

Métodos labororiais de identificação do fungo *Candida sp*

Laboratorial methods for identifying Candida sp

Nadiesca Maria Lazzari Miotto¹

Liliane Soares Yurgel²

Karen Cherubini³

Ricardo Flores Cazanova⁴

Resumo

A candidíase bucal adquiriu maior importância após a disseminação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a cronificação da Aids. O aumento da população de idosos, associado aos avanços da ciência na área da saúde, e o amplo uso de terapias imunossupressoras também contribuíram para a maior incidência dessa infecção. O presente estudo teve por objetivo fazer uma revisão da literatura sobre os métodos labororiais para identificação dos fungos causadores da candidíase bucal. Tais métodos baseiam-se em características morfológicas do agente infectoso, em seu comportamento bioquímico e em sua estrutura antígenica. Os laboratórios devem contar com metodologia diagnóstica simples, atualizada e objetiva, acompanhando o período de rápido crescimento da micologia, já que os fungos podem ser utilizados como modelos para o esclarecimento de processos moleculares e genéticos comuns a todos os seres vivos.

Palavras-chave: *Candida sp*, candidíase bucal, métodos diagnósticos.

Introdução

Generalidades

Por apresentarem características diferentes dos vegetais, a partir de 1969, os fungos foram classificados num reino próprio – *Fungi*. Esses seres vivos não sintetizam clorofila nem apresentam celulose na parede celular, assim como não formam um tecido verdadeiro, nem armazenam amido. Apresentam, ainda, características de células animais, como reserva de glicogênio, e têm características exclusivas, como a dicariofase, isto é, apresentam dois núcleos haplóides sexualmente opostos (MOURA, 1999). Os fungos podem originar-se de uma única célula ou de um fragmento da hifa, e sua estrutura, principalmente a parede celular, é de grande auxílio na taxonomia (TRABULSI et al., 1999).

As leveduras são os únicos fungos da microbiota bucal nativa e, pelo menos, 25 gêneros e 167 espécies já foram isoladas no homem (STENDERUP, 1990). Determinadas cepas de *Candida sp* têm propriedades específicas que favore-

cem a colonização; a invasão no hospedeiro pode chegar aos tecidos musculares profundos (ZAITZ et al., 1998; LACAZ et al., 1998).

A *Candida sp* é um fungo dimórfico que pode se apresentar como leveduras esféricas ou na forma alongada, denominada “hifa”. Ambas as apresentações são capazes de causar a candidíase bucal, embora sejam encontradas juntas e cada forma possa estar associada com saúde ou doença. Nos estágios iniciais da infecção, a formação de hifas pode promover a aderência e a penetração do fungo nos tecidos do hospedeiro (OLSEN, 1990b; SWEET, 1997). Com o conhecimento de que as várias espécies de *Candida sp* diferem na produção de supostos fatores de virulência e na sensibilidade aos anti-fúngicos, grandes esforços vêm sendo feitos para sua identificação e isolamento (WILLIAMS e LEWIS, 2000). Algumas outras espécies já descritas são *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. stellatoidea* (NEVES, 2001). Também já foram referidas as espécies *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondi* (REGEZI e

¹ Aluna do Programa de Doutorado em Estomatologia Clínica da PUCRS.

² Doutora em Estomatologia Clínica pela PUCRS; coordenadora do curso de doutorado em Estomatologia Clínica da PUCRS.

³ Doutora em Estomatologia Clínica pela PUCRS; professora do curso de doutorado em Estomatologia Clínica da PUCRS.

⁴ Aluno da Faculdade de Química, PUCRS.

Recebido em: 29-04-2003 / aceito em: 20-07-03

SCIUBBA, 1991). A espécie *dublinensis*, que se caracteriza por relacionar-se à alta carga do HIV, à rapidez da progressão da Aids e a simultâneas doenças bucais, como alto índice de cárie e doença periodontal, foi descrita por Sullivan et al. em 1995. A candidíase sistêmica é relatada entre 20% e 40% dos pacientes com câncer e em aproximadamente 25% dos pacientes submetidos a transplantes de medula óssea (TRABULSI et al., 1999). Dos fungos do gênero *Candida sp*, a espécie *albicans* é a mais prevalente na cavidade oral e a mais patogênica (SWEET, 1997; Neville et al., 1998).

Técnicas laboratoriais de identificação de *Candida sp*

A multiplicidade dos fungos e as diferenças em seu comportamento fazem com que alguns sejam facilmente identificáveis nas preparações a fresco, porém outros requerem o emprego de vários métodos laboratoriais de identificação (MOURA, 1999). A maioria dos procedimentos laboratoriais disponíveis para identificação do fungo *Candida sp* consiste na observação das suas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (MURRAY et al., 2000). Os exames micológicos apresentam uma seqüência clássica constituída por exame direto (a fresco), cultivo do material em meios apropriados, provas bioquímicas, provas de virulência e sorológicas (MOURA, 1999). Para o isolamento do fungo *Candida sp*, podem ser analisadas amostras obtidas de raspagens de pele e unhas, urina, material purulento, aspirados, escarro, secreções brônquicas, sangue, swabs orais ou vaginais e tecidos. A eleição do sítio de coleta pode constituir a etapa mais importante no diagnóstico, devendo ser escolhido o local que apresentar a lesão mais característica e, provavelmente, a

maior concentração do agente causal (JAWETZ et al., 1998). As amostras devem ser processadas o mais rápido possível, com técnica acurada e de acordo com as normas universais de biossegurança (MARSHALL, 1995).

Exame direto (a fresco)

O exame microscópico direto do material clínico é uma técnica simples, de baixo custo, rápida, sensível, eficaz e reproduzível, que permite a visualização do fungo e sua identificação imediata por profissional técnico treinado. A vantagem do método direto é o fato de as preparações não serem duradouras (TRABULSI et al., 1999).

Essa técnica é útil em micoses cutâneas, subcutâneas e sistêmicas, bastando colocar o material coletado numa lâmina de vidro, adicionando hidróxido de potássio (KOH) a 10-20% com tinta Parker 51 permanente na proporção de 2:1. Cobre-se, então, com lamínula e aquece-se ligeiramente ao bico de Bunsen (VERONESI e FOCACCIA, 1996; TRABULSI et al., 1999). O KOH a 10% é utilizado para dissolver o material proteináceo, facilitando a detecção de elementos fúngicos que não são afetados pela solução alcalina forte (MURRAY et al., 2000). Nos esfregaços de exsudato, a *Candida* aparece como uma levedura gram-positiva oval, com brotamento em cadeias (pseudohifas), medindo 2 a 3 μm por 4 a 6 μm (JAWETZ et al., 1998).

Cultura

Os meios de cultura de uso laboratorial são elaborados de acordo com as características biológicas e metabólicas do microorganismo em estudo. Devem conter substâncias essenciais para sua reprodução e garantir seu crescimento, mesmo tendo sido coletado um pequeno inóculo. Após preparados, os meios de cultura devem conter água destilada, reagentes químicos isentos de contaminação, ágar e peptonas bacteriológicas cuidadosamente selecionadas (MOURA,

1999). O crescimento de *Candida sp* em meios de cultura é fácil e rápido (FERREIRA e ÁVILA, 2001). A inoculação dos meios de cultura pode ser feita por encharcamento, pipeta, alça de platina, swab ou implantação (MARSHALL, 1995). Os meios de cultura classificam-se em: enriquecidos, com sangue, soro ou outros nutrientes; seletivos, que inibem alguns e favorecem outros microrganismos, e os diferenciais, que separam vários microrganismos dependentes de certos nutrientes. Os meios diferenciais podem ser também seletivos. Existem, ainda, os meios de transporte, utilizados quando as amostras não podem ser semeadas imediatamente (MOURA, 1999).

O meio ágar Sabouraud dextrose a 4% apresenta pH ácido de 5,8 e alta tensão osmótica pelo teor de glicose, que é seletivo para fungos, porém não impede completamente a proliferação de bactérias. Consegue-se um meio impeditivo para bactérias adicionando cloranfenicol (0,2 mg por mL), um antibiótico que pode ser autoclavado e tem amplo espectro de ação (Fig. 1). A ciclo-hexamida (actidione) na concentração de 0,5 mg por mL, quando incorporada ao meio, impede o desenvolvimento de fungos não patogênicos de crescimento rápido, que podem contaminá-lo (KONEMAN et al., 1997; TRABULSI et al., 1999).

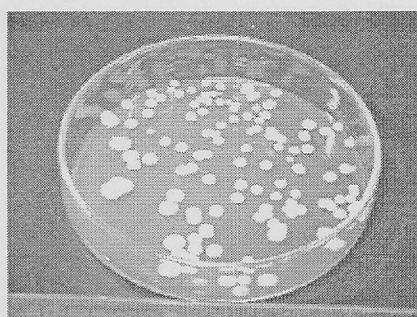


Figura 1 – Cultura de *Candida albicans* em meio ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol

Após coleta de material e semeadura em meio de cultura, obedecendo-se às normas de biossegurança, é obtida a cultura primária

do agente etiológico, que, nos cultivos micóticos, somente será considerada negativa após quatro semanas de ausência de crescimento, na temperatura de 25 °C a 30 °C (KONEMAN et al., 1997). Essa cultura primária deverá ser repassada para um novo meio de cultura, por repique com alça de platina, com o objetivo de aumentar sua viabilidade e mantê-la na fase logarítmica de crescimento com novos nutrientes. Em caso de dúvida, deve-se executar isolamento e identificação de todas as colônias até a definição do possível agente etiológico (VERONESI e FOCACCIA, 1996; FERREIRA e ÁVILA, 2001).

Vários testes são utilizados para a identificação das leveduras, como avaliação de aspectos morfológicos macro e microscópicos, prova de tubo germinativo, filamentoção em ágar-fubá *Tween* 80, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, presença de certas enzimas, como urease e fenol-oxidase, e formação de ascósporos (FERREIRA e ÁVILA, 2001).

Na cultura por técnica de impressão, usa-se um pedaço de esponja de 2 cm por 2 cm, embebido em água com peptona, para entrar em contato com uma superfície predeterminada da mucosa bucal, durante 30 segundos. Após isso, a esponja é colocada diretamente no meio Pagano-Levin ou ágar Sabouraud e o crescimento da *Candida sp* é quantificado (OLSEN e STENDERUP, 1990).

Aspectos morfológicos da colônia

As provas para diferenciação das várias cepas isoladas podem incluir a morfotipagem pela análise das franjas e da topografia das colônias (ZAITZ et al., 1998).

Aspectos macroscópicos

Após 24 horas da semeadura em meio de cultura, a *Candida albicans* aparece como minúsculos pontos e, em 48 horas (Fig. 2), surgem as colônias de cor creme, lisas e brilhantes, com consistência mole e odor de le-

vedo (MARSHALL, 1995; JAWETZ et al., 1998; LACAZ et al., 1998).

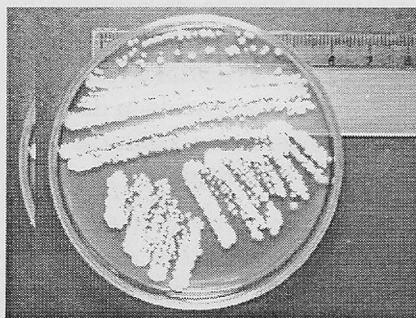


Figura 2 – Cultura de *Candida albicans*

Aspectos microscópicos

- *Cultivo em lâmina:* a semeadura em duas linhas paralelas é feita diretamente no ágar derramado sobre lâmina de microscopia. O cultivo em lâmina é recoberto por lamínula e colocado em câmara úmida em condições de assepsia. O fungo *Candida albicans* permite a identificação de gênero e espécie já pelo cultivo em lâmina, pois a presença de hifas verdadeiras e clamidósporos típicos, redondos e terminais, além de intercalares, lhe é peculiar (FERREIRA e ÁVILA, 2001).
- *Prova de tubo germinativo ou efeito Reynolds-Braude:* é o método laboratorial padrão para identificação de *Candida albicans* (WILLIAMS e LEWIS, 2000). É executado suspendendo-se uma pequena porção de uma colônia isolada da cultura num tubo de prova com 0,5 mL de soro humano ou animal. Essa prova é utilizada para *C. albicans* por ser um procedimento rápido e capaz de produzir tubo germinativo no período de duas a três horas, à temperatura de 37 °C. Coloca-se uma gota da suspensão soro-levedura em uma lâmina, cobrindo-se com lamínula, e observa-se ao microscópio (KONEMAN et al., 1997). O teste terá resultado positivo quando aparecerem blastósporos de globosos a ovais, apresentando tubos germinativos (MOURA, 1999). O tubo germinativo da *Candida albicans* é uma extensão filamentosa de uma única célula e tem sido descrito como um tubo sem constrição na sua origem, o que o diferencia da *C. tropicalis* (KONEMAN et al., 1997). O teste é limitado por sua baixa especificidade e alta interferência de contaminações bacterianas (SANDVEN, 1990; FERREIRA e ÁVILA, 2001).
- *Filamentação em ágar-fubá Tween 80:* a filamentação de leveduras em pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, bem como a habilidade de formar clamidósporos, é avaliada à temperatura ambiente por três dias, em ágar-fubá, com *Tween* 80, que é agregado ao meio de cultura para reduzir a tensão superficial (fubá: 40g; ágar: 20 g; polissorbato 80 ou *Tween* 80: 10 mL; água destilada q.s.p.: 1000 mL; pH final 6,6 a 6,8) (SANDVEN, 1990; KONEMAN et al., 1997; TRABULSI et al., 1999; FERREIRA e ÁVILA, 2001). As colônias típicas apresentam pseudomicélios em brotamento (JAWETZ et al., 1998). Hifas e pseudo-hifas com aglomerados de blastoconídios são também encontradas (LACAZ et al., 1998).
- *Imunofluorescência:* é uma técnica sofisticada que requer material e aparelhagem específicos. Pode ser recomendada para a verificação de alguns fungos, como a *Candida albicans*, em cortes de tecidos e em secreções e para serem diferenciados de outros fungos morfológicamente semelhantes (LACAZ et al., 1998; TRABULSI et al., 1999). Esta técnica pode ser necessária em formas da candidíase nas quais não se evidenciam colô-

- nias clinicamente, em especial na forma atrófica crônica (REGEZI e SCIUBBA, 1991).
- **Pesquisa de antígenos circulantes:** foram obtidos resultados satisfatórios para o diagnóstico de certas infecções por *Candida albicans* através da pesquisa de antígenos circulantes. As candidíases sistêmicas podem ser diagnosticadas pela pesquisa de ácidos orgânicos por cromatografia gasosa (TRABULSI et al., 1999).
 - **Pesquisa de anticorpos séricos:** pode ser feita pelas técnicas de fixação de complemento e de imunodifusão, que estão indicadas quando o exame microscópico direto e a cultura não identificarem o fungo. Outras técnicas, como Elisa e Western-Blot, têm sido utilizadas em razão de sua sensibilidade (TRABULSI et al., 1999; MORAGUES et al., 2001).
 - **CHROMagar Candida** (CA; CHROMagar, Paris, França): é um meio diferencial e cromogênico que, entre populações mistas, pode identificar espécies de *Candida sp.* Após 24 a 48 h de incubação, surgem colônias coloridas por enzimas espécie-específicas. As colônias verdes indicam *C. albicans* (NIIMI, SHEPHERD, CANNON, 2001; BAUTERS e NELIS, 2002; GEE et al., 2002).
- 2001). A atividade bioquímica dos fungos é estudada para a identificação de espécies de *Candida sp.*, utilizando-se o método de auxanograma, que indica a capacidade de o microorganismo assimilar carbono e nitrogênio.
- **Nitrato:** a prova de assimilação de nitrato é usada frequentemente como triagem, especialmente para *Candida sp.*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula* (FERREIRA e ÁVILA, 2001).
 - **Carboidratos:** a fermentação de carboidratos, juntamente com as características morfológicas de suas colônias, diferencia a *Candida albicans* de outras espécies. Este teste é utilizado para avaliar a capacidade de o organismo usar um composto específico anaerobicamente. O teste envolve a inoculação de vários tubos contendo o meio basal e um carboidrato a ser avaliado. Após cinco ou mais dias de incubação, os tubos são avaliados quanto à produção de gás (JAWETZ et al., 1998; FERREIRA e ÁVILA, 2001).
 - **Urease:** este teste é importante para a identificação de leveduras do grupo dos basidiomicetos. Algumas espécies, como a *Candida krusei*, são urease-positivas, ou seja, têm a habilidade de romper a molécula de uréia, produzindo uma reação alcalina, porém a maioria das leveduras de interesse médico é urease-negativa (SANDVEN, 1990). Dois tipos de teste podem ser feitos: alcalinização de ágar-uréia de Christensen (peptona 1g, glicose 1g, NaCl 5 g, fosfato de potássio monobásico 2g, vermelho de fenol 12 mg, uréia 20g, ágar 20g, água destilada q.s.p. 1000 mL; pH final 6,8) e teste rápido da urease (FERREIRA e ÁVILA, 2001).
 - **Fenol-oxidase:** a produção da enzima fenol-oxidase é testada com ágar-*Guizotia abyssinica* a base de níger, semente utilizada para alimentar pássaros. O extrato dessa semente contém ácido caféico que serve de substrato para a fenol-oxidase. As leveduras, quando crescem em meios contendo esses compostos, produzem, em dois a cinco dias, colônias pretas ou marrons (FERREIRA e ÁVILA, 2001).
 - **Toxinas killer:** podem ser utilizadas toxinas de outras leveduras para diferenciação por meio da suscetibilidade de várias espécies isoladas de *Candida sp.* e de cepas de uma mesma espécie entre si (ZAITZ et al., 1998).

Prova de virulência

Inoculação em cobaias

Uma suspensão salina de *Candida albicans* a 1%, injetada na veia marginal da orelha do coelho, provocará sua morte em quatro a cinco dias, apresentando, à necropsia, microabscessos renais. Outras espécies de *Candida* produziriam lesões, porém não letais aos coelhos (CRUICKSHANK et al., 1977; MOURA, 1999).

Biópsia/cortes histológicos

Blastoconídios, hifas e pseudo-hifas de *Candida albicans* e de outras espécies de *Candida* são facilmente corados pela hematoxilina-eosina. Assim, as colorações usadas para cortes histológicos são a prata metenamina de Grocott, que é utilizada para detecção desses elementos fúngicos nos tecidos, e o ácido periódico de Schiff (PAS) (LACAZ et al., 1998; TRABULSI ET AL., 1999; MURRAY et al., 2000). Em lesões que respondem insatisfatoriamente ao trata-

Testes bioquímicos

Testes de assimilação

- **Auxanograma e zimograma:** o poder discriminatório é grande no auxanograma, também chamado “teste de assimilação”, e é aumentado quando associado a provas de fermentação de açúcares, o zimograma (TRABULSI et al., 1999; FERREIRA e ÁVILA,

mento antifúngico, uma biópsia deverá ser feita para detectar possíveis transformações malignas no epitélio (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990).

Sistemas rápidos (*kits*) para identificação de leveduras

Os laboratórios podem lançar mão de sistemas rápidos de identificação de leveduras disponíveis no mercado internacional para a identificação presuntiva das culturas. Porém, nenhum deles tem capacidade de abranger a totalidade dos gêneros e, muito menos, das espécies de leveduras. Por esse motivo, os chamados *kits* não devem ser usados em laboratórios de pesquisa científica e nas unidades que dão apoio à vigilância epidemiológica (FERREIRA e ÁVILA, 2001). Os *kits* comerciais disponíveis atualmente baseiam-se no crescimento fúngico ou em provas de produção enzimática (WILLIAMS e LEWIS, 2000). Os fungos que requerem identificação mais elaborada devem ser encaminhados a um laboratório de referência (MARSHALL, 1995).

Sistemas exclusivos para identificação de *Candida albicans*

Sendo a *Candida albicans* a espécie de maior prevalência em materiais biológicos, sua identificação rápida pelos sistemas a seguir é uma alternativa para as provas tradicionais de clamidósporo e tubo germinativo (FERREIRA e ÁVILA, 2001):

- Albicans Sure (Clinical Standards Laboratories Inc., Rancho Domingues, CA, EUA): apresenta um cartão com dois substratos para as enzi-

mas β -galactosaminidase e L-prolina amino-peptidase. Reações positivas aos dois substratos indicam *C. albicans*. O teste tem sensibilidade de 99% e especificidade de 100% (FERREIRA e ÁVILA, 2001);

- Bacti-Card-Candida (Remel, Lenexa, Kansas, EUA);
- Murex Candida albicans CA 50 (Murex Diagnostic Inc., EUA);
- Bichro-latex albicans (Furmouze, França): identifica em cinco minutos, por reação enzimática, culturas de *Candida albicans* com especificidade de 99,8% e sensibilidade de 99,7%. Como em todos os outros testes, é necessário o isolamento primário das culturas nas quais pode ser aplicado, sem a necessidade de repiques. É um método de fácil aplicação e os resultados positivos são claramente identificados (FERREIRA e ÁVILA, 2001);
- MIS (Microbial ID Inc., Dinamarca).

Técnicas moleculares

Análise de DNA após tratamento com enzimas de restrição

A técnica de hibridização do DNA por ligação de sondas moleculares ao DNA do microrganismo em estudo tem se constituído numa ferramenta valiosa para rápida detecção e identificação dos microorganismos de crescimento lento, como as micobactérias e os fungos (MURRAY et al., 2000). Quando essa técnica é efetuada em condições de extremo rigor, a detecção do ácido nucléico na amostra pode ser altamente específica (JAWETZ et al., 1998). As cepas de leveduras expostas a agentes antifúngicos freqüentemente mostram caracteres fisiológicos alterados. A prova de DNA-DNA complementar pode

ser utilizada para identificar essas cepas (OLSEN, 1990a).

PCR (polimerase chain reaction)

As maiores vantagens da tipagem baseada em PCR são necessidade de pouco material inicial, aplicação universal, rapidez e simplicidade de execução (BARTIE et al., 2001; COOPER, 2001).

No estudo de Ahmad et al. (2002) com pacientes portadores de candidíase hematogena, a identificação das espécies de *Candida* pelo método de seminested PCR (*snPCR*) apresentou 99% de acurácia. Foi possível identificar *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, fato que facilita a seleção de agentes terapêuticos apropriados.

MLST (multilocus sequence typing)

Deficiências nos métodos de tipagem baseados no fenótipo levaram ao desenvolvimento de métodos de genotipagem microbiana por seqüenciamento de DNA. Características como praticidade de uso e baixo custo são importantes também para a aplicabilidade do método (OLIVE e BEAN, 1999).

A tipagem por seqüenciamento de multilócus é um método altamente resolutivo que utiliza o seqüenciamento de aproximadamente 450 a 500 pares de bases de fragmentos internos (*loci*) de genes essenciais (*housekeeping genes*). A maior vantagem desse método é que os dados obtidos podem ser facilmente comparados, permitindo sua troca via internet para uso em epidemiologia global (BOUGNOUX, MORAND, d'ENFERT, 2002).

Outros testes

Na classificação de leveduras, outros testes podem ser utilizados, como produção de amido extracelular, resistogramas, crescimento em altas temperaturas, produção de amônia, produção vigorosa de ácido, tolerância a 10% de ácido

acético, hidrólise da arbutina, redução do cloreto trifenil tetrazólico (TTC), produção das exoenzimas fosfolipase e proteinase e provas indiretas com anticorpos fluorescentes (LACAZ et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1998; CANDIDO, AZEVEDO, KOMESU, 2000; FERREIRA e ÁVILA, 2001). Também podem ser feitas sorotipagem e tipificação quanto à sensibilidade aos antifúngicos, denominada "antifungotipagem" (LACAZ et al., 1998). Corantes vitais, como o diacetato de fluoresceína e o brometo de etídio, utilizados com finalidade diagnóstica, demonstram maior rapidez que o cultivo e revelam-se importantes indicadores da viabilidade fúngica (TRABULSI et al., 1999).

Considerações finais

As infecções por *Candida sp* têm gerado grande interesse por parte dos pesquisadores por se manifestarem em pacientes hospitalizados com câncer e imunodeprimidos. O surgimento de variedades de *Candida sp* resistentes às drogas, levando a quadros de infecções sistêmicas, criou uma maior necessidade de desenvolvimento de métodos fidedignos de isolamento e identificação. Muitos procedimentos laboratoriais diferentes estão disponíveis para identificação da *Candida sp*, e a opção por um ou outro método depende, principalmente, do nível de identificação desejado, do número de amostras examinadas e da disponibilidade econômica.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método que oferece uma criteriosa e rápida identificação da *Candida sp* e, com o aprimoramento de técnicas moleculares, pode-se prever que seu uso será a base para os testes no futuro.

Abstract

HIV dissemination and prolonged survival of AIDS patients pointed oral candidiasis as an important problem for oral medicine. The increment of elderly population and large use of immunosuppressive therapy have also contributed for this fact. The aim of this work was to present a literature review about laboratory methods for identifying *Candida sp* associated to oral candidiasis. This identification can be based on morphologic, biochemical and antigenic features of the microorganism. Laboratories have to dispense simple, objective and modern diagnostic methods, since fungi can be used as a model for understanding molecular and genetic processes common to every being.

Key words: *Candida sp*, oral candidiasis, diagnostic methods

Referências

- AHMAD, S.; KHAN, Z.; MUSTAFA, A. S. et al. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 40, n. 7, p. 2483-2489, 2002.
- BAUTERS, T. G.; NELIS, H. J. Comparison of chromogenic and fluorogenic membrane filtration methods for detection of four *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 40, n. 5, p. 1838-1839, 2002.
- BARTIE, K. L.; WILLIAMS, D. W.; WILSON, M. J. et al. PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplastic candidosis and other oral conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 39, n. 11, p. 4066-4075, 2001.
- BOUGNOUX, M. E.; MORAND, S.; d'ENFERT, C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 40, n. 4, p. 1290-1297, 2002.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. *Acta Odontologica Scandinavica*, Oslo, v. 48, n. 1, p. 37-43, 1990.
- CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 437-442, 2000.
- COOPER, G. M. *A célula*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 712 p.
- CRUICKSHANK, R.; DUGUID, J. P.; MARMION, B. P. et al. *Microbiologia médica*. 4. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1977. p. 1138.
- FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico laboratorial*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 443 p.
- GEE, S. F.; JOLY, S.; SOLL, D. R. et al. Identification of four distinct genotypes of *Candida dubliniensis* and detection of microevolution in vitro and in vivo. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 40, n. 2, p. 556-574, 2002.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBURG, E. A. et al. *Microbiologia médica*. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 524 p.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. et al. *Diagnostic microbiology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1997. 1395 p.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINZ-VACARI, E. M. et al. *Guia para identificação fungos – actinomicetos – algas de interesse médico*. 1998. 433 p.
- MARSHALL, J. R. *Manual de laboratório clínico: microbiologia*. São Paulo: Livraria Ed. Santos, 1995. 161 p.
- MORAGUES, M. D.; OMAETXEBARRIA, M. J.; ELGUEZABAL, N. et al. Serological differentiation of experimentally induced *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 39, n. 8, p. 2999-3001, 2001.
- MOURA, R. A. *Técnicas de laboratório*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 511 p.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S. et al. *Microbiologia médica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 604 p.
- NEVES, M. I. R. *Candidíase oral x Aids*. Disponível em: <http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=79&idesp=5&ler=5>. Acesso em: 4 fev. 2001.
- NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M. et al. *Patologia oral e maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 705 p.
- NIIMI, K.; SHEPHERD, M. G.; CANNON, R. D. Distinguishing *Candida* species by β-N-Acetylhexosaminidase activity. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 39, n. 6, p. 2089-2097, 2001.
- OLIVE, D. M.; BEAN, P. Minireview – Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organis-

- ms. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.
- OLIVEIRA, E. E.; SILVA, S. C.; SOARES, A. J. et al. Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. *Revista da Sociedade Brasileira da Medicina Tropical*, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 523-527, 1998.
- OLSEN, I. Chemotaxonomy of yeasts. *Acta Odontologica Scandinavica*, Oslo, v. 48, n. 1, p. 19-25, 1990a.
- _____. Oral adhesion of yeasts. *Acta Odontologica Scandinavica*, Oslo, v. 48, n. 1, p. 45-53, 1990b.
- OLSEN, I.; STENDERUP, A. Clinical-mycologic diagnosis of oral yeast infections. *Acta Odontologica Scandinavica*, Oslo, v. 48, n. 1, p. 11-18, 1990.
- REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J. *Patologia bucal - Correlações clinicopatológicas*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 390 p.
- SANDVEN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontologica Scandinavica*, Oslo, v. 48, n. 1, p. 27-36, 1990.
- STENDERUP, A. Oral mycology. *Acta Odontologica Scandinavica*, Oslo, v. 48, n. 1, p. 3-10, 1990.
- SULLIVAN, D.; WESTERMEYER, T.; HAYNES, K. A. et al. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidiasis in HIV-infected individuals. *Microbiology*, Washington, v. 141, p. 1507-1521, 1995.
- SWEET, S. P. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. *Oral Diseases*, London, v. 3, Suppl I, p. S88-S95, 1997.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F. et al. *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu. 1999. 586 p.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Atheneu, 1996. 1765 p.
- WILLIAMS, D. W.; LEWIS, M. A. O. Isolation and identification of *Candida* sp from the oral cavity. *Oral Diseases*, London, v. 6, n. 1, p. 3-11, 2000.
- ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A. et al. *Compêndio de micologia médica*. Rio de Janeiro: Médica e Científica. 1998. 434 p.

Endereço para correspondência

Nadiesca Maria Lazzari Miotto
Programa de Doutorado em Estomatologia Clínica
Serviço de Estomatologia
Av. Ipiranga, 6690 / Sala 231 - 2º andar Hospital
São Lucas PUCRS
CEP 90.610-000 - Porto Alegre RS
Fone: (51) 3320-3000 (R. 2554)
E-mail: nadiesca.m@pop.com.br