bucal de escolares de diferentes categorias sócio-econômicas. Avaliação de parâmetros clínicos, salivares e microbiológicos**. Piracicaba, 1997. 107p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.
77. NEDER, R.N. **Microbiologia : manual de laboratório**. São Paulo : Livr. Nobel, 1992. 138p.
78. O'BRIEN, J.R. Nickerson's medium in the diagnosis of vaginal moniliasis. **Can. Med. Assoc. J.**, Ottawa, v. 90, p. 1073-1074, 1964.
79. ODDS, F.C. *Candida* Infections: an overview. **Crit. Rev. Microbiol.**, Boca Raton, v. 15, p. 1-5, 1987.
80. _____. Saboraud's agar. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxford, v. 29, p. 355-359, 1991.
81. _____. BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, p. 1923-1929, 1994.
82. OI, V.T., HERZENBERG, L.A. Antibody purification: protein A-sepharose column chromatography. In: MISHELL, B.B., SHIIGI, S.M. **Selected methods in cellular immunology**. San Francisco : Freeman, 1980. p. 368- 370.

83. OLIVEIRA, A.R. Considerações sobre antissoros obtidos pela técnica de antígeno no linfonodo. **Summa Phitopath.**, Jaguariúna, v. 1, n. 1, p. 61-64, 1975.
84. OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. **Ark. kemi. Geal.**, v. 266, p. 14, 1949.
85. _____. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *In*: KALLOS, P. **Progress in allergy**. Basel : S. Karger, 1962. Vol. 6, p. 30-154.
86. PAGANO, J., LEVIN, D., TREJO, W. Diagnostic medium for the differentiation of species of *Candida*. **Antibiot. Annu.**, New York, v. 6, p. 137-143, 1958.
87. PFALLER, M.A., HOUSTON, A., COFFMAN, S. Application of CHORMagar Candida for rapid sceening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 34, p. 58-61, 1996.
88. PINTER, L. *et al.* Production and use monoclonal antibodies to *Microsporum canis*. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 46, p. 435-444, 1995.
89. PITT, J.I., MILLER, M.W. The parasexual cycle in yeasts of the genus *Metschinokiwia*. **Mycologia**, Lancaster, v. 62, p. 462-473, 1970.

90. PONTON, J., JONES, J.M. Analysis of cell extracts of *Candida albicans* by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blot techniques. **Infect. Immun.**, Washington, v. 53, p. 565-572, 1986.
91. _____. *et al.* Characterization of *Candida albicans* cell wall antigens with monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, Washington, v. 61, p. 4842-4847, 1993.
92. QUINDÓS, G. *et al.* Colony morphotype on Sabouraud-triphenyltetrazolium agar: a simple and inexpensive method for *Candida* subspecies discrimination. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 30, p. 2748-2752, 1992.
93. _____. *et al.* Evaluation of Bichro-latex albicans, a new method for rapid identification of *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, p. 263-1265, 1997.
94. RINALDI, M.G. Biology and pathogenicity of *Candida* species. In: BODEY, G.P. (Ed.) **Candidiasis** : pathogenesis, diagnosis and treatment. 2nd ed. New York : Raven Press, 1993. p. 1-20.
95. ROCHELLE, S.L.A. **Influência do meio de cultura na extração de proteínas intracelulares de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade oral para aplicação em PAGE- SDS.** Piracicaba, 1996. 152p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.
96. ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia.** 5. ed. São Paulo : Atheneu, 1999. 423p.

97. ROSA, E.A.R. *et al.* A survey of methodologies for proteins extraction from intracellular components of *Candida* cells. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 76, p. 978, 1997. [Abstract]
98. RUSSEL, C., LAY, K.M. Natural history of *Candida* – espécies and yeasts in the oral cavities of infants. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 18, p. 957-962, 1973.
99. SALKIN, I.F. *et al.* Evaluation of yeastIdent and Uni-Yeast-Tek yeast identification systems. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 25, p. 625-627, 1987.
100. SAMARANAYAKE, L.P., MACFARLANE, T.W. **Oral candidosis.** Cambridge : Wright, 1990. 265p.
101. SANDULLA, J. Pathogenicity and Immunology. *In*: Ten years of activity in Czechoslovak Yeast research. Bratislava : Publishing House of the Slovak Academic of Science, 1974. p. 125-137.
102. SHECHTER, Y. Symposium on the use of electrophoresis in the taxonomy of algae and fungi. IV. Electrophoresis and taxonomy of medically important fungi. **Bull. Torrey Bot. Club.**, New York, v. 100, p. 277-287, 1973.
103. _____, LANDAU, J.W., DABROWA, N. Comparative electrophoresis and numerical taxonomy of some *Candida* species. **Mycologia**, Lancaster, v. 64, p. 841-853, 1972.
104. SHEPERD, M.G., POULTIER, R.T.M., SULLIVAN, P.A. *Candida albicans*: biology, genetic, and pathogenicity. **Ann. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 39, p. 579-614, 1985.

105. SNEATH, P.H.A., JOHNSON, R. The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests. **J. Gen. Microbiol.**, Cambridge, v. 72, p. 377-392, 1972.
106. _____, SOKAL, R.Q. **Numerical taxonomy.** San Francisco : Freeman, 1973. 482p.
107. STENDERUP, A. Oral mycology. **Acta Odontol. Scan.**, Oslo, v. 48, p. 3-10, 1990.
108. STUDIER, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slabs gels. **J. Molec. Biol.**, London, v. 79, p. 237-248, 1973.
109. SUMMER, D.F., GROLLMAN, A.P., HASENCLEVER, H.F. Polysaccharide antigens of *Candida* cell wall. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 92, p. 491-499, 1964.
110. SUZUKI, S., SUNAYAMA, H. Studies on the antigenic activities of yeasts. II. Isolation and inhibition assay of the oligosaccharides from acetolysate of the mannan of *C. albicans*. **Jpn J. Microbiol.**, Tokyo, v. 12, p. 413-422, 1968.
111. SYVERSON, R.E., BUCKLEY, H.R., CAMPBELL, C.C. Cytoplasmatic antigen technique of the mycelial on yeast phase of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 12, p. 1184-1188, 1975.
112. TANNER, A.C.R. *et al.* *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slowgrowing, fusiform *Bacteroides* sp. From the human oral cavity. **Int. J. Sys. Bact.**, Washington, v. 36, p. 213-221, 1986.

113. TASCHDJAN, C.L., BURCHALL, J.J., KOZINN, P.J. Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum substitutes. **Am. J. Dis. Child.**, Chicago, v. 99, p. 212-215, 1960.
114. _____, _____, _____. Serodiagnosis of *Candida* infections. **Am. J. Clin. Path.**, Baltimore, v. 57, p. 195-205, 1972.
115. TRAN VAN KY, P., BIGUET, J., ANDREU, S. Étude par électrophorèse et la double diffusion en gélose des substances antigéniques extréées dans le milieu de culture de *C. albicans*. **Saboraudia**, Oxford, v. 2, p. 164-170, 1963.
116. _____. *Et al.* Caractérisation de complexes enzymes-antienzymes genre *Candida* après immunoélectrophorégramme en agarose. **Mycophatologia**, Dordrecht, v. 38, p. 345-37, 1969.
117. TSUCHIYA, T. *et al.* Studies on the classification of the genus *Candida*. **Jpn J. Exp. Med.**, Tokyo, v. 25, p. 75-83, 1955.
118. VANCANNEYT, M. *et al.* Differentiation of yeast species based on electrophoretic whole-cell protein patterns. **Syst. Appl. Microbiol.**, Stuttgart, v. 14, p. 23-32, 1991.
119. _____. *Et al.* The application of whole-cell protein electrophoresis for the classification and identification of basidiomycetous yeast species. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 61, p. 69-78, 1992.
120. VENEZIA, R.A., ROBERTSON, R.G. Efficacy of the *Candida* precipitin test. Verification with a protoplast antigen preparation. **Am. J. Clin. Path.**, Philadelphia, v. 61, p. 849-855, 1974.

121. WALTER, M.G., BLOBEL, G. Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur posttranslationally and requires ATP hydrolysis. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 102, p. 1543-1550, 1986.
122. WINNER, H. I. The epidemiology of Candidosis. *In*: AL-DOORY, Y., **The epidemiology of human mycotic diseases**. Springfield, Charles C. Thomas, 1975. P. 152-182.

8 - APÊNDICE

1 - Meios de cultura

1.1 - Meio Completo para Leveduras (M.C.L.)

Peptona.....	10 g
Extrato de levedura.....	10 g
Glucose.....	20 g
Fosfato bibásico de potássio.....	0,5 g
ágar.....	20 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL

Todos os componentes foram adicionados a água destilada e levados à ebulição em banho maria. Fracionar-se-á alíquotas de 10 mL, em tubos de cultura que foram autoclavados a 120 °C, sob 1 atm, por 20 minutos. Os tubos foram inclinados enquanto o meio estiver liqüefeito.

1.2 - Yeast Peptone Dextrose (YPD)

Extrato de levedura.....	10 g
Peptona.....	20 g
Glucose.....	20 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL

Todos os componentes foram adicionados a água destilada, sob agitação. Uma vez dissolvidos os componentes, fracionar alíquotas de 50 mL, em Erlenmeyers e autoclavar sob as mesmas condições citadas em 1.1 do apêndice.

2 - Identificação dos coelhos

Os animais foram marcados com ácido pícrico 2% com a seguinte identificação:

Coelho n.º 1 - A₁

Coelho n.º 2 - A₂

Coelho n.º 3 - A₃

Coelho n.º 4 - A₄

3 - Soluções para as reações de ELISA

3.1 - Tampão Salina Fosfato (PBS)

NaCl.....	8 g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL
pH.....	7.3

3.2 - Tampão Bloqueio

Soro Albumina Bovina (BSA).....1 g
 PBS.....q.s.p. 100 mL

3.3 - Tampão PBS-T-G

Tween 20.....0,05 mL
 Gelatina.....0,25 mL
 PBS.....q.s.p. 100 mL

3.4 - Tampão OPD

Ácido Cítrico 0,4 M.....12,15 mL
 Na_2PO_4 0,4 M.....25,7 mL
 H_2O_2 30 Vol.....300 μL
 Água deionizada.....q.s.p. 200 mL
 pH.....5.3
 Deve ser guardado em frasco escuro.

3.5 - Solução “STOPPER” para OPD

H_2SO_4 2,5 M

3.6 - Tampão Tris-NaCl

Tris-Base 0,05 M.....8,55 g
 NaCl 0,15 M.....8,76 g
 Água deionizada.....q.s.p. 1000 mL
 pH.....8.2
 Acertar o pH com HCl 0,75 N.

3.7 - Tampão Tris-HCl

Trizma Base 1M.....121,14 g

pH.....9.0

O pH deve ser acertado com HCl concentrado.

3.8 - Tampão Glicina

Glicina 50 mM.....3,75 g.

NaCl 0,15 M.....8,76 g

Água deionizada.....q.s.p. 1000 mL

pH.....3.0

Acertar o pH com HCl 0,75 N.

4 - Soluções para a eletroforese SDS-PAGE:

4.1 - Tampão de amostra

Tris-HCl 0,5 M pH 6.8.....25 mL

SDS.....2g

Glicerol.....10 mL

2-mercaptoetanol.....5 mL

Solução de Azul de Bromofenol 0,1%.....1 mL

Água deionizada.....q.s.p.100 mL

4.2 - Soluções estoque para gel de SDS-PAGE

4.2.1 - Acrilamida

Acrilamida.....	30g
Bis-Acrilamida.....	0,8g
Água deionizada.....	q.s.p. 100 mL

Deve ser guardado em frasco escuro. Esta solução tem vida útil de duas semanas.

4.2.2 - Tampão “Lower”

Tris-HCl 1,5 M	90,8g
SDS.....	2g
Água deionizada.....	q.s.p. 1000 mL
pH	8.8

O pH deve ser ajustado com HCl concentrado.

4.2.3 - Tampão “Upper”

Tris-HCl 0,5 M	30,29g
SDS.....	2g
Água deionizada.....	q.s.p. 1000 mL
pH	6.8

O pH deve ser ajustado com HCl concentrado.

4.2.4 - Tampão de corrida 4x concentrado

Tris-base.....12g

Glicina.....57,6g

Água deionizada.....q.s.p. 1000 mL

Este tampão deve ser diluído 1:3 em água deionizada e acrescentado 1% de SDS para o uso.

4.3 - Solução de Persulfato de Amônio 10%

Persulfato de amônio.....0,1g

Água deionizada.....1 mL

5 - Gel separador a 12% de poliacrilamida

Acrilamida.....7,92 mL

Tampão “Lower”.....10 mL

Água Deionizada.....1,38 mL

TEMED.....15 µL

Persulfato de amônio 10%.....330 µL

6 - Gel empilhador a 4% de poliacrilamida

Acrilamida.....1,10 mL

Tampão “Upper”.....3,30 mL

Água deionizada.....1,80 mL

TEMED.....15 µL

Persulfato de amônio 10%.....200 µL

Todas as soluções preparadas foram mantidas em geladeira a 5 °C e o glutaraldeído a 25% a -21 °C.

Obs:TEMED (N, N, N¹,N¹-Tetrametil-etilenodiamina)

7 - Soluções para coloração do gel com prata

7.1 - Solução Fixadora

Etanol 96^o GL P. A.....400 mL
 Ácido Acético.....100 mL
 Água deionizada.....q.s.p. 1000 mL

Lavar rapidamente o gel com água deionizada após 12 horas

7.2 - Solução Incubadora

Tiosulfato de sódio.....1 g
 Acetato de Sódio 3 H₂O.....17 g
 Glutaraldeído 25 %.....1,3 mL
 Etanol 96^o GL P. A.....75 mL
 Água deionizada.....q.s.p. 250 mL

Incubar por 20 minutos. O glutaraldeído deve ser adicionado somente no momento do uso.

7.3 - Solução de Prata

Nitrato de Prata.....0,25 g
 Formaldeído.....50 µL
 Água deionizada.....q.s.p. 250 mL

O Formaldeído deve ser adicionado no momento do uso e incubar por 20 minutos. Lavar o gel com água deionizada após o tempo de incubação.

7.4 - Solução Reveladora

Carbonato de sódio.....6,25 g
 Formaldeído.....25µ L
 Água deionizada.....q.s.p. 250 mL

Deixar incubando em agitação, até o aparecimento das bandas.

7.5 - Solução “Stop”

EDTA 2 H₂O.....3,65 g

Água deionizada.....q.s.p. 250 mL

Incubar 5 a 10 minutos. É importante manter o volume de 250 mL para gel de 1 mm, pois a redução deste volume interfere na nitidez da coloração. Após incubação lavar o gel em água corrente por 1 hora.