

## Fatores de Virulência de *Candida albicans* Isoladas da Mucosa Oral de Pacientes HIV Positivo

### *Virulence Factors of Candida albicans Isolated from Oral Mucosa HIV-positive Patients*

Letícia Silveira Goulart<sup>1</sup>, Janaina Sousa de Lima<sup>2</sup>, Camila Aoyama Vieira<sup>2</sup>, Werika Weryanne Rosa de Souza<sup>2</sup>, Selma Vieira de Moura<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Doutora, Curso de Enfermagem, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, UFMT, Campus Rondonópolis; <sup>2</sup> Acadêmica, Curso de Enfermagem, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, UFMT, Campus Rondonópolis; <sup>3</sup> Enfermeira, Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, UFMT, Campus Cuiabá.

#### RESUMO

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi analisar a atividade de proteinase, fosfolipase e hemólise de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivo e avaliar a influência da terapia antirretroviral com inibidores de protease (IP) na produção enzimática. **Método:** Foram estudados vinte e cinco isolados de *C. albicans* obtidos de swabs orais de pacientes HIV positivo. Para analisar a produção de proteinase, fosfolipase e hemólise foram utilizados meios de cultura contendo albumina bovina, gema de ovo e sangue, respectivamente. **Resultados:** Dezenove (76%) isolados apresentaram atividade de proteinase. Todas as linhagens de *C. albicans* estudadas produziram fosfolipase e hemolisinas. Nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada na intensidade da atividade de exoenzimas em isolados de pacientes usando IP quando comparados com aqueles que não utilizam estes antivirais, sugerindo que os IP não reduzem *in vitro* a secreção destas enzimas por *C. albicans*. **Conclusão:** A elevada produção de proteinase, fosfolipase e hemolisinas evidencia o potencial poder patogênico destes isolados. **Descritores:** *Candida albicans*; Fatores de virulência; Inibidores de proteases.

#### ABSTRACT

*The aim of the study was to analyze the phospholipase, proteinase and hemolysis of Candida albicans isolated from the oral cavity of HIV positive individuals and to evaluate the influence of antiretroviral therapy with protease inhibitors (PI) on enzymatic production. Twenty five C. albicans isolates obtained from oral swabs of patients with HIV were studied. For testing the production of proteinase, phospholipase and hemolise, the culture media containing bovine albumin, egg yolk and blood were used, respectively. Nineteen (76%) of isolates showed proteinase activity. All C. albicans strains that were studied produced phospholipase and hemolysins. No statistically significant difference was found in the intensity of the activity of the exoenzymes in isolates from patients using PI in relation to those who did not use these antivirals, suggesting that PI not reduce in vitro the secretion of these enzymes by C. albicans. The high production of the proteinase, phospholipase and hemolysins evidences the potential pathogenic power of these isolates.*

**Descriptors:** *Candida albicans*; Virulence factors; Protease inhibitors.

---

Goulart LS, Lima JS, Vieira CA, Souza WWR, Moura SV.

## INTRODUÇÃO

*Candida albicans* é o principal fungo patogênico humano, dentre as infecções causadas por esta levedura destaca-se a candidíase oral<sup>1</sup>. A candidíase oral é a infecção oportunista mais frequentemente observada em indivíduos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV)<sup>2</sup>. A doença ocorre em aproximadamente 90% destes pacientes durante o curso da infecção e é considerada um importante marcador para a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)<sup>3</sup>. As leveduras do gênero *Candida* são altamente adaptadas e especializadas para sobreviverem nas superfícies do hospedeiro. Infecções endógenas por *C. albicans* são estabelecidas por células que colonizam mucosas como comensais e que desencadeiam um processo infeccioso diante de alterações do sistema imune ou da microbiota do hospedeiro<sup>4</sup>. *C. albicans* apresenta uma ampla variedade de atributos de virulência como expressão de adesinas, adaptação ao estresse, flexibilidade metabólica, formação de biofilme, polimorfismo, secreção de enzimas hidrolíticas como proteinases, fosfolipases e hemolisinas, dentre outros<sup>5,6</sup>.

As proteinases produzidas por *C. albicans* são reguladas por uma família composta por 10 genes (*SAP1-10*), estas enzimas possuem atividade proteolítica, degradando colágeno, queratina e peptídeos localizados na superfície de mucosas e podem, ainda, atuar sobre componentes do sistema imunológico, como imunoglobulinas, complemento e citocinas, facilitando a invasão das leveduras aos tecidos do hospedeiro e evasão ao sistema imune<sup>7</sup>. Quatro tipos de

fosfolipase foram reportados em *C. albicans*, mas somente os produtos dos genes *PLB1* e *PLB2* foram detectados extracelularmente. A secreção de fosfolipase é afetada por fatores nutricionais, condições do ambiente (temperatura e pH) e fase de crescimento da levedura. Fosfolípidios presentes na membrana das células humanas e animais são os substratos para esta enzima<sup>8</sup>. A capacidade de utilizar hemoglobina como fonte de ferro é descrita como uma estratégia de *C. albicans* para explorar o ferro elementar do hospedeiro. A atividade hemolítica expressa a capacidade fúngica em destruir as hemácias com a finalidade de obter ferro, sendo essa propriedade conferida por hemolisinas<sup>9</sup>.

Esquemas combinados de fármacos compõem a terapia antiviral para a infecção pelo HIV, incluindo os inibidores da protease (IP), Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (ITRN) e Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeos (ITRNN)<sup>10</sup>. A utilização de IP reduziu a frequência de infecções oportunistas, especialmente a candidíase<sup>11</sup>. A atenuação das infecções por espécies de *Candida* não é resultado somente da melhora na imunidade do paciente, mas também, como uma consequência da inibição direta de aspartil proteases secretórias (Saps) da levedura, com predileção por Saps 1-3, interferindo em processos de metabolismo, proliferação e morfogênese celular<sup>12</sup>.

As interações entre superfícies mucosas e microbiota são a chave para os processos de saúde e doença, desta forma, o conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos na patogênese da

candidíase pode favorecer a compreensão dos fatores que levam a colonização e infecção. Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a produção de proteinase, fosfolipase e hemolisinas por *C. albicans* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivo e analisar se o uso de terapia antiviral com IP influencia nesta atividade enzimática.

## MÉTODO

### Micro-organismos estudados

Foram analisadas 25 amostras de *C. albicans* isoladas da mucosa oral de pacientes HIV/AIDS assintomáticos para candidíase oral acompanhados em um Serviço de Saúde Especializado do Município de Rondonópolis, MT. Os dados relativos ao tipo de terapia antirretroviral utilizada pelos pacientes foram obtidos dos prontuários médicos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Julio Muller/UFMT sob o n°: 749.382 e todos os participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo informados dos objetivos do estudo.

Os *swabs* orais foram semeados em ágar Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol e em meio cromogênico CHROMagar e incubados a 37°C por 48h. A espécie dos isolados foi confirmada por PCR espécie-específico, através da metodologia proposta por Liguori e colaboradores<sup>13</sup> com algumas modificações. O DNA das amostras foi extraído a partir de culturas fúngicas recentemente repicadas, utilizando um *kit* de extração de DNA (Mobio, Carlsbad, CA, USA). A reação de PCR foi realizada para um volume total de 25 µL, contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM de dNTP (0,2 mM cada), 3,2 mM primers, Taq DNA polymerase (1,25 U). Os oligonucleotídeos foram CA

(*C. albicans*, 5'- TCA ACT TGTCAC AGA TTA TT-3') e ITS4 (5'- TCC TCCGCT TAT TGA TAT GC-3'). As reações de amplificação foram como segue: desnaturação inicial 92°C, 2 min; 35 ciclos de desnaturação (95°C, 1 min), anelamento (50°C, 1 min), extensão (72°C, 1 min); e extensão final, 72°C, 10 min.

### Atividade enzimática

Colônias de cada levedura foram suspensas em água destilada estéril e o inóculo ajustado para o tubo 1 da escala de Mac-Farland, volumes de 10 µL de cada suspensão foram depositadas em pontos equidistantes de placas de Petri contendo os respectivos meios de cultura: ágar proteinase, ágar fosfolipase e ágar sangue. As placas foram incubadas a 30 °C por cinco dias para os testes de proteinase e fosfolipase e 48h para análise da atividade hemolítica<sup>14</sup>.

Os testes foram realizados em triplicata e a interpretação e a descrição dos resultados seguiram o modelo proposto por Price et al<sup>15</sup>. Atividade de proteinase foi caracterizada pela presença de um halo claro ao redor da colônia, atividade de fosfolipase pela formação de um halo opaco ao redor da colônia e atividade hemolítica pela identificação de halo de hemólise. A atividade enzimática foi expressa em PZ, sendo medida pela razão do diâmetro da colônia pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação/lise. Os isolados foram classificados como atividade enzimática negativa (Pz=1), atividade enzimática moderada (0,63 < Pz < 1) e atividade enzimática fortemente positiva (Pz ≤ 0,63).

### Análise estatística

O teste de Mann-Whitney foi aplicado para avaliar se o uso de terapia antirretroviral com IP poderia interferir na atividade enzimática dos isolados de *C. albicans*. Os dados foram avaliados pelo

programa Epi Info 7.2.0.1., sendo adotado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Os ensaios de proteinase revelaram que 76% (19/25) das linhagens orais de *C. albicans* foram produtoras desta enzima, com atividade moderada. Todas as amostras estudadas apresentaram atividade de fosfolipase e 92% (23/25) foram caracterizadas como fortemente produtoras. Uma frequência

de 100% (25/25) dos isolados evidenciou propriedade de hemólise, sendo a maioria (96%; 24/25) com atividade moderada.

Das 25 linhagens orais de *C. albicans* estudadas, 17 (68%) foram isoladas de pacientes sob tratamento antirretroviral com IP. Não encontramos diferença estatística ao compararmos a atividade de proteinase, fosfolipase e hemólise entre o grupo de pacientes que fazem uso de IP e aqueles que não utilizam este regime terapêutico (Tabela 1).

Tabela 1: Correlação entre terapia antiviral com IP e atividade enzimática em *C. albicans* isoladas da mucosa oral de pacientes HIV positivo. (n=25)

Enzima	Terapia Antiviral (n)	Atividade Enzimática n (%)	Valor de Pz Média ±(DP)	Valor de p*
Proteinase	IP (17)	12 (70,0)	0,81± (0,11)	0,363
	Outros (8)	7 (87,5)	0,77±(0,11)	
Fosfolipase	IP (17)	17 (100)	0,52±(0,07)	0,771
	Outros (8)	8 (100)	0,52± (0,11)	
Hemolisina	IP (17)	17 (100)	0,75±(0,07)	0,115
	Outros (8)	8 (100)	0,69± (0,05)	

IP: Inibidores de protease; DP: desvio padrão; \* Teste de Mann-Whitney

## DISCUSSÃO

Os micro-organismos expressam mecanismos que permitem a colonização ou infecção no hospedeiro e neste contexto, muitos patógenos incluindo *Candida*, apresentam uma série de estratégias específicas para colonizar, causar a doença e superar as defesas de hospedeiros suscetíveis<sup>16</sup>. As leveduras secretam enzimas extracelulares que destroem as membranas celulares do hospedeiro, favorecendo posterior invasão tecidual, as principais enzimas

produzidas tanto por *C. albicans* quanto não *albicans* são as proteinases e fosfolipases<sup>5</sup>.

A frequência de atividade proteolítica em isolados clínicos de *C. albicans* varia de 27% a 97%<sup>14,17,18,19</sup>. A variabilidade na expressão de fatores de virulência entre *Candida* spp., pode ser resultante de fatores como origem dos isolados, variabilidade fenotípica de certas linhagens e variações na metodologia utilizada<sup>20</sup>. No presente estudo, 76% dos isolados orais de *C. albicans* foram

produtores de proteinase. Resultado semelhante foi observado por Negri e colaboradores<sup>21</sup> que evidenciaram uma frequência de 75% de atividade de proteinase em *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivo com colonização oral para esta levedura. Owotade et al.,<sup>22</sup> avaliaram os fatores de virulência em espécies de *Candida* isoladas da cavidade oral de mulheres HIV positivo com e sem candidíase e caracterizaram 73% das amostras como produtoras de proteinase.

Atividade de fosfolipase foi detectada em todas as linhagens estudadas, corroborando com os achados de outros autores<sup>18,23,24</sup>. A produção de fosfolipase é um importante fator de virulência para *C. albicans* e está presente na maioria das leveduras isoladas da mucosa oral de pacientes HIV positivo sendo descritas frequências de 80%<sup>22</sup>, 91,6%<sup>25</sup> e 93%<sup>26</sup> nestas amostras. Alguns estudos têm evidenciado uma diferença significativa entre a produção de fosfolipase em *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivo e indivíduos sem infecção pelo vírus, sendo atribuída uma maior produção enzimática no grupo de imunossuprimidos<sup>14,26,27</sup>.

O elemento inorgânico ferro é indispensável no desenvolvimento dos micro-organismos em geral, inclusive das leveduras, e a obtenção desse elemento é essencial para o estabelecimento de um processo infeccioso<sup>16</sup>. As hemolisinas destroem os eritrócitos, estando relacionadas à aquisição de Ferro, além de desenvolverem uma importante função na virulência de *C. albicans*<sup>28</sup>. Nesta pesquisa a atividade hemolítica foi detectada em todos os isolados estudados. Resultados semelhantes foram descritos na literatura, em que 100% das leveduras isoladas de pacientes HIV positivo apresentaram halo de hemólise<sup>14,29,30</sup>. Evidenciamos que todos os isolados de *C. albicans* analisados neste estudo foram produtores de

fosfolipase e hemolisina, indicando o elevado potencial patogênico das linhagens orais de *C. albicans*. Estes achados são similares ao reportado por Tsang et al.,<sup>31</sup> os quais avaliaram a atividade enzimática em leveduras isoladas da mucosa oral de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2. Todos os isolados de *C. albicans* produziram fosfolipase e hemolisina. Riceto et al.<sup>18</sup> investigaram a produção *in vitro* de fatores de virulência em isolados clínicos de *Candida* spp. e identificaram que todas as amostras caracterizadas como *C. albicans* foram positivas para fosfolipase e hemólise.

A introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (*Highly Active Antiretroviral Therapy* - HAART) para HIV reduziu drasticamente a prevalência de candidíase oral, levando à hipótese de que os inibidores da proteinase viral podem também inibir as proteases aspárticas de *Candida* spp. e consequentemente prevenir ou reduzir as infecções fúngicas<sup>11</sup>. Na presente investigação não encontramos associação entre atividade enzimática e uso de IP, é necessário considerar que esta é uma avaliação inicial e que análises futuras utilizando um maior número de isolados clínicos devem ser realizadas, todavia, este resultado foi confirmado por pesquisas prévias<sup>16,27,32</sup>. Não está claro por que razão uma mesma linhagem de *C. albicans* poderia produzir SAP *in vitro*, quando isolada de sujeitos em tratamento com IP, ou seja, em uma situação em que a produção de SAP é inibida *in vivo*<sup>32</sup>.

Um estudo americano que avaliou o efeito da terapia antirretroviral sob a prevalência e atividade de SAPs em *C. albicans* isoladas da mucosa oral de pacientes HIV, não observou diferença na produção de proteinase entre os isolados de pacientes tratados com IP em relação aqueles com inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeo<sup>32</sup>. Menezes e

colaboradores<sup>16</sup> não encontraram diferença estatística na atividade das exoenzimas proteinase, fosfolipase e hemolisina de acordo com o tipo de HAART utilizado pelos pacientes. A produção de protease foi mais evidente entre os sujeitos recebendo HAART, particularmente inibidores da transcriptase associado a IP, contrariando a hipótese de que IP podem reduzir a expressão de proteinases produzidas por *Candida* spp. Os autores sugerem que talvez a razão para os antirretrovirais não inibirem a expressão enzimática seja o fato de que diferentes classes de proteinases

podem estar sendo expressas pelos isolados estudados, e que talvez os antivirais não estejam agindo sobre algumas destas enzimas.

## CONCLUSÃO

As linhagens orais de *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivo evidenciaram uma alta frequência de atividade enzimática, sendo que, todas foram produtoras de fosfolipase e hemolisinas, indicando uma elevada patogenicidade destas leveduras. O uso de terapia antirretroviral com IP não interferiu na produção de exoenzimas *in vitro* por *C. albicans*.

## REFERÊNCIAS

1. Cassone A, Cauda R. *Candida* and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders. *AIDS*. 2012; 26: 1457-1472.
2. Gonçalves LS, Gonçalves BM, Fontes TV. Periodontal disease in HIV-infected adults in the HAART era: Clinical, immunological, and microbiological aspects. *Arch Oral Biol*. 2013;58(10):1385-96.
3. Fidel PL. *Candida*-host interactions in HIV disease: implications for oropharyngeal candidiasis. *Adv Dent Res*. 2011;23(1):45-49.
4. Filler SG. Insights from human studies into the host defense against candidiasis. *Cytokine*. 2012; 58(1):129-32.
5. De Rossi T, Lozovoy MAB, Silva RV, Fernandes EV, Geraldino TH, Costa IC, et al. Interações entre *C. albicans* e hospedeiro. *Semin: Cien Biol Saúde*. 2011;32(1):15-28.
6. Melo IA, Guerra RC. Candidíase oral: um enfoque sobre a estomatite por prótese. *Salusvita*. 2014; 33(3): 389-414.
7. Aoki W, Kitahara N, Miura N, Morisaka H, Yamamoto Y, Kuroda K, et al. Comprehensive characterization of secreted aspartic proteases encoded by a virulence gene family in *Candida albicans*. *J Biochem*. 2011;150(4):431-8.
8. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;3(1):122-43.
9. Favero D, Furlaneto-Maia L, França EJ, Góes HP, Furlaneto MC. Haemolytic factor production by clinical isolates of *Candida* species. *Current Microbiol*. 2014; 68(2), 161-166
10. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA MANEJO DA INFECÇÃO PELO HIV EM ADULTOS. [Internet]. Brasília: MS; 2013. Acesso em: 20 ago 2016.

- Disponível em: [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55308/protocolo\\_13\\_3\\_2014\\_pdf\\_28003.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55308/protocolo_13_3_2014_pdf_28003.pdf)
11. Mastrolorenzo A, Rusconi S, Scozzafava A, Barbaro G, Supuran CT. Inhibitors of HIV-1 Protease: Current state of the art 10 years after their introduction from antiretroviral drugs to antifungal, antibacterial and antitumor agents based on aspartic protease inhibitors. *Curr Med Chem.* 2007;14:2734-2748.
  12. Santos ALS, Braga-Silva LA. Aspartic Protease Inhibitors: Effective Drugs against the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Mini-Rev Med Chem.* 2013; 13, 155-162.
  13. Liguori G, Di Onofrio V, Gallé F, Lucariello A, Albano L, Catania MR, et al. *Candida albicans* identification: comparison among nine phenotypic systems and a multiplex PCR. *J Prev Med Hyg.* 2010; 51(3):121-4.
  14. Menezes RP, Riceto EBM, Borges AS, Röder DVDB, Santos Pedroso RS. Evaluation of virulence factors of *Candida albicans* isolated from HIV-positive individuals using HAART. *Arch Oral Biol.* 2016;66:61-5
  15. Price MF, Wilkinson ID., Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982; 20(1), 7–14.
  16. Giolo MP, Svidzinski TIE. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. *J Bras Patol Med Labor.* 2010;46(3), 225–234.
  17. Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F, Rojas-Herrera RA. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(2):137-40
  18. Riceto, E. B., Menezes, R. P., Penatti, M. P., & Pedroso, R. S. Enzymatic and haemolytic activity in different *Candida* species. *Rev Iber Micol.* 2015;32(2), 79–82.
  19. Andreola P, Demathé A, Galafassi D, Elsemann EB, Elsemann RB, Gazzoni AF. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. *Rev Odontol UNESP.* 2016; 45(4): 219-226.
  20. Sanitá PV, Zago CE, Mima EG, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE. In vitro evaluation of the enzymatic activity profile of non-albicans *Candida* species isolated from patients with oral candidiasis with or without diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;118(1):84-91
  21. Negri MF, Faria MG, Guilhermetti E, Alves AA, Paula CR, Svidzinski TIE. Hemolytic activity and production of germ tubes related to pathogenic potential of clinical isolates of *Candida albicans*. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.,* 2010;31(1):89-93.
  22. Owotade FJ, Patel M, Ralephenya TRMD, Vergotine G. Oral *Candida* colonization in HIV positive women: associated factors and changes with antiretroviral therapy. *J Med Microbiol.* 2013;62(1):126-32.
  23. Mahmoudabadi AZ, Zarrin M, Miry S. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from vagina and urine samples. *Jund J Microbiol.* 2010; 3(4), 169–173.
  24. Junqueira JC, Vilela SF, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa AC, Rasteiro VM. Oral colonisation by yeasts in HIV-

- positive patients in Brazil. *Rev Ins Med Trop Sao Paulo*. 2012; 54(1): 17–24.
25. Hartmann A, Missio R, Hammad MP, Alves IA. Incidência de *Candida* spp. na mucosa oral de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no município de Santo Ângelo -RS. *Rev Epidemiol Control Infec*. [Internet] 2016; 6(3). Acesso em: 20 jan 2017. Disponível em: <<https://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/view/6556>>.
26. Castelo Branco PV, Anjos DCV, Nascimento FB, Vale INF, Azevedo CMPS, Monteiro SG, et al. Prevalência e Produção de Exoenzimas por Espécies de *Candida* Provenientes da Mucosa Bucal de Pacientes com AIDS e Indivíduos Hígidos. *Rev Patol Trop*. 2012; 41 (4): 427-41.
27. Back-Brito GN, El Ackhar VN, Garbim AL, Romeiro RL, Jorge AOC, Balducci I, et al. HAART therapy does not reduce the proteinase and phospholipase secretion by oral *Candida albicans* isolated from HIV-positive patients. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2011;70(2):101-5.
28. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 1):10-24.
29. Ramesh N, Priyadharsini M, Sumathi CS, Balasubramanian V, Hemapriya J, Kannan R. Virulence factors and anti fungal sensitivity pattern of *Candida* sp. isolated from HIV and TB patients. *Indian J Microbiol*. 2011;51(3):273-8.
30. Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SFG, Jorge AOC, Junqueira JC. Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-*albicans Candida* species. *Braz Oral Res*. 2013;27(6):484-9.
31. Tsang CS, Chu FC, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol*. 2007; 56(10), 1393–1398.
32. De Bernadis F, Tacconelli E, Mondello F, Cataldo A, Arancia S, Cauda R, et al. Antiretroviral therapy with protease inhibitors decreases virulence enzyme expression in vivo by *Candida albicans* without selection of virulent fungus strains or decreasing their antimycotic susceptibility. *FEMS Immun Med Microbiol*. 2004; 41, 27–34.