



**Universidade Estadual de Campinas**  
***Faculdade de Odontologia de Piracicaba***



**VIVIAN FERNANDES FURLETTI**

Cirurgiã Dentista

**Suscetibilidade de isolados orais de *Candida* spp. provenientes de pacientes com doença periodontal aos antifúngicos azólicos e a Anfotericina B.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção de grau de Mestre em Biologia Buco-Dental, área de concentração em Microbiologia e Imunologia.

**Piracicaba**

**2006**



**Universidade Estadual de Campinas**  
*Faculdade de Odontologia de Piracicaba*



**VIVIAN FERNANDES FURLETTI**

Cirurgiã Dentista

**Suscetibilidade de isolados orais de *Candida* spp provenientes de pacientes com doença periodontal aos antifúngicos azólicos e a Anfotericina B.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção de grau de Mestre em Biologia Buco-Dental, área de concentração em Microbiologia e Imunologia.

**Orientador:** Prof. Dr. José Francisco Höfling

**Co-orientador (a):** Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Prof.Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

Prof. Dr. José Francisco Höfling

**Piracicaba**

**2006**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F978s | <p>Furletti, Vivian Fernandes.<br/>Suscetibilidade de isolados orais de <i>Candida</i> spp provenientes de pacientes com doença periodontal aos antifúngicos azólicos e a Anfotericina B. / Vivian Fernandes Furletti. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.</p> <p>Orientadores: José Francisco Höfling, Marta Cristina Teixeira Duarte.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Antibióticos. 2. Testes de sensibilidade microbiana. 3. Leveduras (Fungos). I. Höfling, José Francisco. II. Duarte, Marta Cristina Teixeira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p> |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Título em inglês: Susceptibility of oral *Candida* spp isolated from patients with periodontal diseases to antifungals azoles and Anfotericin B

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): 1. Antibiotics. 2. Microbial sensitivity tests. 3. Yeast fungi

Área de concentração: Microbiologia e Imunologia

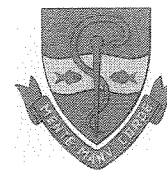
Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora: Reginaldo Bruno Gonçalves, Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, José Francisco Höfling

Data da defesa: 20/02/2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 20 de Fevereiro de 2006, considerou a candidata VIVIAN FERNANDES FURLETTI aprovada.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. F. Hofling", written over a horizontal line.

PROF. DR. JOSE FRANCISCO HOFLING

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Edvaldo", written over a horizontal line.

PROF. DR. EDVALDO ANTÔNIO RIBEIRO ROSA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Reginaldo B. Gonçalves", written over a horizontal line.

PROF. DR. REGINALDO BRUNO GONCALVES

## ***Dedicatória***

### ***A Deus***

*Por estar sempre me orientando  
através de minha caminhada!*

Muito obrigada !

### ***Aos meus pais***

*Paulo e Nilva, que sempre souberam me  
amar quando eu mais precisei. Minha eterna gratidão  
pelo amor incondicional, pelo carinho, apoio e incentivo.*

***Muito obrigada pai!***

***Muito obrigada mãe!***

### ***Ao meu irmão***

Gustavo companheiro em todos os momentos,  
sempre solícito e incentivador na busca de meus ideais

Muito obrigada!

**A minha avó**

*Pelo imenso carinho e dedicação  
e acima de tudo amor e respeito!  
A senhora o meu muito obrigado!*

**As minhas amigas**

*Rita, Regiane, Letícia, Priscilla  
pelo imenso companheirismo, dedicação,  
ensinamentos, que auxiliaram durante essa minha trajetória.  
A vocês muito obrigada!*

**Ao Prof. Dr. José Francisco Höfling,**

*pessoa a qual muito estimo,  
pela oportunidade a mim concedida, sempre atencioso e solícito durante a  
orientação deste trabalho.  
Ao Sr. meu muito obrigado!*

**A Prof. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte**

*por todas as oportunidades que me proporcionaram crescimento  
profissional e individual, pela imensa dedicação e carinho.  
A você toda a minha admiração e muito obrigado!*

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho, pelo acolhimento e pela excelência nas áreas de ensino e pesquisa, o que muito contribuiu para a minha formação.

Aos Profs. Drs. Reginaldo Bruno Gonçalves, Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, Denise Madalena Palomari Spolidório, Iriana Carla Junqueira Zanin, por aceitarem compor a banca examinadora deste trabalho de dissertação.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria, Coordenador do curso de Pós – graduação em Biologia Buco-dental da FOP - Unicamp.

A Profa. Dra. Letícia Monteiro de Barros, que coletou as amostras nesse estudo e que gentilmente nos foi cedida na presente pesquisa.

Aos Profs. Drs. Mary Ann Foglio e Alexandre Nunes Ponezi, pelos ensinamentos apoio e amizade sempre dispensados.

Aos meus amigos de Pós-graduação Marlise Inêz Klein, Marcelo Napimoga, Rafael Nóbrega Stipp, Ruchele Dias Nogueira, Alessandra Castro Alves, Daniel Saito, Paula Aníbal, Gustavo Obando, Rosana Hoffmann, Gilson Franco, Humberto Spindola, Rodrigo Taminato pelos bons e inesquecíveis momentos de amizade.

Aos amigos e também funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia Anderson Teixeira, Wilma Ferraz e Flávia Pampolini, pela amizade, colaboração, disposição e respeito. Minha enorme gratidão.

Aos amigos do CPQBA – Unicamp Bruna, Camila, Éricka Giuliana, Patrícia, Fabiano, Andressa, Rafael, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus tios Laerte, Diva, Virgínia, José Antônio, Regina, Paulo, Linaura pela amizade, companheirismo, carinho, amor e apoio incondicional, minha eterna gratidão.

Aos meus primos Marcelo, Henrique, Denise, Rafael, Renata, Rodrigo, Manuela e Nicolás pelo amor e incentivo a mim dispensados onde pude notar que o verdadeiro amor não se conhece por aquilo que exige, mas por aquilo que se oferece. A vocês e a toda nossa família, dedico os frutos deste trabalho!

A minha cunhada Samantha pelo carinho e incentivo, muito obrigada.

As minhas amigas Carolina, Joyce, Joeni, Mariana, Paula, Claudia, Daniela, Juliana, Daniele, Mariazinha, Isabel, Vera pelo carinho, alegria, amor, incentivo e pelo sentimento mais nobre que nos dedicamos a verdadeira amizade. A vocês agradecimentos eternos.

Aos meus amigos Cassiano, Samuel, Sandro, Sílvio, Roger, Thiago e Eduardo por fazerem parte da minha vida, pela força, amizade e pelo incentivo. A vocês meu muito obrigado.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro instituído pela concessão de bolsa.

***“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito.***

***Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver”.***

**Dalai Lama**

# **SUMÁRIO**

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO</b>                                                               | <b>1</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>                                                             | <b>3</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                        | <b>5</b>  |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>                                             | <b>8</b>  |
|                                                                             | <b>9</b>  |
| 2.1 Características Biológicas do gênero <i>Cândida</i>                     | 10        |
| 2.2 <i>Candida</i> spp. e a Cavidade Oral                                   | 14        |
| 2.3 Mecanismos moduladores da colonização de leveduras na cavidade bucal    | 15        |
| 2.4 <i>Candida</i> spp e doença periodontal                                 | 17        |
| 2.5 Fatores de virulência                                                   | 17        |
| 2.6 Isolamento e Identificação de <i>Candida</i> spp                        | 18        |
| 2.7 Teste de Suscetibilidade aos Antifúngicos Poliênicos e a Anfotericina B | 18        |
| <b>3. PROPOSIÇÃO</b>                                                        | <b>21</b> |
| <b>4. METODOLOGIA</b>                                                       | <b>23</b> |
| 4.1. Isolados de <i>Candida</i> spp                                         | 24        |
| 4.2. Seleção dos pacientes                                                  | 24        |
| 4.3. Coleta das Amostras                                                    | 25        |
| 4.4. Isolamento e Identificação preliminar das leveduras                    | 26        |
| 4.5. Conservação das Amostras                                               | 27        |
| 4.6. Identificação das cepas de <i>C. albicans</i> / <i>C. dubliniensis</i> | 28        |
| 4.6.1. Temperatura de Crescimento                                           | 28        |
| 4.6.2. Teste de tolerância em meio Sabouraud Dextrose Hipertônico           | 28        |

|                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.7. Identificação pelo sistema API 20C das amostras não sugestivas de <i>C. albicans</i> ou <i>C. dubliniensis</i>   | 29        |
| 4.8. Análise da micromorfologia (microcultivo)                                                                        | 29        |
| 4.9. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos                                                                       | 29        |
| <b>5. RESULTADOS</b>                                                                                                  | <b>32</b> |
| 5.1. Identificação dos isolados de <i>Candida</i> spp.                                                                | 33        |
| 5.1.1. Crescimento em Chromagar Candida® e características culturais em microcultivo                                  | 33        |
| 5.1.2. Identificação pelo sistema API 20C das amostras não sugestivas de <i>C. albicans</i> ou <i>C. dubliniensis</i> | 33        |
| 5.1.3. Temperatura de crescimento e teste em Sabouraud Dextrose Hipertônico.                                          | 38        |
| 5.1.4. Suscetibilidade aos antifúngicos                                                                               | 38        |
| <b>6. DISCUSSÃO</b>                                                                                                   | <b>58</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO</b>                                                                                                   | <b>66</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                                  | <b>68</b> |
| <b>9. ANEXOS</b>                                                                                                      | <b>81</b> |

***RESUMO***

---

A suscetibilidade a antifúngicos foi avaliada para espécies de *Candida* spp isoladas de três diferentes sítios da cavidade oral de 19 pacientes com doença periodontal, a saber: bolsa periodontal, mucosa bucal e sulco gengival. Um total de 140 amostras de leveduras foram isoladas e identificadas por métodos comumente utilizados em Micologia. Destas, 105 foram identificadas como *C. albicans*, 16 como *C. tropicalis*, 5 como *C. parapsilosis*, 4 como *C. krusei*, 3 como *C. famata*, 3 como *C. norvegensis*, 3 como *C. dubliniensis* e 1 como *C. lusitaniae*. As leveduras foram testadas frente aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B de acordo com a padronização do NCCLS. Dentre as amostras de *C. albicans*, 88% apresentaram susceptibilidade dependente da concentração (SDC) e 3,6% resistência à pelo menos um antifúngico azólico. Entre as outras espécies, 57% apresentaram SDC e 42,8% resistência a pelo menos um dos azólicos testados. Quanto a anfotericina B, 90% das *C. albicans* e 74,3% das não-*albicans* foram resistentes a este antifúngico. Não houve ocorrência de resistência para o fluconazol e apenas 3,6% das *C. albicans* e 40% das “não-*albicans*” foram SDC para este antifúngico. Os valores da Concentração Inibitória Mínima CIM50 e CIM90 dos antifúngicos azólicos para as amostras de *C. albicans* foram inferiores aos encontrados para as demais espécies. Para a anfotericina B, os valores de CIM50 e CIM90 não foram diferentes entre *C. albicans* e demais espécies. Apesar do baixo índice de resistência, foi observada elevada ocorrência de SDC para itraconazol e cetoconazol. Foi possível concluir que pacientes com doença periodontal apresentaram níveis de colonização por *Candida* spp relevantes, principalmente na mucosa bucal e bolsa periodontal, com uma importante ocorrência de SDC e resistência aos antifúngicos testados, o que está de acordo com dados recentes sobre a diminuição da sensibilidade a antifúngicos entre espécies de *Candida*.

***ABSTRACT***

---

The susceptibility to antifungal was evaluated for *Candida* spp isolated from three different sites of the oral cavity from 19 patients with periodontal illness, known as: periodontal pocket, oral mucosa and ridge gingival. A total of 140 yeasts were isolated and identified by classical methods in Micology. From this, 105 were identified as *C. albicans*, 16 as *C. tropicales*, 5 as *C. parapsilosis*, 4 as *C. Krusei*, 3 as *C. famata*, 3 as *C.norvegensis*, 3 as *C.dubliensis* and 1 as *C. lusitaniae*. The antifungal Fluconazole, Itraconazole, Ketoconazole and Anfotericin B were tested against the yeasts according to the NCCLS padronization. Among the samples of *C. albicans*, 88% showed susceptibility depending on the concentration (SCD) and 3,6% were resistant to at least one antifungal azoles studied. Among other species, 57% presented SDC and 42,8% showed resistance to at least one of the antifungal azoles tested. Regarding to Anfotericin B, 90% of the *C. albicans* isolates and 3% of the “non- albicans” showed resistance to this antifungal drug. There was no occurrence of resistance to the Fluconazole and only 3,6% of *C. albicans* and 40% of the “non-albicans” were SDC to this antifungal. The values of Minimum Inhibitory Concentration (MIC50 and MIC90) of the antifungal azoles to the samples of *C. albicans* were inferior to the ones found in the other species. For the Anfoterecin B, the values of MIC50 and MIC90 were not different among *C. albicans* and the other species. Besides the low percentage indice of resistance, it was observed high occurrence of SDC to Itraconazole and Cetoconazole. Patients with periondontal illness presented relevant levels of colonization by *Candida* spp, mainly at the oral mucosa and periodontal pocket showing important occurrence of SDC and resistance against the antifungals drugs tested according to the recent literature data about the decrease of sensibility to antifungals among *Candida* species.

## ***1. INTRODUÇÃO***

---

A cavidade oral humana tem sido considerada um meio ambiente único, por oferecer uma variedade de nichos ecológicos para a colonização microbiana, inclusive para fungos pertencentes ao gênero *Candida* (Jabra-Rizk *et al.*, 2001). Diversas espécies de *Candida* colonizam como organismos comensais a cavidade oral de aproximadamente 40% da população adulta saudável, sendo *Candida albicans* a espécie prevalente (Arendorf & Walker, 1980; Candido *et al.*, 1995).

A candidose é considerada a mais freqüente infecção fúngica da cavidade oral humana, e *C. albicans* é também a principal espécie relacionada, embora as espécies não-*albicans*, tais como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kruzei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* estejam se tornando comuns em certos grupos de pacientes (Pfaller, 1995b; Xu *et al.*, 1999). A análise de isolados clínicos provenientes de pacientes com candidose, sugere que a maioria das infecções por *Candida* spp. originam-se de cepas comensais que habitam a cavidade oral, vagina ou o trato gastrointestinal, anteriormente à infecção. As razões para o estabelecimento de infecções são fatores precipitadores, tais como, queda da imunidade do hospedeiro, desordens endócrinas, lesões de mucosa, higiene oral deficiente, tratamento prolongado com antibióticos, corticoesteróides e outros (Candido *et al.*, 1995; Jabra-Rizk *et al.*, 2001).

A boca, ao contrário de outras cavidades naturais, está constantemente exposta aos estímulos mecânicos, térmicos e químicos em decorrência dos atos fisiológicos a ela inerentes, destacando-se a mastigação. Desta forma, está propensa a apresentar com freqüência, modificações sistêmicas que poderão concorrer para o rompimento do equilíbrio biológico entre população microbiana e hospedeiro (Lacaz, 1980).

As espécies de *Candida* se aderem as superfícies do epitélio oral (Fukayama & Calderone, 1991), às próteses e aos aparelhos ortodônticos (Budtz-Jørgensen *et al.*, 1975) e, em menor intensidade às superfícies dentais limpas. Mas, na medida em que se forma a película adquirida, essa colonização aumenta podendo ocorrer tanto através da adesão direta aos receptores da película – atuando como colonizador pioneiro – como indiretamente, pela coagregação a outros

microrganismos formadores do biofilme dental (Holmes *et al.*, 1995; De Repentigny *et al.*, 2000). Após esse evento, futuras interações que são importantes para a permanência ou remoção dessa levedura na cavidade bucal podem ocorrer entre hospedeiros e as células fúngicas. A *C. albicans*, considerada como uma das mais patogênicas é a levedura mais freqüentemente isolada desse sítio (Stenderup, 1990).

Foi sugerido que quando a *C. albicans* obtém acesso aos tecidos periodontais, estes podem ser prejudicados pela produção de metabólitos fúngicos.

Waltimo *et al.* (2001), avaliando a susceptibilidade aos antifúngicos entre isolados de *C. albicans* de bolsas periodontais, demonstrou que 100% destes isolados eram sensíveis a anfotericina B e a 5-fluorocitosina. Contudo, a sensibilidade aos antifúngicos azólicos mostrou-se variável, ocorrendo resistência cruzada em relação aos mesmos. Esse fato vem corroborar recentes dados, que indicam uma crescente resistência aos azólicos entre espécies de *Candida*, sugerindo que a cavidade oral poderia ser um reservatório de leveduras resistentes (Muñoz *et al.*, 1997). O uso difundido de antifúngicos azólicos para tratamento de candidose oral, em grupos de risco, parece ser um fator preponderante no aumento da freqüência de espécies de *Candida* não-*albicans*, especialmente aquelas naturalmente mais resistentes a esta classe de antifúngicos, tais como *C. glabrata* e *C. krusei* (Dronda *et al.*, 1996). Dados provenientes de alguns estudos sugerem que o tratamento prolongado ou intermitente com antifúngicos modifica a prevalência de *C. albicans*, aumentando a freqüência percentual de outras espécies. (Persons *et al.*, 1991; Millon *et al.*, 1994).

Pesquisas envolvendo a suscetibilidade de isolados orais de *Candida* spp. a antifúngicos azólicos e a anfotericina B se justificam no sentido de melhor compreender as relações entre *Candida* spp. – hospedeiro envolvendo mecanismos de resistência destes organismos aos antimicrobianos.

## ***2. REVISÃO DA LITERATURA***

---

## **2.1. Características biológicas do gênero *Candida***

Fungos são seres unicelulares ou pluricelulares que habitam diversos ecossistemas, sendo enquadrados em três Reinos da natureza, o Reino Eumycota (Fungi ou fungos verdadeiros), Protozoa e Chromista (Hoog *et al*, 2000).

Uma característica comum às espécies fúngicas é a reprodução através de estruturas assexuadas, denominadas conídios. Alguns também se reproduzem sexuadamente, e tal característica os distingue taxonomicamente. (Slots & Taubman, 1992)

As espécies de fungos são classificadas em classes dentro dos reinos aos que pertencem, ou seja, Zigomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos e Mitospóricos (a qual pertence a maioria dos fungos patogênicos humanos), (Poulter, 1987).

Heterotróficos, os fungos obtêm seus nutrientes através da secreção de enzimas que têm por substrato a matéria orgânica do solo, plantas e animais (Slots & Taubman, 1992). Assimilam o carbono pelo metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídeos e álcoois, e o nitrogênio de compostos de sais de amônio, uréia e peptona e assim acumulam glicogênio como material de reserva. Aeróbios em sua maioria, porém algumas poucas espécies celulolíticas se desenvolvem em anaerobiose.

Os fungos podem se apresentar como patógenos primários, capazes de causar infecção sem fatores predisponentes, como também como patógenos oportunistas, manifestando seu potencial patogênico em hospedeiros imunologicamente ou fisiologicamente comprometido.

Neste último grupo estão inseridas as leveduras do gênero *Candida* (Haynes, 2001). As leveduras desse gênero estão incluídas na classe dos Deuteromicetos, habitando ecossistemas distintos desde simples vegetais a animais, incluindo seres humanos. As leveduras são seres microscópicos, unicelulares, cuja reprodução se dá por brotamento ou divisão binária (Höfling & Rosa, 1999).

Compreendem mais de 150 espécies, que crescem bem em temperaturas que variam entre 20 °C a 38 °C e em pH variando de pH ácido a pH alcalino (Odds,1998).

As *Candida* spp. fazem parte da microbiota normal da pele, da cavidade bucal e do trato gastrintestinal, além de secreções brônquicas e do trato geniturinário (Lacaz, 1980), vivendo como organismos comensais. Entretanto, comportam-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções que vão desde lesões mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas.

## **2.2. *Candida* spp. e a Cavidade Oral**

A cavidade oral humana tem sido considerada um ambiente único, por oferecer uma variedade de nichos ecológicos para colonização microbiana. Os fungos pertencentes ao gênero *Candida* habitam diferentes epitélios do corpo, incluindo a mucosa oral, fazendo parte da microbiota residente (McCullough *et al.*, 1999).

As *Candida* spp são habitantes comuns da cavidade oral tanto de adultos como de crianças (Barlow & Chattaway, 1969; Darwazeh & Al-Bashir, 1995; Hannula *et al.*,1999). A frequência, a intensidade e a predominância das espécies variam em função da idade do hospedeiro (Kleinegger *et al.*, 1996). Durante o período neonatal, as condições que predispõe a instalação de leveduras são provavelmente a imaturidade do sistema imunológico e queratinização da microbiota oral (Okasala,1990).

Outros estudos observam que a colonização em indivíduos idosos pode ser maior do que em faixas etárias mais jovens (Lockhart *et al.*,1999). Na infância, a prevalência de leveduras está associada ao uso de chupetas, deficiências nutricionais, irrompimento dos primeiros dentes, uso de mamadeiras, lesões de cárie, higiene bucal deficiente, terapia antibacteriana, idade e sexo (Pienihäqinen *et al.*,1988; Darwazeh & Al-Bashir, 1995; Ollila *et al.*,1997; Hannula *et al.*,1999). O aumento da colonização em idosos ocorre simultaneamente às alterações no ambiente bucal, em consequência da perda de elementos dentais, ao uso de

próteses, interações medicamentosas, incluindo outras condições (Odds, 1998). Em relação ao sexo masculino e feminino, os dados disponíveis na literatura são contraditórios. Alguns autores, analisando a colonização assintomática da mucosa de pacientes HIV - positivos, não constataam diferenças em relação ao gênero (Campisi *et al.*, 2002). O mesmo é observado em pacientes com diabetes *mellitus* insulino-dependentes (Willis *et al.*, 1999) e em indivíduos com hipossalivação (Torres *et al.*, 2002). Pires *et al.* (2002) encontraram maior colonização bucal por *Candida* em mulheres, enquanto Moalic *et al.* (2001) encontraram maior prevalência em homens.

Como são altamente prevalentes em populações saudáveis e assintomáticas, o isolamento de *Candida* spp. da cavidade bucal não implica, necessariamente, na ocorrência de infecções (Samaranayake & Samaranayake, 2001). Estudos reportam que aproximadamente metade da população adulta saudável hospeda essas leveduras nas mucosas bucais (Arendorf & Walker, 1980; Linch *et al.*, 1994; Darwazeh & Al-Bashir, 1995; Abu-Elteen & Abu-Elteen, 1998). Entretanto, uma prevalência de *Candida* spp. entre os grupos populacionais tem sido encontrada, sendo que fatores que influenciam a colonização são de difícil padronização devido a ocorrência de populações heterogêneas. Hábitos alimentares como dieta rica em açúcares (Pizzo *et al.*, 2000), hábitos de higiene oral (Darwazeh & Al-Bashir, 1995), cavitações (Starr *et al.*, 2002), uso de próteses totais (Pires *et al.*, 2002), fluxo e pH salivares (Spolidorio *et al.*, 2001) influenciam na detecção desses microrganismos.

Grupos populacionais distintos podem apresentar níveis de colonização bucal por leveduras maiores que a média da população em geral, sendo chamados de grupos de risco (Davies *et al.*, 2002). Nesse sentido, estudos reportam maior prevalência de espécies de *Candida* spp. em portadores de síndrome de *Sjögren*, síndrome de Down, hipofunção de glândulas salivares, diminuição do fluxo ou do pH salivar, em portadores de diabetes *mellitus*, HIV - positivos (sendo essa última considerada população de maior risco que as outras),

câncer em estágio avançado (Carlstedt *et al.*, 1996; Spolidorio *et al.*, 2001; Vargas & Joly, 2002, Campisi *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2002).

O aumento da proporção dessas espécies nesses grupos de indivíduos sugere que a resposta imune deficiente dos mesmos pode ser um fator preditivo para o desenvolvimento de candidoses, e esta é considerada uma condição clínica grave. Desse modo estudos epidemiológicos entre os diferentes grupos populacionais é uma importante estratégia para controle e prevenção de doenças infecciosas (Leung *et al.*, 2000; Kam & Xu, 2002).

Essas leveduras são encontradas sobre diversos sítios da cavidade bucal, como, as superfícies mucosas do lábio e bochechas, língua, tonsilas, lesões de cárie, canais radiculares e fazendo parte do biofilme, colonizando preferencialmente as superfícies já recobertas por uma camada de placa, coagregando-se a espécies bacterianas aí presentes, ou ainda, aderindo-se diretamente à película salivar (Arendorf & Walker, 1980; Nikawa *et al.*, 1998).

Para diversos pesquisadores, o isolamento desses fungos da mucosa oral ou de áreas subgengivais, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, poderia contribuir para a maior progressão da doença periodontal, como também determinar um risco aumentado de candidose disseminada (Nikawa *et al.*, 1998; Jabra-Rizk *et al.*, 2001).

A partir das observações sobre variação individual e populacional na prevalência de *Candida* spp. constatou-se que nem todos os indivíduos abrigam essas leveduras na boca devido a existência de barreiras naturais nas superfícies mucosas e nos fluidos orgânicos, impedindo a colonização desses indivíduos. Essas barreiras seriam dependentes de fatores relacionados à idade, gênero, tabagismo, dieta, medicamentos, condições sistêmicas e estado imune do hospedeiro, entre outros (Höfling *et al.*, 2001).

A *C. albicans* é uma levedura comumente encontrada nas populações humanas, além de ser considerada a espécie de maior importância odontológica, pelo fato de ser o agente etiológico de grande parte das infecções fúngicas ocorridas na cavidade oral, sendo que sua ocorrência neste local representa 60%

a 70% dos isolados (Stenderup, 1990). É capaz de residir em equilíbrio com a microbiota comensal de hospedeiros assintomáticos e imunocomprometidos (Hannula, 2000). O status fisiológico tem sido reconhecido, então, como o fator etiológico primário no desenvolvimento das infecções fúngicas, mais que a virulência intrínseca do microrganismo oportunista (Ollert *et al.*, 1995). Entretanto, apenas pequenas alterações nesse estado podem modificar o comportamento dessa espécie, que passa a manifestar seu potencial de virulência, e assim, de comensal inofensivo tornar-se um patógeno agressivo (Hube & Naglik, 2001). Possui ainda a capacidade de colonizar apenas um ou poucos sítios do hospedeiro (Calderone & Fonzi, 2001).

Segundo Lamkim & Oppenheim (1993), a *C. albicans* adere pouco às superfícies dentais limpas, mas à medida que se forma a película adquirida esse evento aumenta, podendo colonizar o esmalte dos dentes e as superfícies radiculares, tanto através da adesão direta aos receptores da película - atuando como colonizador pioneiro - como indiretamente, pela coagregação a outros microrganismos já aderidos ao biofilme dental (De-Repentigny *et al.*, 2000). Os biofilmes contendo *C. albicans* poderiam estar implicados não apenas na candidose da mucosa oral, mas também associadas ao desenvolvimento de cáries e na patogênese das doenças periodontais (Hagihara *et al.*, 1988; Beighton *et al.*, 1995; Nikawa *et al.*, 1998). Além disso, interações posteriores podem ocorrer entre o hospedeiro e as células que são importantes para a permanência ou remoção dessa levedura na cavidade oral.

A *C. albicans* pode se apresentar sobre várias formas, chamadas de variações adaptativas, sendo a forma de hifa a mais virulenta e a mais aderente em relação à célula leveduriforme. Dessa forma, a capacidade dessa espécie de formar tubos germinativos parece contribuir para sua virulência, visto que amostras de tecidos infectados no homem e nos animais, na maioria das vezes contém hifas, pseudo-hifas e células leveduriformes (Hannula, 2000)

A *C. dubliniensis* é uma espécie similar fenotipicamente, porém, geneticamente distinta de *C. albicans* (Mariano *et al.*, 2003). Essa espécie

demonstra maior frequência de alterações fenotípicas, com produção significativamente menor de proteinases e fosfolipases que isolados de *C. albicans*. A espécie *C. dubliniensis* tem demonstrado grande capacidade de aderir-se às células do epitélio oral, às mucinas, e ao *Fusobacterium nucleatum* (Jabra-Rizk *et al.*, 2001). Tais associações intermicrobianas parecem desempenhar um papel importante na patogênese das doenças infecciosas da cavidade oral, podendo, portanto, auxiliar o processo de colonização do biofilme dental e das bolsas periodontais. Quando isolada, está frequentemente associada a *C. albicans* e/ou a outras espécies do gênero. Na maioria dos casos é isolada da mucosa e de bolsa periodontal de pacientes infectados pelo HIV (Hannula *et al.*, 1997; Millan *et al.*, 2001; Perea *et al.*, 2002).

Além das espécies citadas acima, outras espécies têm sido isoladas como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, e *C. famata*. Estudos relatam que um único hospedeiro pode ser colonizado tanto por uma única espécie quanto por múltiplas espécies de *Candida*, ou ainda por diferentes genótipos da mesma espécie, no mesmo ou em diferentes sítios no organismo (Xu *et al.*, 1999; Mardegan, 2003; Barros, 2005 ).

### **2.3. Mecanismos moduladores da colonização de leveduras na cavidade bucal**

A cavidade bucal possui diversos fatores locais que a defendem contra a microbiota, dentre eles o fluxo salivar, substâncias antimicrobianas da saliva e barreira epitelial (Nikawa *et al.*, 1993). A saliva auxilia na manutenção da saúde bucal pela capacidade tampão e pela lubrificação das mucosas, de modo que alterações quantitativas e qualitativas na composição da mesma afetam diretamente sua função, os mecanismos de defesa locais e a ecologia microbiana (Leung *et al.*, 2000). A lactoferrina e a lisozima são duas proteínas presentes na saliva e que fazem parte da resposta inata, modulando a colonização de espécies de *Candida* entre outros microrganismos na saliva (Samaranayake *et al.*, 2001).

#### **2.4. *Candida* e doença periodontal**

As doenças periodontais são afecções que acometem os tecidos de proteção e suporte dos dentes, em que os microrganismos do biofilme subgengival aderidos à superfície radicular adjacente à bolsa periodontal induzem uma variedade de respostas imunes defensivas, no hospedeiro, na tentativa de conter a infecção (Alpagot *et al.*, 2004). Como resultado da ativação de mecanismos inflamatórios contra a agressão pelos patógenos, ocorre a inflamação dos tecidos gengivais e a destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar de suporte, podendo levar a perda do dente afetado (Chen *et al.*, 2004).

Contudo, acredita-se que a maioria dos microrganismos encontrada no biofilme subgengival seja comensal, ou seja, ocorra também em indivíduos com periodonto saudável, em equilíbrio com o hospedeiro. Desse modo, os episódios de doença resultam de deficiências na capacidade de defesa do hospedeiro frente às alterações quantitativas e/ou qualitativas da microbiota subgengival (Lamont & Jenkinson, 1998; Alves, 2003).

As doenças periodontais são classificadas em gengivites e periodontites. A gengivite é uma infecção associada ao biofilme dental, caracterizada pela ocorrência de fenômenos inflamatórios reversíveis limitados aos tecidos gengivais, não atingindo nesses casos os tecidos periodontais de suporte. Os sinais clínicos desse estágio da doença vão desde edema, alteração na coloração normal da gengiva, que adquire aspecto de vermelhidão até perda de contorno normal da gengiva (Lindhe, 1999).

A periodontite é definida como uma doença inflamatória, que envolve os tecidos de suporte dental, provocando a reabsorção irreversível do osso alveolar e das fibras colágenas do ligamento periodontal. A progressão e a severidade dessa doença são influenciadas por condições de origem local ou sistêmica ou associações de ambas (Newman *et al.*, 2004).

Os fatores de origem local estão associados à má higiene bucal, a presença de cáries e próteses que ocasionam o acúmulo microbiano. Já os fatores de ordem sistêmica estão relacionados a desordens do metabolismo do

hospedeiro, terapias imunossupressoras, má nutrição, e a infecção pelo vírus HIV, sendo essas as condições que contribuem para agravar a doença periodontal (Lindhe, 1999).

Junto à bolsa periodontal acometida pela doença, podemos encontrar uma microbiota complexa, onde podem ocorrer aproximadamente 500 espécies de bactérias, e dentre elas podemos destacar a presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, além de outros microrganismos como entamoebas, tricomonas, o vírus do Herpes simples tipo 1-HSV-, bacilos entéricos, *Pseudomonas* spp, citomegalovírus humano - HCMV, bem como leveduras do gênero *Candida* (Alves, 2003; Slots & Taubman, 1992; Slots, 2004; Rams *et al.*, 1997).

Este fato tem levado a um extenso estudo das amostras microbiológicas das lesões de periodontite, especialmente nos casos de pobre resposta ao tratamento convencional, e em muitos destes casos, os fungos têm sido detectados infectando as bolsas periodontais. Há vários relatos associando a ocorrência de periodontite severa ao isolamento de espécies de *Candida* das lesões periodontais (Peterson *et al.*, 1987; Slots *et al.*, 1988). Entretanto, o significado clínico destas observações e o papel destes microrganismos na patogênese das doenças periodontais ainda não estão bem esclarecidos. Muitas investigações científicas vêm sendo feitas, a fim de aprofundar o conhecimento nesta área (Lamster *et al.*, 1998). Foi sugerido que, quando *C. albicans* obtém acesso aos tecidos periodontais, estes podem ser prejudicados pela produção de metabólitos por estas leveduras.

Contudo, a presença de fungos nas bolsas periodontais, não tem recebido ainda o enfoque necessário à compreensão do seu papel como periodontopatógenos, embora já tenha sido reconhecida a sua capacidade de aderir ao epitélio, expressar fatores de virulência e induzir reações inflamatórias (Hube & Naglik, 2001).

## 2.5. Fatores de virulência

Os mecanismos que determinam a patogenicidade do gênero *Candida* ainda não estão totalmente elucidados. A patogenicidade das espécies resulta de características próprias das cepas em questão e do estado imunológico do hospedeiro, assim como as condições locais dos sítios de infecção são de extrema importância (Oksala, 1990).

Dentre as espécies do gênero *Candida*, a reconhecida como a mais patogênica é *C. albicans*. Assim como outras espécies de leveduras elas secretam enzimas proteolíticas que podem degradar ou transformar constituintes da membrana celular do hospedeiro induzindo uma disfunção e ou uma destruição física, sendo que a invasão das células dos tecidos do hospedeiro por tais microrganismos implica na penetração e danos ao envelope externo celular sendo esse processo mediado por meios físicos e enzimáticos ou pela combinação de ambos (Salyers & Witt, 1994).

Em 1982, Ruchel relatou que os fatores de virulência de *C. albicans* estão relacionados com a produção de hialuronidase, condroitina sulfatase, proteinase e fosfolipases. As mesmas podem atuar de maneira conjunta ou separada determinando a intensidade de virulência e também são consideradas essenciais para a mesma. As proteinases hidrolisam peptídeos vinculados à membrana e as fosfolipases hidrolisam fosfolipídeos (Hube, 1998; Ibrahim *et al.*, 1995). Tendo como componentes de membrana fosfolipídeos e proteínas, essas enzimas estão provavelmente envolvidas na ruptura da membrana celular, processo que ocorre durante a invasão das células do hospedeiro.

## 2.6. Isolamento e Identificação de *Candida spp*

A identificação e a caracterização das espécies de *Candida* podem ser feitas através de testes fenotípicos clássicos, como micromorfologia e a análise dos diferentes perfis bioquímicos, apresentados por essas espécies (Sandven, 1990). Além disso, os estudos sobre propriedades como a capacidade de secreção enzimática (Price *et al.*, 1982), de formação de biofilme pela

coagregação intergenérica (Jabra-Risk *et al.*, 2001), sensibilidade aos antifúngicos (Pfaller *et al.*, 2003) e a sorotipagem (Hannula *et al.*, 2001) permitem uma caracterização fenotípica dos isolados clínicos, ou seja, a biotipagem (Odds, 1980). Existem ainda métodos moleculares associados aos fenotípicos que permitem o aprimoramento da identificação e um maior conhecimento sobre as relações de comensalismo e patogenicidade das espécies de *Candida* (Hannula *et al.*, 2001).

Análises morfológicas e bioquímicas demonstram que *C. dubliniensis* apresenta características muito próximas de *C. albicans*. Segundo Sullivan *et al.* (1995), em seu trabalho que descreve a espécie, *C. dubliniensis* pode ser diferenciada fenotipicamente de *C. albicans* por produzir clamidoconídios mais rapidamente e em maior quantidade quando cultivada em ágar fubá com Tween®-80. No entanto, esta produção de clamidoconídios não usual parece não ser reprodutível em alguns laboratórios (Schoofs *et al.*, 1997; Kirkpatrick *et al.*, 1998). Ambas desenvolvem coloração verde no meio cromogênico CHROMagar Candida® (CHROMagar microbiology, Paris, França), mas isolados de *C. dubliniensis* podem apresentar coloração verde mais escura que *C. albicans* em cultivo primário do material clínico. Esta característica, entretanto, pode desaparecer após sucessivos repiques e armazenamento da cepa, principalmente quando congelada à -70°C (Schoofs *et al.*, 1997). A ausência de crescimento sob elevadas temperaturas tais como 42°C e 45°C também constituem provas que, juntamente com outras, podem ser úteis para a identificação de *C. dubliniensis*, uma vez que a maioria dos isolados de *C. albicans* são capazes de crescer nestas temperaturas (Sullivan *et al.*, 1995; Pinjon *et al.*, 1998).

## **2.7. Teste de Suscetibilidade aos Antifúngicos Poliênicos e a Anfotericina B**

Desde 1977, num encontro organizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em Genebra, tem-se notado a preocupação pelo aumento mundial da resistência das drogas associada com o uso freqüente e crescente de

antimicrobianos, sejam eles antibacterianos ou antifúngicos, tanto em humanos quanto em animais. Nos últimos anos, a resistência a drogas deu origem a vários surtos de infecções, seguidos de mortes. Isto gerou a necessidade de programas de estudos para monitorar a resistência microbiana através de testes de suscetibilidade com uso de métodos confiáveis que geraram resultados comparáveis.

A disponibilidade de informações microbiológicas e epidemiológicas ajudaria os médicos a eleger o agente antimicrobiano mais apropriado para o tratamento das infecções. Esses testes de suscetibilidade medem a capacidade de um agente microbiano inibir o crescimento do microrganismo *in vitro*. E assim, classifica o microrganismo em categorias de suscetibilidade, podendo ser sensível, suscetibilidade concentração dependente ou resistente. Sensível é o microrganismo cuja infecção causada por ele está propensa a responder ao tratamento com a droga; Sensibilidade concentração dependente é aquela cuja infecção depende de adequação da dose para ser controlada e resistente é o organismo que não responde a uma determinada droga independente de adequação da dose (Technical Report Series, 1996).

Vários antifúngicos são empregados no tratamento de infecções fúngicas, ressaltando os azólicos e os poliênicos. Os azólicos são os eleitos em primeira instância para tratamento dessas doenças e são geralmente fungistáticos, enquanto os últimos são fungicidas. Dentre os azólicos estão o fluconazol, o itraconazol e o cetoconazol. Dentre os poliênicos podemos citar como exemplo a Anfotericina B e a Nistatina.

Mariano *et al.* (2003), durante estudo com pacientes com Aids e portadores de infecções fúngicas por diferentes espécies de *Candida*, observaram suscetibilidade aos azólicos e a anfotericina B. Contudo, isolados de *C. albicans* apresentaram suscetibilidade dose dependente ou resistência aos antifúngicos azólicos.

O uso do fluconazol de forma profilática em doses baixas tem sido recomendado para prevenir infecções fúngicas em pacientes

imunocomprometidos, porém isso tem levado a seleção de leveduras da microbiota fazendo com que apareçam espécies não-albicans como *C. glabrata* e *C. krusei*, resistentes a esse antifúngico (Saporiti *et al.*, 2001).

Biofilmes de *C. albicans* mostraram-se altamente resistentes a ação clínica de antifúngicos e agentes antimicrobianos incluindo a Anfotericina B, a clorexidina, a nistatina e ao fluconazol (Mukherjee *et al.*, 2003). Nesse mesmo trabalho, demonstrou-se que na medida em que houve o amadurecimento do biofilme desses isolados de *C. albicans*, houve concomitantemente a aquisição e o aumento da resistência dessas células leveduriformes em relação aos antimicrobianos testados.

Testes de sensibilidade aos antifúngicos não são solicitados rotineiramente na prática odontológica. No entanto, em função do aparecimento de percentual bastante significativo de leveduras sensibilidade dose dependente e ou resistentes, sugere-se a implantação de um programa para desenvolvimento de testes de sensibilidade, para que haja monitoramento de amostras clínicas, adequando-se a melhor droga e a dose ideal a ser usada para cada paciente, evitando-se assim dose excessiva e indução de resistência microbiana (Galle *et al.*, 2004).

### ***3. PROPOSIÇÃO***

---

Com base na literatura pertinente esta pesquisa teve como proposta:

a) Identificar e caracterizar amostras de leveduras isoladas de bolsa periodontal, sulco gengival e mucosa bucal de pacientes com doença periodontal, sistemicamente saudáveis.

b) Determinar o padrão de susceptibilidade das leveduras em relação a alguns antifúngicos azólicos e a Anfotericina B (poliênico).

## ***4. METODOLOGIA***

---

#### 4.1. Isolados de *Candida* spp

Os isolados de *Candida* spp utilizados no presente trabalho foram selecionados em um estudo prévio por Letícia Monteiro de Barros (2005), de acordo com a metodologia descrita nos itens 4.2 e 4.3. Inicialmente, a autora identificou as espécies de *C. albicans* e *C. dubliniensis* presentes entre os isolados, através de métodos moleculares. No presente trabalho, os isolados foram reidentificados através de métodos clássicos.

#### 4.2. Seleção dos pacientes

Foram selecionados 53 pacientes da Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), de ambos os sexos (33 mulheres e 20 homens), com idades entre 23 e 61 anos, apresentando diagnóstico de doença periodontal, porém sem relato de enfermidades sistêmicas.

Cada paciente deveria apresentar como critérios de inclusão: a) no mínimo 20 dentes presentes, em ambos os arcos; b) no mínimo 6 sítios subgengivais com bolsas periodontais (profundidade de sondagem acima de 3 mm; sangramento e/ou supuração); c) 6 sítios subgengivais saudáveis (profundidade de sondagem de até 3 mm e ausência de sangramento e/ou supuração), de acordo com Pizzo *et al.* (2000) e Hannula *et al.* (2001).

Como critérios de exclusão foram empregados os seguintes parâmetros: a) enfermidades sistêmicas e/ou uso de medicamentos relacionados à ocorrência de *Candida* spp.; b) antibioticoterapia nos últimos 6 meses; c) tratamento periodontal nos últimos 12 meses antecedentes à coleta; d) manifestações clínicas de candidose bucal; e) próteses dentais removíveis ou aparatos ortodônticos (Nikawa *et al.*, 1998; McMullan-Vogel *et al.*, 1999; Alves, 2003).

Esta pesquisa foi conduzida de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras Sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução nº196/96 do Conselho Nacional de Saúde 1996-<http://conselho.saude.gov.br/comissao/conep/resolucao.html>), a qual também foi

aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP (protocolo nº008/2003- <http://www.fop.unicamp.br/cep/>).

#### 4.3. Coleta das Amostras

De cada paciente foram coletadas amostras do sítio A (bolsa periodontal), B (sulco gengival saudável) e sítio M (mucosa bucal: gengiva, palato duro, bochechas e dorso da língua). Foram empregados espelho bucal, sonda periodontal milimetrada com marcação tipo Williams e pontas de papel absorvente esterelizados (# 35-55, Endopoints Indústria e Comércio Ltda., Paraíba do Sul, RJ, Brasil).

Previamente às coletas nos sítios A e B, foi feito o isolamento relativo de cada dente selecionado por meio de rolos de algodão. Então, o biofilme supra gengival foi removido através de curetas, bolinhas de algodão e fio dental. Para evitar a contaminação pela microbiota salivar foram feitas a sucção da saliva e a secagem do dente com jatos de ar. As amostras dos sítios A e B foram obtidas através da inserção de cones de papel absorvente esterilizadas nas bolsas periodontais e sulcos gengivais, sempre que possível em cada sextante, de ambos os arcos dentais. Os cones foram inseridos em 6 sítios A e 6 sítios B por paciente, durante aproximadamente 20 segundos e posteriormente transferidos para microtubos contendo 500 µL de solução salina estéril. As amostras do sítio M foram obtidas através de zaragatoas (*swab*) e, em seguida, transferidas para tubos contendo solução salina estéril.

Imediatamente após as coletas, as amostras foram conduzidas ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba para isolamento e identificação das leveduras, segundo as metodologias descritas previamente (Sandven, 1990; Baumgartner *et al.*, 2000; Kleinegger *et al.*, 1996; Reynaud *et al.*, 2001).

A Tabela 1 apresenta a relação dos isolados de *Candida* spp. utilizados no presente trabalho.

**Tabela 1.** Relação e código das amostras de *Candida* spp isoladas da cavidade oral de pacientes portadores de doença periodontal utilizadas no presente trabalho.

| N° do paciente e código da amostra |       |        |       |        |
|------------------------------------|-------|--------|-------|--------|
| 1-B1                               | 14-A4 | 34-A7  | 47-A1 | 55-B5  |
| 1-B2                               | 14-A5 | 34-A8  | 47-A2 | 55-M1  |
| 1-B3                               | 14-B1 | 34-A9  | 47-A3 | 55-M4  |
| 1-B4                               | 14-M1 | 34-A10 | 47-A4 | 56-M1  |
| 1-B5                               | 14-M2 | 34-B2  | 47-A5 | 56-M3  |
| 1-M1                               | 14-M4 | 34-M2  | 47-M1 | 56-M4  |
| 1-M2                               | 15-A1 | 41-A1  | 47-M2 | 56-M5  |
| 1-M3                               | 15-A2 | 41-A2  | 50-A1 | 56-M6  |
| 1-M4                               | 15-A3 | 41-A3  | 50-A2 | 56-M7  |
| 1-M5                               | 15-A4 | 41-A4  | 50-A3 | 56-M8  |
| 3-A1                               | 15-A5 | 41-A5  | 50-A4 | 56-M9  |
| 3-A2                               | 15-M1 | 41-M1  | 50-M1 | 56-M10 |
| 3-A3                               | 26-A2 | 41-M2  | 50-M2 | 56-M11 |
| 3-A4                               | 26-A3 | 41-M3  | 50-M3 | 58-A1  |
| 3-A5                               | 26-A4 | 41-M4  | 50-M4 | 58-A2  |
| 3-M1                               | 26-A6 | 41-M5  | 50-M6 | 58-A3  |
| 3-M2                               | 26-A7 | 42-B1  | 53-M6 | 58-A4  |
| 3-M3                               | 26-A8 | 42-B2  | 53-M7 | 58-A5  |
| 3-M4                               | 30-A6 | 42-B3  | 53-M8 | 58-B1  |
| 3-M5                               | 30-A7 | 42-B4  | 55-A1 | 58-B2  |
| 13-A1                              | 30-A8 | 42-B5  | 55-A2 | 58-B3  |
| 13-A2                              | 31-A1 | 42-M1  | 55-A3 | 58-B4  |
| 13-A3                              | 31-A2 | 42-M2  | 55-A4 | 58-B5  |
| 13-A4                              | 31-A3 | 45-M1  | 55-A5 | 58-M1  |
| 13-A5                              | 31-A4 | 45-M2  | 55-B1 | 58-M2  |
| 14-A1                              | 31-M1 | 45-M4  | 55-B2 | 58-M3  |
| 14-A2                              | 31-M2 | 45-M5  | 55-B3 | 58-M4  |
| 14-A3                              | 34-A6 | 46-M1  | 55-B4 | 58-M5  |

\* Os códigos das amostras correspondem ao número do voluntário e ao local de procedência, sendo: bolsa periodontal (A), sulco gengival saudável (B) e mucosa bucal: gengiva, palato duro, bochechas e dorso da língua (M).

#### 4.4. Isolamento e reidentificação preliminar das leveduras

Os microtubos contendo as amostras dos sítios A, B e M foram agitados em vórtex (Vortex MA 162, Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) por 30 seg. Em seguida, as amostras foram diluídas ( $10^{-1}$ ) e semeadas (100µL) em duplicata, sobre meio de cultura cromogênico Chromagar Candida® (CHROMagar Microbiology, Bioré, Paris, France) e incubadas a 37 °C em

aerobiose por 48 h. Após esse período, as mesmas foram analisadas quanto à coloração e morfologia e quanto à presença de cultura mista e/ou pura. Os isolados que assumiram cor verde nesse meio, sugestivos de *C.albicans* / *C. dubliniensis* foram diferenciados por teste de temperatura (42 °C e 45 °C) e teste de tolerância em meio Sabouraud hipertônico.

As amostras que não apresentaram coloração verde em CRHOMagar-Candida®, sugestivas de espécies “não *albicans*”, foram identificadas pelo sistema API20C® Aux System (BioMérieux, França) e por microcultivo (presença de hifas/pseudo-hifas, células leveduriformes e clamidósporos em agar-fubá-tween-80). Todas as amostras foram submetidas a testes de fermentação, assimilação de carboidratos e coloração de Gram para confirmação da pureza da cultura (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Baumgartner *et al.*, 1996; Berenguer *et al.*, 1996; Mehta *et al.*, 1999; Mata *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2000).

#### **4.5. Conservação das Amostras**

As cepas de *Candida* spp utilizadas nesse estudo, coletadas e processadas segundo procedimento anteriormente relatados, encontram-se disponíveis na Micoteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Diagnóstico Oral, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

A manutenção dos isolados foi conduzida de três diferentes maneiras:

- a)** em tubos de cultura de 5 mL de meio inclinado ágar Sabouraud dextrose (Merck, Darmstadt, Germany) recobertos com óleo mineral estéril em temperatura ambiente;
- b)** congelamento a -20 °C e a -70 °C em tubos de 1,5 mL contendo 750 µL da cultura de levedura e 750 µL de Yeast Peptone Dextrose-YPD-Glicerol a 30% estéril, sendo a concentração final de glicerol de 15%.

A composição dos meios de cultura utilizados nesse trabalho está descrita no anexo III.

#### **4.6. Reidentificação das cepas de *C. albicans* / *C. dubliniensis***

##### **4.6.1 Temperatura de Crescimento**

Uma pequena porção de uma única colônia foi removida de uma placa de Chromagar Candida® e semeada em placa contendo ágar Sabouraud dextrose, dividida em quatro quadrantes. A placa foi incubada a 45 °C durante 48 h, para crescimento. O crescimento das colônias estendido além de três quadrantes da placa foi considerado bom e sugestivo de *C. albicans*, cujo crescimento se dá a temperaturas mais elevadas (42 °C à 45 °C). Crescimento abrangendo um quadrante da placa foi considerado pequeno e sugestivo de *C. dubliniensis*, o qual tem seu melhor desenvolvimento em temperatura ambiente (30 °C), (Alves *et al.*, 2002).

##### **4.6.2 Teste de tolerância em meio Sabouraud Dextrose Hipertônico**

Organismos mantidos sob incubação durante 48 h em placas de agar Sabouraud dextrose foram colocados em suspensão de água destilada estéril ajustadas por espectrofotômetro, para se obter uma suspensão com 85% de transmitância a 530 nm. Alíquotas de 20 µL de cada inóculo foram adicionadas a tubos contendo 10 mL de meio Sabouraud Dextrose estéril, suplementado com 6,5% de cloreto de sódio, e em seguida incubadas por 96 h a 37 °C. As culturas foram visualmente examinadas para detecção de crescimento de células leveduriformes em intervalos de 24 h.

O resultado positivo foi definido após 96 h de incubação, quando houve crescimento leveduriforme nos tubos formando um “pellet” indicativo de *C. albicans*, já que o meio hipertônico é seletivo para *C. dubliniensis* (Alves *et al.* 2002).

#### **4.7. Identificação pelo sistema API 20C® das amostras não sugestivas de *C. albicans* ou *C. dubliniensis***

Uma suspensão da amostra da levedura foi preparada em água destilada estéril, e adicionada ao meio C (meio isento de fonte de carbono), fornecido pelo *kit* API 20C® (Aux System (BioMérieux, França). Esta suspensão foi dispensada em cada poço da galeria de carboidratos, e incubada por 72 h a 30 °C. A leitura foi feita em intervalos de 24 h até leitura final com 72 h, sendo a assimilação positiva indicada nos poços que apresentaram turvação superior àquela do controle negativo. A identificação final foi feita pela análise do padrão de assimilação de cada isolado – presença/ausência de crescimento em cada substrato – e pela comparação das reações ocorridas com a tabela de identificação fornecida pelo fabricante, o qual representa uma identificação da espécie de levedura no Catálogo Analítico API 20C (Anexo I).

#### **4.8. Análise da micromorfologia (microcultivo)**

Com a finalidade de complementar a identificação pelo método API 20C®, cada amostra foi semeada em três estrias sobre placa de Petri contendo agar fubá com Tween-80. As estrias foram cobertas com lamínula esterilizada e a placa incubada a 28 °C, durante 48 - 96 h. As leituras no microscópio óptico foram feitas diariamente, com objetivas de 10x e 40x. Foram observadas estruturas morfológicas como blastoconídios e pseudohifas, quando presentes.

#### **4.9. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos**

As amostras foram testadas em relação à sua suscetibilidade a antifúngicos pelo método da microdiluição em caldo, realizado de acordo com a padronização publicada no documento M27-A do “National Committee for Clinical Laboratories Standards” (NCCLS, 1997). Além dos isolados clínicos, em cada bateria de ensaios foi incluído um organismo padrão, *C. parapsilosis* (ATCC 22019) para a obtenção do controle de qualidade da atividade das drogas, uma vez que é conhecida a concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos utilizados, para

este microrganismo (Rex *et al.*, 1996; Wanger *et al.*, 1995; NCCLS, 1997). O meio utilizado nos testes foi o RPMI - 1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA) diluído apropriadamente em água destilada esterilizada e esterilizado por filtração em filtro biológico de 0,22  $\mu\text{m}$  (Corning Incorporated Costar, Corning, N.Y. USA).

A partir de um cultivo de 24 a 48 h da levedura testada foi preparada uma suspensão inicial em espectrofotômetro a 530nm, com transmitância ajustada para 90%. A partir desta suspensão foram feitas diluições seriadas para obtenção do inóculo final, em meio RPMI 1640, contendo  $0,5 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL. Cada droga testada foi diluída previamente, em dez diferentes concentrações, a saber: fluconazol 1,25 – 640  $\mu\text{g/mL}$ , itraconazol 0,078 – 40  $\mu\text{g/mL}$ , ketoconazol 0,15 – 80  $\mu\text{g/mL}$  e anfotericina B 0,3 – 160  $\mu\text{g/mL}$ . As diferentes concentrações de cada antifúngico foram novamente diluídas a 1:5 em RPMI-1640 e alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  destas concentrações dispensadas seqüencialmente nas placas de microtitulação, preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do inóculo final foram adicionadas em cada poço das placas de microdiluição, contendo as diferentes concentrações das drogas diluídas em meio RPMI, chegando-se às concentrações finais desejadas da droga e inóculo. As placas foram incubadas a 35°C por 48 h. A menor concentração capaz de induzir proeminente inibição (em torno de 50%) do crescimento da levedura testada, em relação ao poço controle, foi identificada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da droga para este microrganismo, em relação ao fluconazol, itraconazol e ketoconazol, e foram classificadas como Sensíveis (S), Suscetibilidade Dependente de Concentração (SDC) e Resistentes (R), de acordo com os valores de referência do NCCLS (1997) apresentados na Tabela 2. Para a anfotericina B, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi identificada como a menor concentração da droga no meio livre de crescimento da levedura, e foram classificadas como Sensíveis (S) ou Resistentes (R). Os valores de CIM 50 e CIM 90 indicam, respectivamente, a concentração da droga capaz de inibir 50% e 90% do total dos isolados.

**Tabela 2.** Critérios de classificação para susceptibilidade a fluconazol, itraconazol, ketoconazol e anfotericina B ( $\mu\text{g/mL}$ ). Valores de referência do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratories Standards M27-A, 1997).

|     | Fluconazol | Itraconazol  | Cetoconazol  | Anfotericina B |
|-----|------------|--------------|--------------|----------------|
| S   | $\leq 8$   | $\leq 0,125$ | $\leq 0,125$ | $\leq 1$       |
| SDC | 16 e 32    | 0,25 e 0,5   | 0,25 e 0,5   | —              |
| R   | $\geq 64$  | $\geq 1$     | $\geq 1$     | $\geq 2$       |

S = Sensível / SDC = Suscetibilidade dependente de concentração / R = Resistente

## ***5. RESULTADOS***

---

### **5.1. Identificação dos isolados de *Candida* spp.**

#### **5.1.1. Crescimento em Chromagar Candida® e características culturais em microcultivo.**

Os isolados de *Candida* spp relacionados na Tabela 1 foram estudados quanto ao crescimento em meio cromogênico Chromagar Candida®, para seleção prévia através da coloração e aspecto da colônia. Este meio permite obtenção de colônias com características fenotípicas inerentes, e assim um diagnóstico diferencial entre espécies de *Candida*. Em seguida, os isolados foram submetidos a teste de microcultivo para posterior verificação das características microscópicas das culturas quanto à formação de conídios. Os resultados obtidos estão mostrados nas Tabelas 3a e 3b e ilustrados na Figura 1. A Figura 2 ilustra a morfologia das colônias quanto a cor em Chromagar Candida®, e a Figura 3 as características microscópicas dos clamidoconídios e blastoconídios.

#### **5.1.2. Identificação pelo sistema API 20C® das amostras não sugestivas de *C. albicans* ou *C. dubliniensis*.**

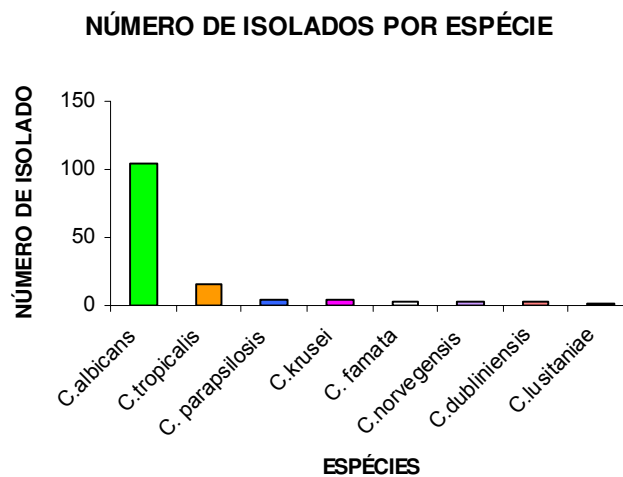
A identificação final dos isolados foi feita pela análise do padrão de assimilação de 20 diferentes carboidratos, através da verificação da presença ou ausência de crescimento, e pela comparação desses resultados com os da tabela de identificação fornecida pelo fabricante (Catálogo Analítico API 20C - Anexo I). Isso permitiu uma identificação das espécies de leveduras estudadas. Os resultados estão apresentados no Anexo II.

**Tabela 3a.** Resultados obtidos durante cultivo dos isolados de *Candida* spp em Chromagar Candida® e características microscópicas em microcultivo.

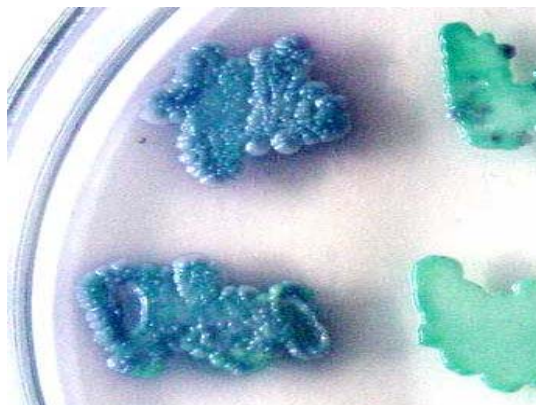
| Nº paciente / cód. amostra | Cor da Colônia | Tipo de Conídio | Espécie            | Nº paciente / cód. amostra | Cor da colônia | Tipo de Conídio | Espécie                |
|----------------------------|----------------|-----------------|--------------------|----------------------------|----------------|-----------------|------------------------|
| 1-B1                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 15-A2                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 1-B2                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 15-A3                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 1-B3                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 15-A4                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 1-B4                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 15-A5                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 1-B5                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 15-M1                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 1-M1                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 26-A2                      | Verde          | Clam            | <i>C. dubliniensis</i> |
| 1-M2                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 26-A3                      | Verde          | Clam            | <i>C. dubliniensis</i> |
| 1-M3                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 26-A4                      | Verde          | Clam            | <i>C. dubliniensis</i> |
| 1-M4                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 26-A6                      | Azul           | Blast           | <i>C. tropicalis</i>   |
| 1-M5                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 26-A7                      | Azul           | Blast           | <i>C. tropicalis</i>   |
| 3-A1                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 26-A8                      | Azul           | Blast           | <i>C. tropicalis</i>   |
| 3-A2                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 30-A6                      | Azul           | Blast           | <i>C. tropicalis</i>   |
| 3-A3                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 30-A7                      | Azul           | Blast           | <i>C. tropicalis</i>   |
| 3-A4                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 30-A8                      | Azul           | Blast           | <i>C. tropicalis</i>   |
| 3-A5                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 31-A1                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 3-M1                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 31-A2                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 3-M2                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 31-A3                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 3-M3                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 31-A4                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 3-M4                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 31-M1                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 3-M5                       | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 31-M2                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 13-A1                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 34-A6                      | Azul           | Blast           | <i>C. tropicalis</i>   |
| 13-A2                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 34-A7                      | Azul           | Blast           | <i>C. tropicalis</i>   |
| 13-A3                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 34-A8                      | Azul           | Blast           | <i>C. tropicalis</i>   |
| 13-A4                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 34-A9                      | Azul           | Blast           | <i>C. tropicalis</i>   |
| 13-A5                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 34-A10                     | Azul           | Blast           | <i>C. tropicalis</i>   |
| 14-A1                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 34-B2                      | Azul           | Blast           | <i>C. tropicalis</i>   |
| 14-A2                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 34-M2                      | Azul           | Blast           | <i>C. tropicalis</i>   |
| 14-A3                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 41-A1                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 14-A4                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 41-A2                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 14-A5                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 41-A3                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 14-B1                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 41-A4                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 14-M1                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 41-A5                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 14-M2                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 41-M1                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 14-M4                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 41-M2                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |
| 15-A1                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i> | 41-M3                      | Verde          | Clam            | <i>C. albicans</i>     |

**Tabela 3b.** Resultados obtidos durante cultivo dos isolados de *Candida* spp em Chromagar Candida® e características microscópicas em microcultivo.

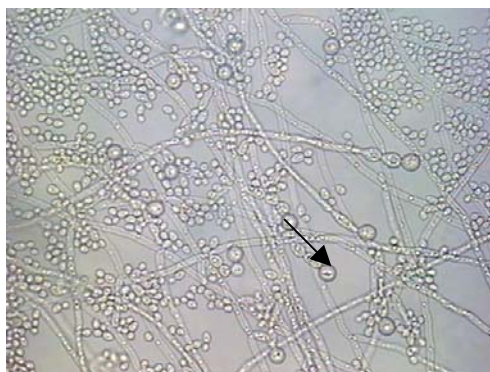
| N° pac. /<br>cód.<br>amostra | Cor da<br>colônia | Tipo de<br>Conídio | Espécie                | N° pac. /<br>cód.<br>amostra | Cor da<br>colônia | Tipo de<br>Conídio | Espécie               |
|------------------------------|-------------------|--------------------|------------------------|------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|
| 41-M4                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 55-A3                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 41-M5                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 55-A4                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 42-B1                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 55-A5                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 42-B2                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 55-B1                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 42-B3                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 55-B2                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 42-B4                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 55-B3                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 42-B5                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 55-B4                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 42-M1                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 55-B5                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 42-M2                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 55-M1                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 45-M1                        | Rosa              | Blast              | <i>C. parapsilosis</i> | 55-M4                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 45-M2                        | Rosa              | Blast              | <i>C. parapsilosis</i> | 56-M1                        | Branco            | Blast              | <i>C. famata</i>      |
| 45-M4                        | Rosa              | Blast              | <i>C. parapsilosis</i> | 56-M3                        | Branco            | Blast              | <i>C. krusei</i>      |
| 45-M5                        | Rosa              | Blast              | <i>C. parapsilosis</i> | 56-M4                        | Branco            | Blast              | <i>C. krusei</i>      |
| 46-M1                        | Rosa              | Blast              | <i>C. lusitaniae</i>   | 56-M5                        | Branco            | Blast              | <i>C. krusei</i>      |
| 47-A1                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 56-M6                        | Branco            | Blast              | <i>C. krusei</i>      |
| 47-A2                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 56-M7                        | Branco            | Blast              | <i>C. famata</i>      |
| 47-A3                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 56-M8                        | Branco            | Blast              | <i>C. famata</i>      |
| 47-A4                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 56-M9                        | Branco            | Blast              | <i>C. norvegensis</i> |
| 47-A5                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 56-M10                       | Branco            | Blast              | <i>C. norvegensis</i> |
| 47-M1                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 56-M11                       | Branco            | Blast              | <i>C. norvegensis</i> |
| 47-M2                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 58-A1                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 50-A1                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 58-A2                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 50-A2                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 58-A3                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 50-A3                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 58-A4                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 50-A4                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 58-A5                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 50-M1                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 58-B1                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 50-M2                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 58-B2                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 50-M3                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 58-B3                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 50-M4                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 58-B4                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 50-M6                        | Rosa              | Blast              | <i>C. parapsilosis</i> | 58-B5                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 53-M6                        | Azul              | Blast              | <i>C. tropicalis</i>   | 58-M1                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 53-M7                        | Azul              | Blast              | <i>C. tropicalis</i>   | 58-M2                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 53-M8                        | Azul              | Blast              | <i>C. tropicalis</i>   | 58-M3                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 55-A1                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 58-M4                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |
| 55-A2                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>     | 58-M5                        | Verde             | Clam               | <i>C. albicans</i>    |



**Figura 1.** Número de isolados por espécie após testes de microcultivo, Chromagar Candida® e API 20C®.



**Figura 2.** Ilustra o aspecto cromogênico dos isolados de *Candida tropicalis* (em azul) e *Candida albicans* (em verde).



(A)



(B)

**Figura 3.** Ilustra as características microscópicas dos clamidoconídios de *Candida dubliniensis* (A) e blastoconídios de *Candida tropicalis* (B). Aumento 40x.

### **5.1.3. Temperatura de crescimento e teste em Sabouraud Dextrose Hipertônico.**

Para identificação dos isolados, as colônias de cor verde foram ainda submetidas a teste de temperatura e de crescimento em Sabouraud Dextrose Hipertônico. Os resultados obtidos estão descritos nas Tabelas 4a e 4b.

### **5.1.4. Suscetibilidade aos antifúngicos**

Os isolados de *Candida* spp. foram estudados quanto a suscetibilidade aos antifúngicos fluconazol, itraconazol e ketoconazol, e foram classificados como Sensíveis (S), Suscetibilidade Dependente de Concentração (SDC) e Resistentes (R), de acordo com os valores de referência do NCCLS (1997) apresentados na Tabela 2. Para a anfotericina B, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi identificada como a menor concentração da droga no meio livre de crescimento da levedura, e classificados como Sensíveis (S) ou Resistentes (R). Os resultados estão apresentados nas Tabelas 5a a 8b e ilustrados nas Figuras 4a a 7c. A suscetibilidade dos isolados de *Candida* spp. também está expressa em valores de concentrações inibitórias mínimas denominados CIM 50 e CIM 90, os quais indicam, respectivamente, a concentração da droga capaz de inibir 50% e 90% do total dos isolados. Esses resultados estão representados na Tabela 9.

A Figura 8 ilustra uma placa de Elisa, exemplificando o teste de suscetibilidade de *C. albicans* ao fluconazol. O mesmo procedimento foi utilizado para os demais antifúngicos como descrito na metodologia do presente trabalho.

**Tabela 4a.** Temperatura de crescimento e teste em Sabouraud Dextrose Hipertônico.

| N° pac./<br>Cód.<br>amostra | Teste<br>Temperatura/<br>Quadrantes | Teste SDA<br>Hipertônico | N° pac./<br>Cód.<br>amostra | Teste<br>Temperatura/<br>Quadrantes | Teste SDA<br>Hipertônico |
|-----------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| 1-B1                        | 3                                   | +                        | 15-A2                       | 4                                   | +                        |
| 1-B2                        | 3                                   | +                        | 15-A3                       | 3                                   | +                        |
| 1-B3                        | 3                                   | +                        | 15-A4                       | 3                                   | +                        |
| 1-B4                        | 4                                   | +                        | 15-A5                       | 3                                   | +                        |
| 1-B5                        | 4                                   | +                        | 15-M1                       | 4                                   | +                        |
| 1-M1                        | 4                                   | +                        | 26-A2                       | 1                                   | -                        |
| 1-M2                        | 4                                   | +                        | 26-A3                       | 1                                   | -                        |
| 1-M3                        | 3                                   | +                        | 26-A4                       | 1                                   | -                        |
| 1-M4                        | 3                                   | +                        | 26-A6                       | -----                               | -----                    |
| 1-M5                        | 4                                   | +                        | 26-A7                       | -----                               | -----                    |
| 3-A1                        | 4                                   | +                        | 26-A8                       | -----                               | -----                    |
| 3-A2                        | 4                                   | +                        | 30-A6                       | -----                               | -----                    |
| 3-A3                        | 3                                   | +                        | 30-A7                       | -----                               | -----                    |
| 3-A4                        | 3                                   | +                        | 30-A8                       | -----                               | -----                    |
| 3-A5                        | 3                                   | +                        | 31-A1                       | 4                                   | +                        |
| 3-M1                        | 4                                   | +                        | 31-A2                       | 4                                   | +                        |
| 3-M2                        | 4                                   | +                        | 31-A3                       | 4                                   | +                        |
| 3-M3                        | 3                                   | +                        | 31-A4                       | 4                                   | +                        |
| 3-M4                        | 3                                   | +                        | 31-M1                       | 4                                   | +                        |
| 3-M5                        | 3                                   | +                        | 31-M2                       | 4                                   | +                        |
| 13-A1                       | 4                                   | +                        | 34-A6                       | -----                               | -----                    |
| 13-A2                       | 3                                   | +                        | 34-A7                       | -----                               | -----                    |
| 13-A3                       | 3                                   | +                        | 34-A8                       | -----                               | -----                    |
| 13-A4                       | 3                                   | +                        | 34-A9                       | -----                               | -----                    |
| 13-A5                       | 4                                   | +                        | 34-A10                      | -----                               | -----                    |
| 14-A1                       | 4                                   | +                        | 34-B2                       | -----                               | -----                    |
| 14-A2                       | 3                                   | +                        | 34-M2                       | -----                               | -----                    |
| 14-A3                       | 4                                   | +                        | 41-A1                       | 4                                   | +                        |
| 14-A4                       | 4                                   | +                        | 41-A2                       | 4                                   | +                        |
| 14-A5                       | 3                                   | +                        | 41-A3                       | 4                                   | +                        |
| 14-B1                       | 3                                   | +                        | 41-A4                       | 4                                   | +                        |
| 14-M1                       | 3                                   | +                        | 41-A5                       | 3                                   | +                        |
| 14-M2                       | 3                                   | +                        | 41-M1                       | 3                                   | +                        |
| 14-M4                       | 3                                   | +                        | 41-M2                       | 3                                   | +                        |
| 15-A1                       | 3                                   | +                        | 41-M3                       | 3                                   | +                        |

**Tabela 4b.** Temperatura de crescimento e teste em Sabouraud Dextrose Hipertônico.

| N° pac./<br>Cód.<br>amostra | Teste<br>Temperatura/<br>Quadrantes | Teste SDA<br>Hipertônico | N° pac./<br>Cód.<br>amostra | Teste<br>Temperatura/<br>Quadrantes | Teste SDA<br>Hipertônico |
|-----------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| 41-M4                       | 3                                   | +                        | 55-A3                       | 4                                   | +                        |
| 41-M5                       | 3                                   | +                        | 55-A4                       | 4                                   | +                        |
| 42-B1                       | 3                                   | +                        | 55-A5                       | 4                                   | +                        |
| 42-B2                       | 4                                   | +                        | 55-B1                       | 4                                   | +                        |
| 42-B3                       | 4                                   | +                        | 55-B2                       | 3                                   | +                        |
| 42-B4                       | 4                                   | +                        | 55-B3                       | 3                                   | +                        |
| 42-B5                       | 4                                   | +                        | 55-B4                       | 4                                   | +                        |
| 42-M1                       | 3                                   | +                        | 55-B5                       | 3                                   | +                        |
| 42-M2                       | 3                                   | +                        | 55-M1                       | 3                                   | +                        |
| 45-M1                       | -----                               | -----                    | 55-M4                       | 3                                   | +                        |
| 45-M2                       | -----                               | -----                    | 56-M1                       | -----                               | -----                    |
| 45-M4                       | -----                               | -----                    | 56-M3                       | -----                               | -----                    |
| 45-M5                       | -----                               | -----                    | 56-M4                       | -----                               | -----                    |
| 46-M1                       | -----                               | -----                    | 56-M5                       | -----                               | -----                    |
| 47-A1                       | 3                                   | +                        | 56-M6                       | -----                               | -----                    |
| 47-A2                       | 3                                   | +                        | 56-M7                       | -----                               | -----                    |
| 47-A3                       | 3                                   | +                        | 56-M8                       | -----                               | -----                    |
| 47-A4                       | 3                                   | +                        | 56-M9                       | -----                               | -----                    |
| 47-A5                       | 3                                   | +                        | 56-M10                      | -----                               | -----                    |
| 47-M1                       | 3                                   | +                        | 56-M11                      | -----                               | -----                    |
| 47-M2                       | 3                                   | +                        | 58-A1                       | 4                                   | +                        |
| 50-A1                       | 4                                   | +                        | 58-A2                       | 3                                   | +                        |
| 50-A2                       | 4                                   | +                        | 58-A3                       | 3                                   | +                        |
| 50-A3                       | 4                                   | +                        | 58-A4                       | 4                                   | +                        |
| 50-A4                       | 4                                   | +                        | 58-A5                       | 4                                   | +                        |
| 50-M1                       | 3                                   | +                        | 58-B1                       | 3                                   | +                        |
| 50-M2                       | 3                                   | +                        | 58-B2                       | 3                                   | +                        |
| 50-M3                       | 4                                   | +                        | 58-B3                       | 3                                   | +                        |
| 50-M4                       | 4                                   | +                        | 58-B4                       | 3                                   | +                        |
| 50-M6                       | -----                               | -----                    | 58-B5                       | 4                                   | +                        |
| 53-M6                       | -----                               | -----                    | 58-M1                       | 3                                   | +                        |
| 53-M7                       | -----                               | -----                    | 58-M2                       | 3                                   | +                        |
| 53-M8                       | -----                               | -----                    | 58-M3                       | 4                                   | +                        |
| 55-A1                       | 3                                   | +                        | 58-M4                       | 3                                   | +                        |
| 55-A2                       | 3                                   | +                        | 58-M5                       | 3                                   | +                        |

**TESTE DE TEMPERATURA**

----- teste não se aplica

1 quadrante sugestivo de *C. dubliniensis*3 a 4 quadrantes sugestivo de *C. albicans***TESTE SABOURAUD HIPERTÔNICO**

----- teste não se aplica

(+) para reação positiva (crescimento em sabouraud)

(-) para reação negativa (ausência de crescimento)

**Tabela 5a.** Suscetibilidade ao fluconazol de isolados de *Candida* spp provenientes de pacientes portadores de doença periodontal.

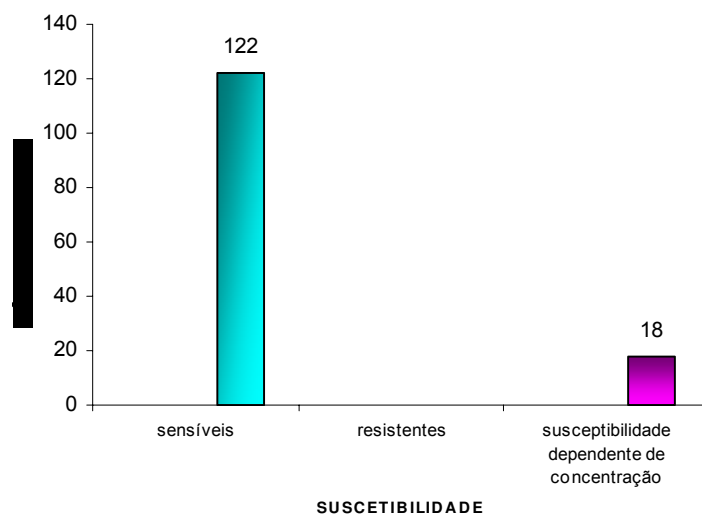
| N° pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie            | MIC<br>Fluconazol<br>µg/mL | Susceti-<br>bilidade | N° pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie                | MIC<br>Fluconazol<br>µg/mL | Susceti-<br>bilidade |
|------------------------------|--------------------|----------------------------|----------------------|------------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------|
| 1-B1                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                        | S                    | 15-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                        | S                    |
| 1-B2                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                        | S                    | 15-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                        | S                    |
| 1-B3                         | <i>C. albicans</i> | 8,0                        | S                    | 15-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,5                        | S                    |
| 1-B4                         | <i>C. albicans</i> | 8,0                        | S                    | 15-A5                        | <i>C. albicans</i>     | 0,5                        | S                    |
| 1-B5                         | <i>C. albicans</i> | 8,0                        | S                    | 15-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                        | S                    |
| 1-M1                         | <i>C. albicans</i> | 8,0                        | S                    | 26-A2                        | <i>C. dubliniensis</i> | 2,0                        | S                    |
| 1-M2                         | <i>C. albicans</i> | 8,0                        | S                    | 26-A3                        | <i>C. dubliniensis</i> | 2,0                        | S                    |
| 1-M3                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                        | S                    | 26-A4                        | <i>C. dubliniensis</i> | 2,0                        | S                    |
| 1-M4                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                        | S                    | 26-A6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 32                         | SDC                  |
| 1-M5                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                        | S                    | 26-A7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 4,0                        | S                    |
| 3-A1                         | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 26-A8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 8,0                        | S                    |
| 3-A2                         | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 30-A6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 16                         | SDC                  |
| 3-A3                         | <i>C. albicans</i> | 4,0                        | S                    | 30-A7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 16                         | SDC                  |
| 3-A4                         | <i>C. albicans</i> | 16                         | SDC                  | 30-A8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 16                         | SDC                  |
| 3-A5                         | <i>C. albicans</i> | 4,0                        | S                    | 31-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 8,0                        | S                    |
| 3-M1                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                        | S                    | 31-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                        | S                    |
| 3-M2                         | <i>C. albicans</i> | 0,125                      | S                    | 31-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                        | S                    |
| 3-M3                         | <i>C. albicans</i> | 4,0                        | S                    | 31-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                        | S                    |
| 3-M4                         | <i>C. albicans</i> | 4,0                        | S                    | 31-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                        | S                    |
| 3-M5                         | <i>C. albicans</i> | 0,125                      | S                    | 31-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,125                      | S                    |
| 13-A1                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                        | S                    | 34-A6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 32                         | SDC                  |
| 13-A2                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 34-A7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 16                         | SDC                  |
| 13-A3                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 34-A8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,125                      | S                    |
| 13-A4                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 34-A9                        | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                        | S                    |
| 13-A5                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 34-A10                       | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                        | S                    |
| 14-A1                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 34-B2                        | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                        | S                    |
| 14-A2                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 34-M2                        | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                        | S                    |
| 14-A3                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 41-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                        | S                    |
| 14-A4                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 41-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                    |
| 14-A5                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 41-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                    |
| 14-B1                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 41-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                    |
| 14-M1                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 41-A5                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                    |
| 14-M2                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 41-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                    |
| 14-M4                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                        | S                    | 41-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                    |
| 15-A1                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                        | S                    | 41-M3                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                    |

Suscetibilidade: Sensível (S) / Resistente (R) / Suscetibilidade dependente de Concentração (SDC).

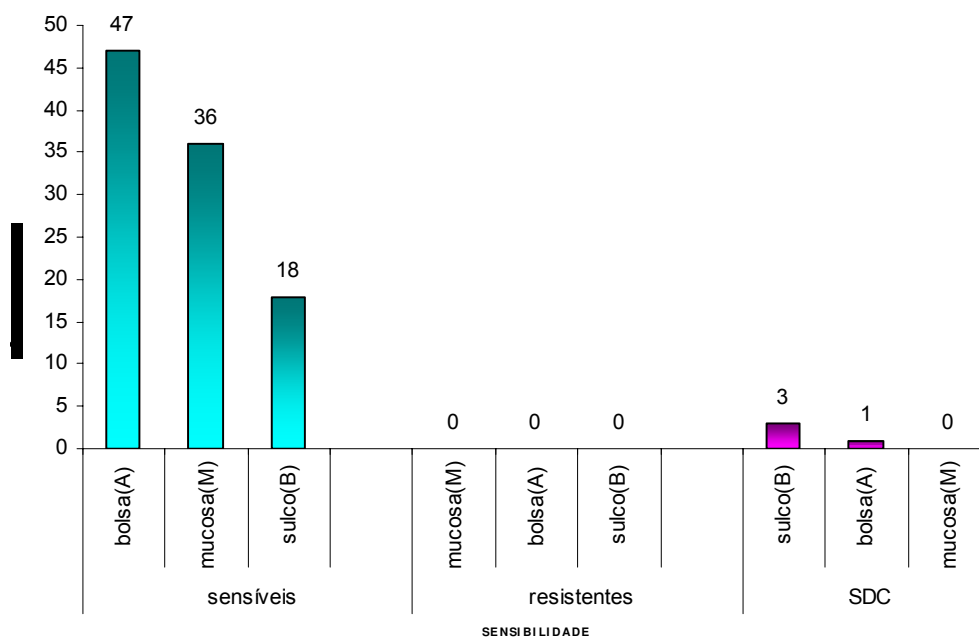
**Tabela 5b.** Suscetibilidade ao fluconazol de isolados de *Candida* spp provenientes de pacientes portadores de doença periodontal.

| N° pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie                | MIC<br>Fluconazol<br>µg/mL | Suscteti-<br>bilidade | N° pac. /<br>Cód.<br>amostra | Espécie               | MIC<br>Fluconazol<br>µg/mL | Suscteti-<br>bilidade |
|------------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|
| 41-M4                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                     | 55-A3                        | <i>C. albicans</i>    | 1,0                        | S                     |
| 41-M5                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                     | 55-A4                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                        | S                     |
| 42-B1                        | <i>C. albicans</i>     | 8,0                        | S                     | 55-A5                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                        | S                     |
| 42-B2                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                     | 55-B1                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                        | S                     |
| 42-B3                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                        | S                     | 55-B2                        | <i>C. albicans</i>    | 1,0                        | S                     |
| 42-B4                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                     | 55-B3                        | <i>C. albicans</i>    | 1,0                        | S                     |
| 42-B5                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                     | 55-B4                        | <i>C. albicans</i>    | 1,0                        | S                     |
| 42-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                        | S                     | 55-B5                        | <i>C. albicans</i>    | 1,0                        | S                     |
| 42-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                        | S                     | 55-M1                        | <i>C. albicans</i>    | 0,125                      | S                     |
| 45-M1                        | <i>C. parapsilosis</i> | 16                         | SDC                   | 55-M4                        | <i>C. albicans</i>    | 1,0                        | S                     |
| 45-M2                        | <i>C. parapsilosis</i> | 2,0                        | S                     | 56-M1                        | <i>C. famata</i>      | 1,0                        | S                     |
| 45-M4                        | <i>C. parapsilosis</i> | 32                         | SDC                   | 56-M3                        | <i>C. krusei</i>      | 32                         | SDC                   |
| 45-M5                        | <i>C. parapsilosis</i> | 32                         | SDC                   | 56-M4                        | <i>C. krusei</i>      | 32                         | SDC                   |
| 46-M1                        | <i>C. lusitaniae</i>   | 4,0                        | S                     | 56-M5                        | <i>C. krusei</i>      | 1,0                        | S                     |
| 47-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 8,0                        | S                     | 56-M6                        | <i>C. krusei</i>      | 32                         | SDC                   |
| 47-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                        | S                     | 56-M7                        | <i>C. famata</i>      | 1,0                        | S                     |
| 47-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,125                      | S                     | 56-M8                        | <i>C. famata</i>      | 1,0                        | S                     |
| 47-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                        | S                     | 56-M9                        | <i>C. norvegensis</i> | 1,0                        | S                     |
| 47-A5                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                     | 56-M10                       | <i>C. norvegensis</i> | 0,5                        | S                     |
| 47-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                        | S                     | 56-M11                       | <i>C. norvegensis</i> | 0,5                        | S                     |
| 47-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                        | S                     | 58-A1                        | <i>C. albicans</i>    | 0,5                        | S                     |
| 50-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                        | S                     | 58-A2                        | <i>C. albicans</i>    | 1,0                        | S                     |
| 50-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                        | S                     | 58-A3                        | <i>C. albicans</i>    | 0,125                      | S                     |
| 50-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,5                        | S                     | 58-A4                        | <i>C. albicans</i>    | 1,0                        | S                     |
| 50-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                        | S                     | 58-A5                        | <i>C. albicans</i>    | 1,0                        | S                     |
| 50-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                     | 58-B1                        | <i>C. albicans</i>    | 1,0                        | S                     |
| 50-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                        | S                     | 58-B2                        | <i>C. albicans</i>    | 8,0                        | S                     |
| 50-M3                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                        | S                     | 58-B3                        | <i>C. albicans</i>    | 16                         | SDC                   |
| 50-M4                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                        | S                     | 58-B4                        | <i>C. albicans</i>    | 16                         | SDC                   |
| 50-M6                        | <i>C. parapsilosis</i> | 16                         | SDC                   | 58-B5                        | <i>C. albicans</i>    | 16                         | SDC                   |
| 53-M6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 32                         | SDC                   | 58-M1                        | <i>C. albicans</i>    | 2,0                        | S                     |
| 53-M7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 1,0                        | S                     | 58-M2                        | <i>C. albicans</i>    | 8,0                        | S                     |
| 53-M8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,250                      | S                     | 58-M3                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                        | S                     |
| 55-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                        | S                     | 58-M4                        | <i>C. albicans</i>    | 8,0                        | S                     |
| 55-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                        | S                     | 58-M5                        | <i>C. albicans</i>    | 8,0                        | S                     |

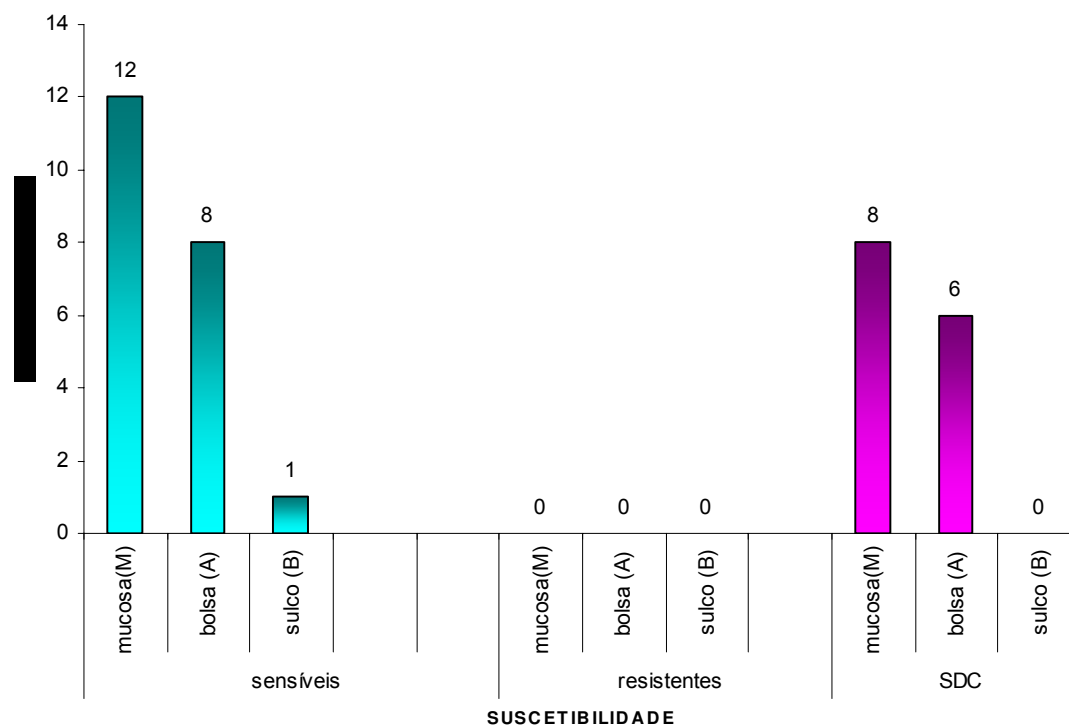
Suscetibilidade: Sensível (S) / Resistente (R) / Suscetibilidade dependente de Concentração (SDC).



**Figura 4a:** Suscetibilidade dos isolados de *Candida* spp. ao Fluconazol.



**Figura 4b:** Suscetibilidade dos isolados de *Candida albicans*. ao Fluconazol em relação aos sítios coletados.



**Figura 4c:** Suscetibilidade dos isolados de *Candida non-albicans* ao Fluconazol em relação aos sítios coletados.

**Tabela 6a.** Suscetibilidade ao itraconazol de isolados de *Candida* spp provenientes de pacientes portadores de doença periodontal.

| N° pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie            | MIC<br>Itraconazol<br>µg/mL | Susceti-<br>bilidade | N° pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie                | MIC<br>Itraconazol<br>µg/mL | Susceti-<br>bilidade |
|------------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|
| 1-B1                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 15-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  |
| 1-B2                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 15-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  |
| 1-B3                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 15-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  |
| 1-B4                         | <i>C. albicans</i> | 0,125                       | S                    | 15-A5                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  |
| 1-B5                         | <i>C. albicans</i> | 0,125                       | S                    | 15-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  |
| 1-M1                         | <i>C. albicans</i> | 0,125                       | S                    | 26-A2                        | <i>C. dubliniensis</i> | 0,125                       | S                    |
| 1-M2                         | <i>C. albicans</i> | 0,25                        | S                    | 26-A3                        | <i>C. dubliniensis</i> | 0,125                       | S                    |
| 1-M3                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 26-A4                        | <i>C. dubliniensis</i> | 0,060                       | S                    |
| 1-M4                         | <i>C. albicans</i> | 0,50                        | SDC                  | 26-A6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                         | R                    |
| 1-M5                         | <i>C. albicans</i> | 0250                        | SDC                  | 26-A7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,250                       | SDC                  |
| 3-A1                         | <i>C. albicans</i> | 0,030                       | S                    | 26-A8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,250                       | SDC                  |
| 3-A2                         | <i>C. albicans</i> | 0,030                       | S                    | 30-A6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 1,0                         | R                    |
| 3-A3                         | <i>C. albicans</i> | 0,125                       | S                    | 30-A7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,50                        | SDC                  |
| 3-A4                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 30-A8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 1,0                         | R                    |
| 3-A5                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 31-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,125                       | S                    |
| 3-M1                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 31-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  |
| 3-M2                         | <i>C. albicans</i> | 0,007                       | S                    | 31-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  |
| 3-M3                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 31-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,125                       | S                    |
| 3-M4                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 31-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  |
| 3-M5                         | <i>C. albicans</i> | 0,50                        | SDC                  | 31-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,007                       | S                    |
| 13-A1                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 34-A6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                         | R                    |
| 13-A2                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 34-A7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 1,0                         | R                    |
| 13-A3                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 34-A8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,007                       | S                    |
| 13-A4                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 34-A9                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,50                        | SDC                  |
| 13-A5                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 34-A10                       | <i>C. tropicalis</i>   | 0,0                         | SDC                  |
| 14-A1                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 34-B2                        | <i>C. tropicalis</i>   | 1,0                         | R                    |
| 14-A2                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 34-M2                        | <i>C. tropicalis</i>   | 1,0                         | R                    |
| 14-A3                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 41-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  |
| 14-A4                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 41-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  |
| 14-A5                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 41-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  |
| 14-B1                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 41-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  |
| 14-M1                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 41-A5                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  |
| 14-M2                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 41-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  |
| 14-M4                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 41-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  |
| 15-A1                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                  | 41-M3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  |

Suscetibilidade: Sensível (S) / Resistente (R) / Suscetibilidade dependente de Concentração (SDC).

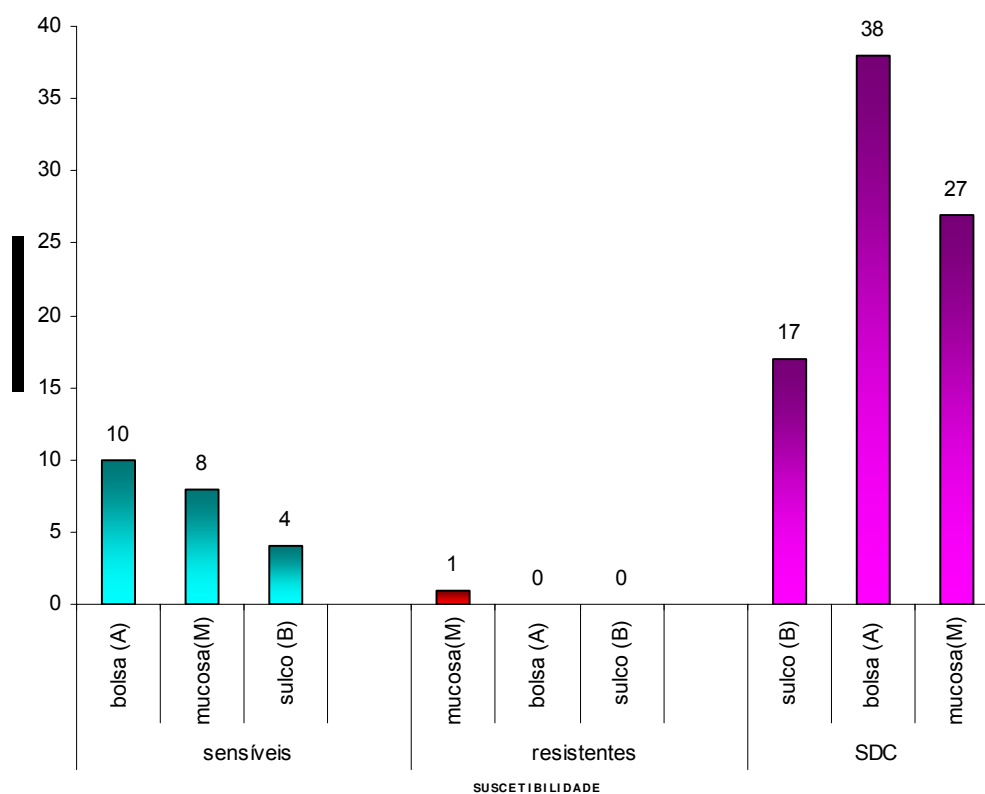
**Tabela 6b.** Suscetibilidade ao itraconazol de isolados de *Candida* spp provenientes de pacientes portadores de doença periodontal.

| Nº pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie                | MIC<br>Itraconazol<br>µg/mL | Susceti-<br>bilidade | Nº pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie               | MIC<br>Itraconazol<br>µg/mL | Susceti-<br>bilidade |
|------------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------|
| 41-M4                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                         | R                    | 55-A3                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 41-M5                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-A4                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 42-B1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-A5                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 42-B2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-B1                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 42-B3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-B2                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 42-B4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-B3                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 42-B5                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-B4                        | <i>C. albicans</i>    | 0,125                       | S                    |
| 42-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-B5                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 42-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,007                       | S                    | 55-M1                        | <i>C. albicans</i>    | 0,007                       | S                    |
| 45-M1                        | <i>C. parapsilosis</i> | 1,0                         | R                    | 55-M4                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 45-M2                        | <i>C. parapsilosis</i> | 2,0                         | R                    | 56-M1                        | <i>C. famata</i>      | 0,125                       | S                    |
| 45-M4                        | <i>C. parapsilosis</i> | 2,0                         | R                    | 56-M3                        | <i>C. krusei</i>      | 1,0                         | R                    |
| 45-M5                        | <i>C. parapsilosis</i> | 2,0                         | R                    | 56-M4                        | <i>C. krusei</i>      | 2,0                         | R                    |
| 46-M1                        | <i>C. lusitanae</i>    | 0,250                       | SDC                  | 56-M5                        | <i>C. krusei</i>      | 0,125                       | S                    |
| 47-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  | 56-M6                        | <i>C. krusei</i>      | 2,0                         | R                    |
| 47-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  | 56-M7                        | <i>C. famata</i>      | 0,250                       | SDC                  |
| 47-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,007                       | S                    | 56-M8                        | <i>C. famata</i>      | 0,125                       | S                    |
| 47-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,030                       | S                    | 56-M9                        | <i>C. norvegensis</i> | 0,060                       | S                    |
| 47-A5                        | <i>C. albicans</i>     | 0,007                       | S                    | 56-M10                       | <i>C. norvegensis</i> | 0,015                       | S                    |
| 47-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 56-M11                       | <i>C. norvegensis</i> | 0,030                       | S                    |
| 47-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-A1                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 50-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-A2                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 50-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-A3                        | <i>C. albicans</i>    | 0,007                       | S                    |
| 50-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  | 58-A4                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 50-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,007                       | S                    | 58-A5                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 50-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,007                       | S                    | 58-B1                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 50-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  | 58-B2                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 50-M3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-B3                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 50-M4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-B4                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 50-M6                        | <i>C. parapsilosis</i> | 0,50                        | SDC                  | 58-B5                        | <i>C. albicans</i>    | 0,125                       | S                    |
| 53-M6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                         | R                    | 58-M1                        | <i>C. albicans</i>    | 0,030                       | S                    |
| 53-M7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,125                       | S                    | 58-M2                        | <i>C. albicans</i>    | 0,50                        | SDC                  |
| 53-M8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,030                       | S                    | 58-M3                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 55-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-M4                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 55-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-M5                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |

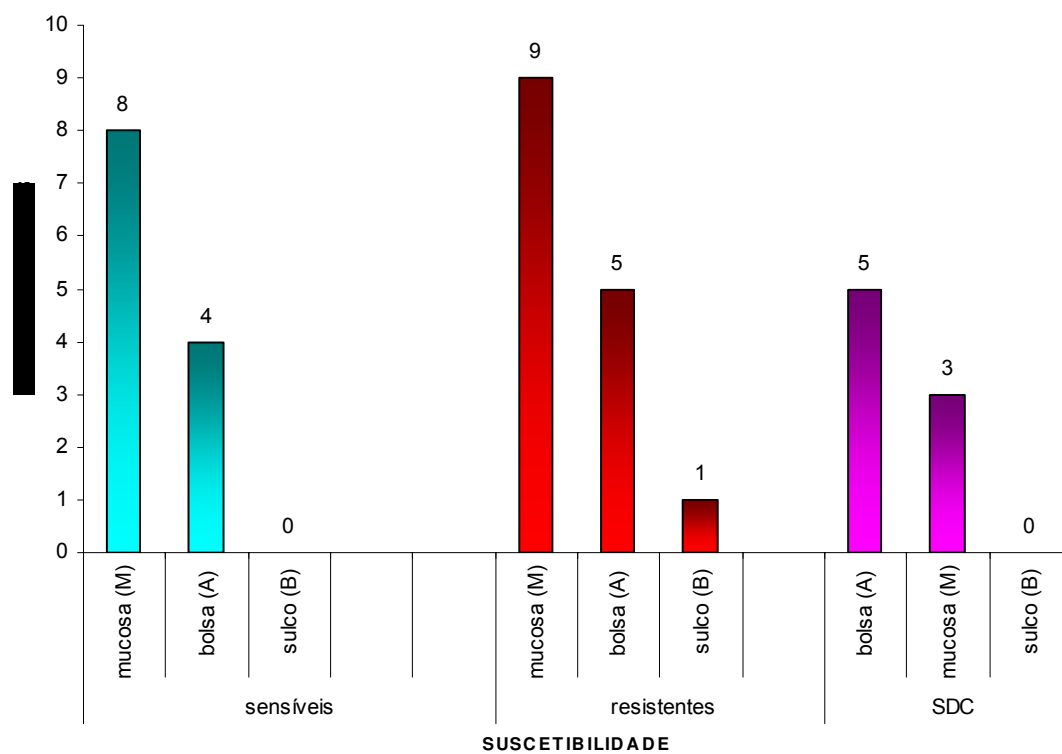
Suscetibilidade: Sensível (S) / Resistente (R) / Suscetibilidade dependente de Concentração (SDC).



**Figura 5a:** Suscetibilidade dos isolados de *Candida* spp. ao Itraconazol.



**Figura 5b:** Suscetibilidade dos isolados de *Candida albicans*. ao Itraconazol em relação aos sítios coletados.



**Figura 5c:** Suscetibilidade dos isolados de *Candida* não *albicans*. ao Itraconazol em relação aos sítios coletados.

**Tabela 7a.** Suscetibilidade ao cetoconazol de isolados de *Candida* spp provenientes de pacientes portadores de doença periodontal.

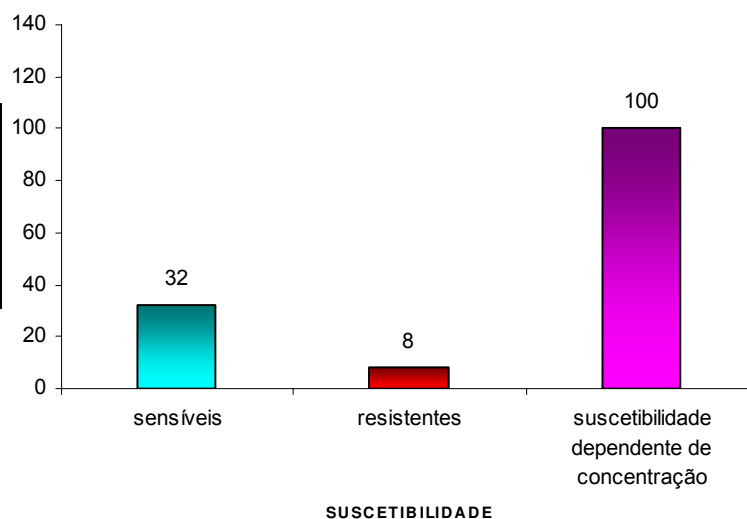
| N° pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie            | MIC<br>Cetoconazol<br>µg/mL | Suscti-<br>bilidade | N° pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie                | MIC<br>Cetoconazol<br>µg/mL | Suscti-<br>bilidade |
|------------------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------|
| 1-B1                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 15-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                 |
| 1-B2                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 15-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                 |
| 1-B3                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 15-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                 |
| 1-B4                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 15-A5                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                 |
| 1-B5                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 15-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                 |
| 1-M1                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 26-A2                        | <i>C. dubliniensis</i> | 0,06                        | S                   |
| 1-M2                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 26-A3                        | <i>C. dubliniensis</i> | 0,125                       | S                   |
| 1-M3                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 26-A4                        | <i>C. dubliniensis</i> | 0,125                       | S                   |
| 1-M4                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 26-A6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,50                        | SDC                 |
| 1-M5                         | <i>C. albicans</i> | 0,50                        | SDC                 | 26-A7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,250                       | SDC                 |
| 3-A1                         | <i>C. albicans</i> | 0,06                        | S                   | 26-A8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,250                       | SDC                 |
| 3-A2                         | <i>C. albicans</i> | 0,06                        | S                   | 30-A6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,250                       | SDC                 |
| 3-A3                         | <i>C. albicans</i> | 0,06                        | S                   | 30-A7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,250                       | SDC                 |
| 3-A4                         | <i>C. albicans</i> | 0,50                        | SDC                 | 30-A8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,125                       | SDC                 |
| 3-A5                         | <i>C. albicans</i> | 0,50                        | SDC                 | 31-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                 |
| 3-M1                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 31-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                 |
| 3-M2                         | <i>C. albicans</i> | 0,015                       | S                   | 31-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                 |
| 3-M3                         | <i>C. albicans</i> | 0,50                        | SDC                 | 31-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                 |
| 3-M4                         | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 31-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                 |
| 3-M5                         | <i>C. albicans</i> | 0,015                       | S                   | 31-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,015                       | S                   |
| 13-A1                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 34-A6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,50                        | SDC                 |
| 13-A2                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 34-A7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,250                       | SDC                 |
| 13-A3                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 34-A8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,015                       | S                   |
| 13-A4                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 34-A9                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,030                       | S                   |
| 13-A5                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 34-A10                       | <i>C. tropicalis</i>   | 0,030                       | S                   |
| 14-A1                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 34-B2                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,015                       | S                   |
| 14-A2                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 34-M2                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,030                       | S                   |
| 14-A3                        | <i>C. albicans</i> | 0,250                       | SDC                 | 41-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,125                       | S                   |
| 14-A4                        | <i>C. albicans</i> | 0,50                        | SDC                 | 41-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                         | R                   |
| 14-A5                        | <i>C. albicans</i> | 0,50                        | SDC                 | 41-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                 |
| 14-B1                        | <i>C. albicans</i> | 0,50                        | SDC                 | 41-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                 |
| 14-M1                        | <i>C. albicans</i> | 0,50                        | SDC                 | 41-A5                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                 |
| 14-M2                        | <i>C. albicans</i> | 0,50                        | SDC                 | 41-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                 |
| 14-M4                        | <i>C. albicans</i> | 0,50                        | SDC                 | 41-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                 |
| 15-A1                        | <i>C. albicans</i> | 0,50                        | SDC                 | 41-M3                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                         | R                   |

Suscetibilidade: Sensível (S) / Resistente (R) / Suscetibilidade dependente de Concentração (SDC).

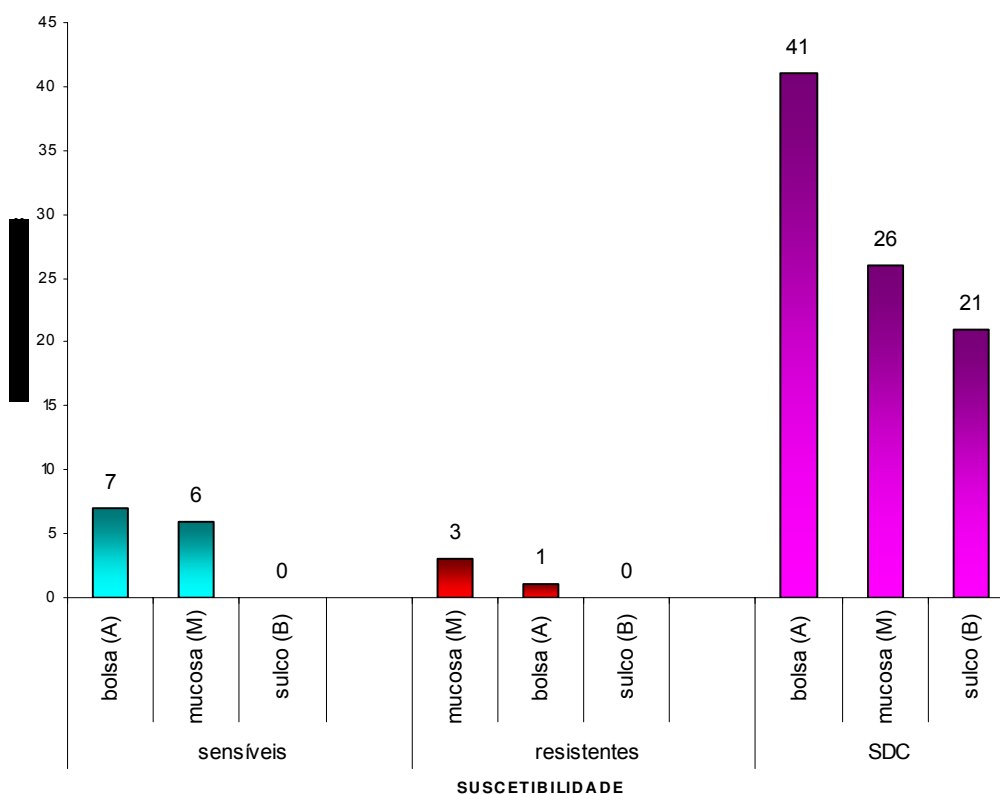
**Tabela 7b.** Suscetibilidade ao cetoconazol de isolados de *Candida* spp provenientes de pacientes portadores de doença periodontal.

| N° pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie                | MIC<br>Cetoconazol<br>µg/mL | Susce-<br>tibilidade | N° pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie               | MIC<br>Cetoconazol<br>µg/mL | Susce-<br>tibilidade |
|------------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------|
| 41-M4                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                         | R                    | 55-A3                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 41-M5                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-A4                        | <i>C. albicans</i>    | 0,50                        | SDC                  |
| 42-B1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-A5                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 42-B2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-B1                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 42-B3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-B2                        | <i>C. albicans</i>    | 0,50                        | SDC                  |
| 42-B4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-B3                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 42-B5                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-B4                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 42-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 55-B5                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 42-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 1,0                         | R                    | 55-M1                        | <i>C. albicans</i>    | 0015                        | S                    |
| 45-M1                        | <i>C. parapsilosis</i> | 0,50                        | SDC                  | 55-M4                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 45-M2                        | <i>C. parapsilosis</i> | 1,0                         | R                    | 56-M1                        | <i>C. famata</i>      | 0,060                       | S                    |
| 45-M4                        | <i>C. parapsilosis</i> | 1,0                         | R                    | 56-M3                        | <i>C. krusei</i>      | 0,50                        | SDC                  |
| 45-M5                        | <i>C. parapsilosis</i> | 0,06                        | S                    | 56-M4                        | <i>C. krusei</i>      | 1,0                         | R                    |
| 46-M1                        | <i>C. lusitanae</i>    | 0,50                        | SDC                  | 56-M5                        | <i>C. krusei</i>      | 0,015                       | S                    |
| 47-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  | 56-M6                        | <i>C. krusei</i>      | 1,0                         | R                    |
| 47-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  | 56-M7                        | <i>C. famata</i>      | 0,030                       | S                    |
| 47-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,015                       | S                    | 56-M8                        | <i>C. famata</i>      | 0,015                       | S                    |
| 47-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  | 56-M9                        | <i>C. norvegensis</i> | 0,030                       | S                    |
| 47-A5                        | <i>C. albicans</i>     | 0,015                       | S                    | 56-M10                       | <i>C. norvegensis</i> | 0,030                       | S                    |
| 47-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  | 56-M11                       | <i>C. norvegensis</i> | 0,015                       | S                    |
| 47-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  | 58-A1                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 50-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-A2                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 50-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-A3                        | <i>C. albicans</i>    | 0,015                       | S                    |
| 50-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  | 58-A4                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 50-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-A5                        | <i>C. albicans</i>    | 0,50                        | SDC                  |
| 50-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-B1                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 50-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,50                        | SDC                  | 58-B2                        | <i>C. albicans</i>    | 0,50                        | SDC                  |
| 50-M3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-B3                        | <i>C. albicans</i>    | 0,50                        | SDC                  |
| 50-M4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,06                        | S                    | 58-B4                        | <i>C. albicans</i>    | 0,50                        | SDC                  |
| 50-M6                        | <i>C. parapsilosis</i> | 0,015                       | S                    | 58-B5                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 53-M6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,50                        | SDC                  | 58-M1                        | <i>C. albicans</i>    | 0,125                       | S                    |
| 53-M7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,030                       | S                    | 58-M2                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                       | SDC                  |
| 53-M8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,030                       | S                    | 58-M3                        | <i>C. albicans</i>    | 0,50                        | SDC                  |
| 55-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-M4                        | <i>C. albicans</i>    | 0,50                        | SDC                  |
| 55-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                       | SDC                  | 58-M5                        | <i>C. albicans</i>    | 0,50                        | SDC                  |

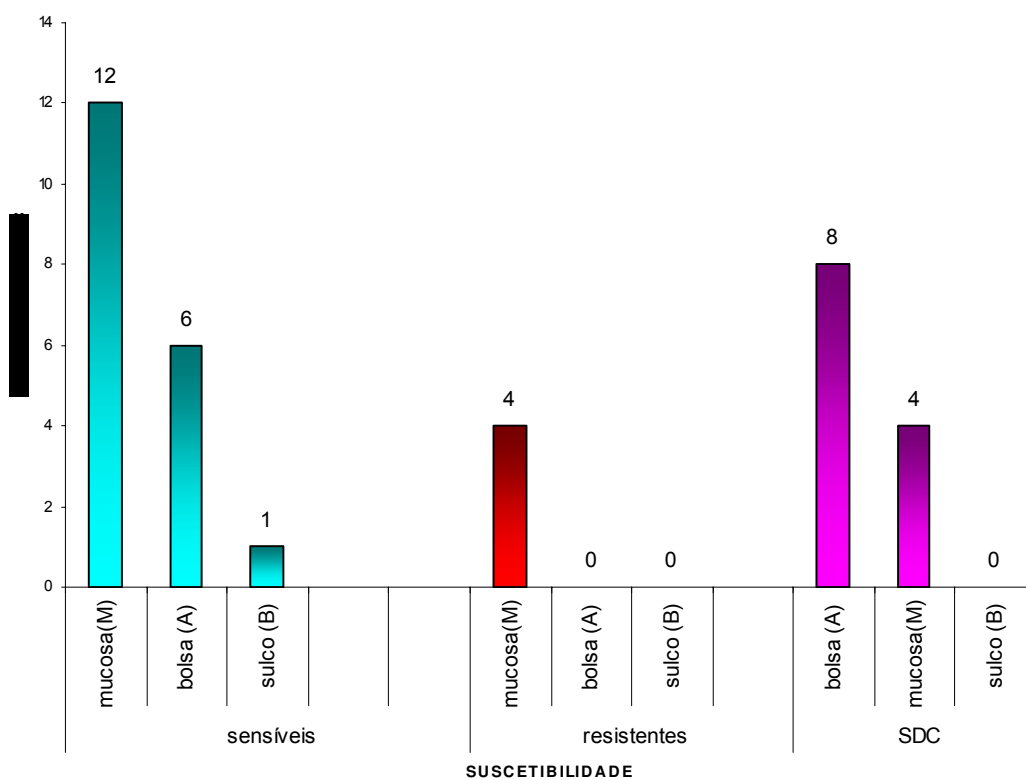
Suscetibilidade: Sensível (S) / Resistente (R) / Suscetibilidade dependente de Concentração (SDC).



**Figura 6a:** Suscetibilidade dos isolados de *Candida* spp. ao Cetoconazol.



**Figura 6b:** Suscetibilidade dos isolados de *Candida albicans*. ao Cetoconazol em relação aos sítios coletados.



**Figura 6c:** Suscetibilidade dos isolados de *Cândida* não *albicans*. ao Cetoconazol em relação aos sítios coletados.

**Tabela 8a.** Suscetibilidade a anfotericina B de isolados de *Candida* spp provenientes de pacientes portadores de doença periodontal.

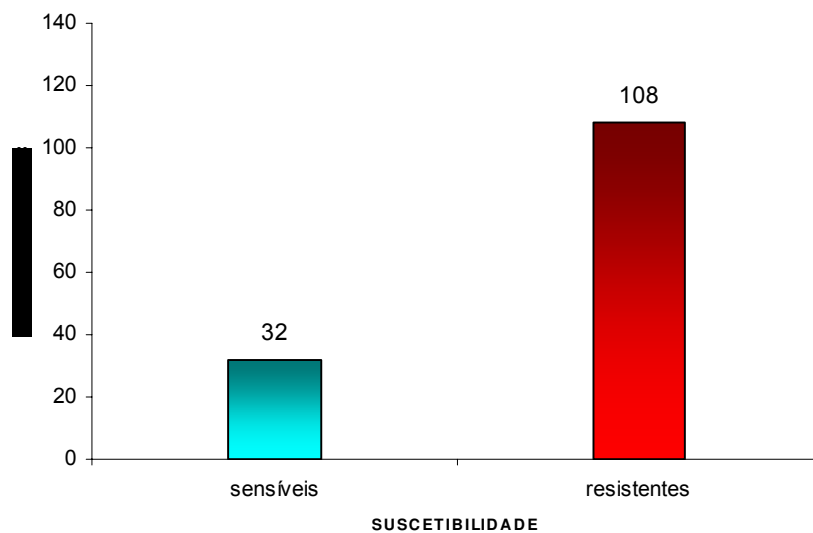
| Nº pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie            | MIC<br>Anfotericina B<br>µg/mL | Susceti-<br>bilidade | Nº pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie                | MIC<br>Anfotericina B<br>µg/mL | Susceti-<br>bilidade |
|------------------------------|--------------------|--------------------------------|----------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------|----------------------|
| 1-B1                         | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 15-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                    |
| 1-B2                         | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 15-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                    |
| 1-B3                         | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 15-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                    |
| 1-B4                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                            | S                    | 15-A5                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                    |
| 1-B5                         | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 15-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                    |
| 1-M1                         | <i>C. albicans</i> | 0,125                          | S                    | 26-A2                        | <i>C. dubliniensis</i> | 2,0                            | R                    |
| 1-M2                         | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 26-A3                        | <i>C. dubliniensis</i> | 2,0                            | R                    |
| 1-M3                         | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 26-A4                        | <i>C. dubliniensis</i> | 1,0                            | S                    |
| 1-M4                         | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 26-A6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,062                          | S                    |
| 1-M5                         | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | S                    | 26-A7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,062                          | S                    |
| 3-A1                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                            | S                    | 26-A8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                            | R                    |
| 3-A2                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                            | S                    | 30-A6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                            | R                    |
| 3-A3                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                            | S                    | 30-A7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                            | R                    |
| 3-A4                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                            | S                    | 30-A8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 4,0                            | R                    |
| 3-A5                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                            | S                    | 31-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                          | S                    |
| 3-M1                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                            | S                    | 31-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                          | S                    |
| 3-M2                         | <i>C. albicans</i> | 0,062                          | S                    | 31-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                          | S                    |
| 3-M3                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                            | S                    | 31-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                          | S                    |
| 3-M4                         | <i>C. albicans</i> | 1,0                            | S                    | 31-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 0,250                          | S                    |
| 3-M5                         | <i>C. albicans</i> | 0,03                           | S                    | 31-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 0,031                          | S                    |
| 13-A1                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 34-A6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                            | R                    |
| 13-A2                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 34-A7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 4,0                            | R                    |
| 13-A3                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 34-A8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,031                          | S                    |
| 13-A4                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 34-A9                        | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                            | R                    |
| 13-A5                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 34-A10                       | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                            | R                    |
| 14-A1                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 34-B2                        | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                            | R                    |
| 14-A2                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 34-M2                        | <i>C. tropicalis</i>   | 2,0                            | R                    |
| 14-A3                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 41-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 8,0                            | R                    |
| 14-A4                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 41-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                    |
| 14-A5                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 41-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                    |
| 14-B1                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 41-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                    |
| 14-M1                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 41-A5                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                    |
| 14-M2                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 41-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                    |
| 14-M4                        | <i>C. albicans</i> | 4,0                            | R                    | 41-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                    |
| 15-A1                        | <i>C. albicans</i> | 2,0                            | R                    | 41-M3                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                    |

Suscetibilidade: Sensível (S) / Resistente (R) / Suscetibilidade dependente de Concentração (SDC).

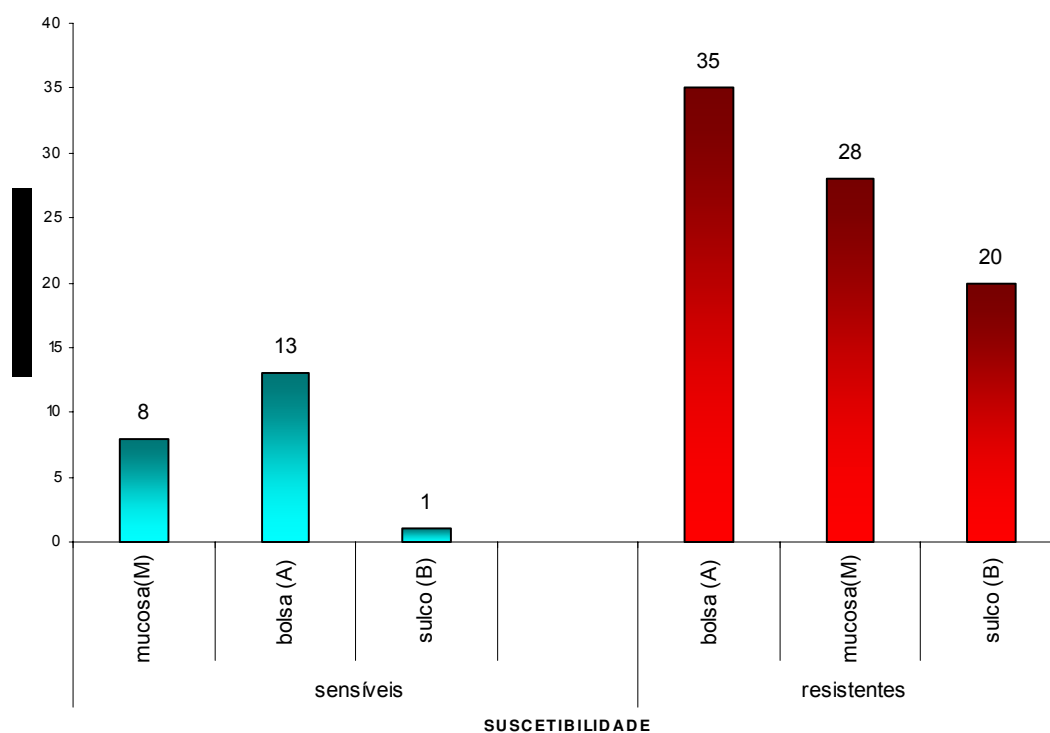
**Tabela 8b.** Suscetibilidade a anfotericina B de isolados de *Candida* spp provenientes de pacientes portadores de doença periodontal.

| N° pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie                | MIC<br>Anfotericina B<br>µg/mL | Suscti-<br>bilidade | N° pac. /<br>cód.<br>amostra | Espécie               | MIC<br>Anfotericina B<br>µg/mL | Suscti-<br>bilidade |
|------------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------|
| 41-M4                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                   | 55-A3                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 41-M5                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                   | 55-A4                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 42-B1                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                   | 55-A5                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 42-B2                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                   | 55-B1                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 42-B3                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                   | 55-B2                        | <i>C. albicans</i>    | 2,0                            | R                   |
| 42-B4                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                   | 55-B3                        | <i>C. albicans</i>    | 2,0                            | R                   |
| 42-B5                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                   | 55-B4                        | <i>C. albicans</i>    | 2,0                            | R                   |
| 42-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                   | 55-B5                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 42-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                   | 55-M1                        | <i>C. albicans</i>    | 0,031                          | S                   |
| 45-M1                        | <i>C. parapsilosis</i> | 2,0                            | R                   | 55-M4                        | <i>C. albicans</i>    | 2,0                            | R                   |
| 45-M2                        | <i>C. parapsilosis</i> | 0,031                          | S                   | 56-M1                        | <i>C. famata</i>      | 4,0                            | R                   |
| 45-M4                        | <i>C. parapsilosis</i> | 0,5                            | S                   | 56-M3                        | <i>C. krusei</i>      | 4,0                            | R                   |
| 45-M5                        | <i>C. parapsilosis</i> | 0,5                            | S                   | 56-M4                        | <i>C. krusei</i>      | 4,0                            | R                   |
| 46-M1                        | <i>C. lusitaniae</i>   | 8,0                            | R                   | 56-M5                        | <i>C. krusei</i>      | 4,0                            | R                   |
| 47-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                   | 56-M6                        | <i>C. krusei</i>      | 4,0                            | R                   |
| 47-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                   | 56-M7                        | <i>C. famata</i>      | 4,0                            | R                   |
| 47-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 0,031                          | S                   | 56-M8                        | <i>C. famata</i>      | 4,0                            | R                   |
| 47-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 0,125                          | S                   | 56-M9                        | <i>C. norvegensis</i> | 4,0                            | R                   |
| 47-A5                        | <i>C. albicans</i>     | 0,031                          | S                   | 56-M10                       | <i>C. norvegensis</i> | 0,125                          | S                   |
| 47-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                   | 56-M11                       | <i>C. norvegensis</i> | 0,125                          | S                   |
| 47-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                   | 58-A1                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 50-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                   | 58-A2                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 50-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                   | 58-A3                        | <i>C. albicans</i>    | 0,031                          | S                   |
| 50-A3                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                   | 58-A4                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 50-A4                        | <i>C. albicans</i>     | 2,0                            | R                   | 58-A5                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 50-M1                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                   | 58-B1                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 50-M2                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                   | 58-B2                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 50-M3                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                   | 58-B3                        | <i>C. albicans</i>    | 2,0                            | R                   |
| 50-M4                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                   | 58-B4                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 50-M6                        | <i>C. parapsilosis</i> | 4,0                            | R                   | 58-B5                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 53-M6                        | <i>C. tropicalis</i>   | 8,0                            | R                   | 58-M1                        | <i>C. albicans</i>    | 0,250                          | S                   |
| 53-M7                        | <i>C. tropicalis</i>   | 4,0                            | R                   | 58-M2                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |
| 53-M8                        | <i>C. tropicalis</i>   | 0,031                          | S                   | 58-M3                        | <i>C. albicans</i>    | 2,0                            | R                   |
| 55-A1                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                   | 58-M4                        | <i>C. albicans</i>    | 2,0                            | R                   |
| 55-A2                        | <i>C. albicans</i>     | 4,0                            | R                   | 58-M5                        | <i>C. albicans</i>    | 4,0                            | R                   |

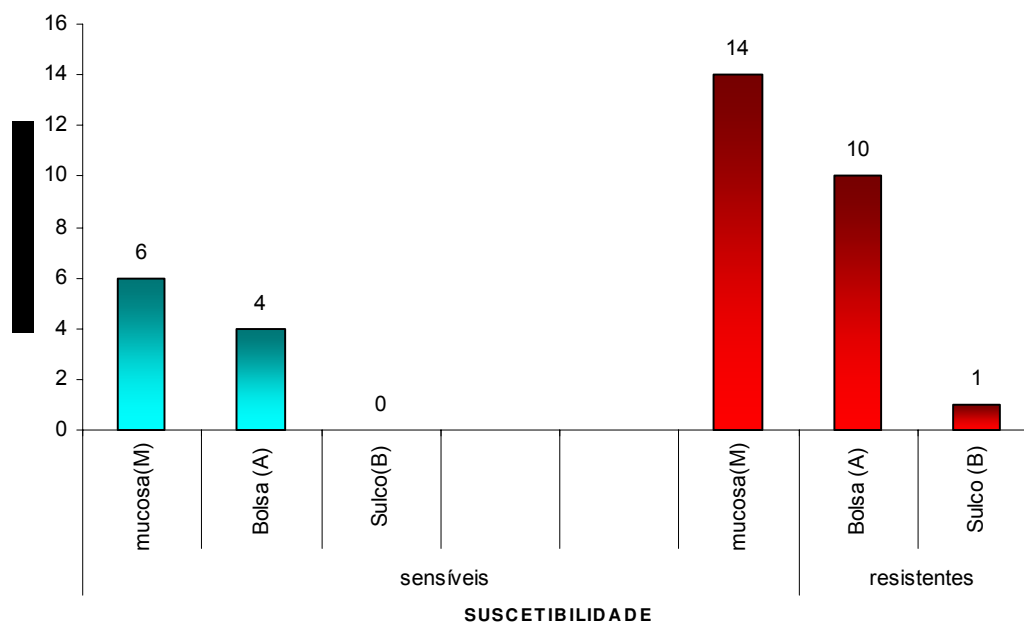
Suscetibilidade: Sensível (S) / Resistente (R) / Suscetibilidade dependente de Concentração (SDC).



**Figura 7a:** Suscetibilidade dos isolados de *Candida* spp. a Anfotericina B.



**Figura 7b:** Suscetibilidade dos isolados de *Candida albicans*. a Anfotericina B em relação aos sítios coletados.

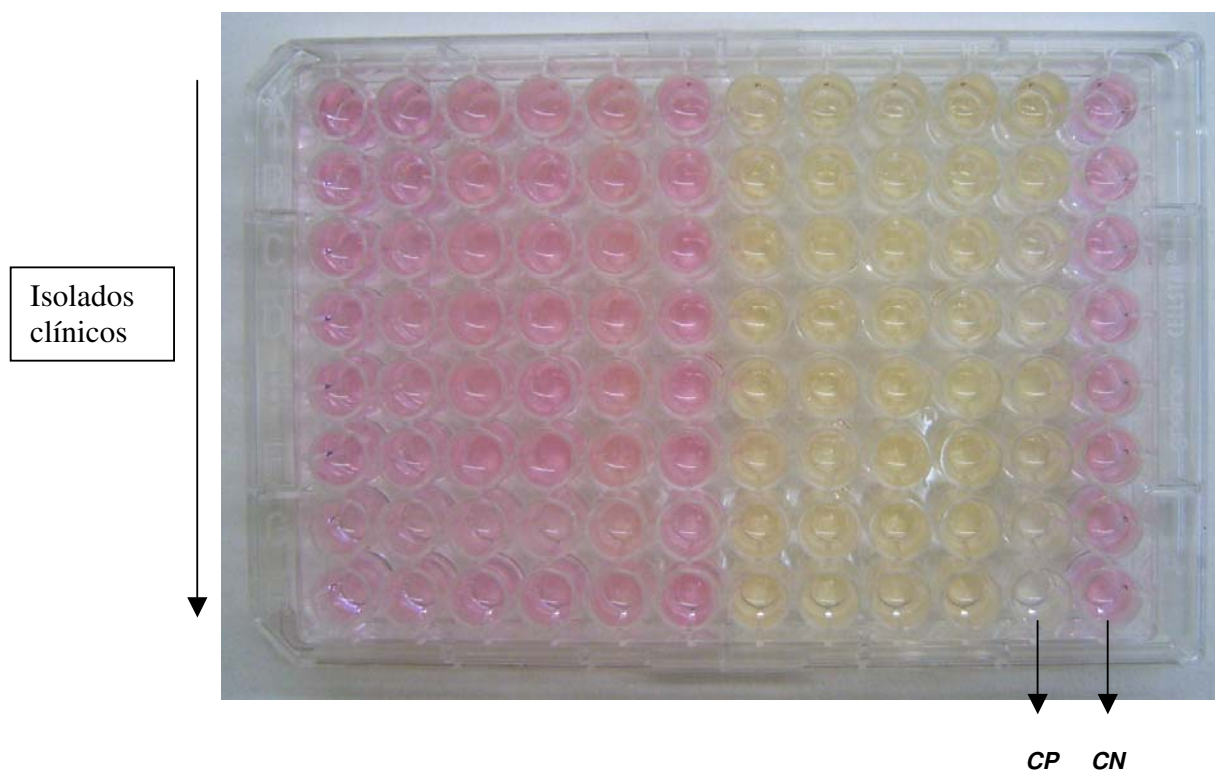


**Figura 7c:** Suscetibilidade dos isolados de *Candida não albicans*. a Anfotericina B em relação aos sítios coletados.

**Tabela 9.** Valores da suscetibilidade dos antifúngicos azólicos e anfotericina B (CIM 50 e CIM 90) em relação aos isolados de *Candida* spp.

| Droga                 | Espécies / número de amostras | CIM-faixa (µg/mL) | CIM <sub>50</sub> (µg/mL) | CIM <sub>90</sub> (µg/mL) |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Fluconazol</b>     | <i>C.albicans</i> (105)       | 0,125-64          | 2,0                       | 8,0                       |
|                       | <i>C.não albicans</i> (35)    | 0,125-32          | 0,5                       | 2,0                       |
| <b>Itraconazol</b>    | <i>C.albicans</i> (105)       | 0,007-1,0         | 0,25                      | 0,25                      |
|                       | <i>C.não albicans</i> (35)    | 0,007-20          | 0,5                       | 2,0                       |
| <b>Cetoconazol</b>    | <i>C.albicans</i> (105)       | 0,015-1,0         | 0,25                      | 0,5                       |
|                       | <i>C.não albicans</i> (35)    | 0,015-1,0         | 0,125                     | 0,5                       |
| <b>Anfotericina B</b> | <i>C.albicans</i> (105)       | 0,03-16           | 4,0                       | 4,0                       |
|                       | <i>C.não albicans</i> (35)    | 0,03-16           | 2,0                       | 4,0                       |

Diluições da droga →



**Figura 8:** Placa de Elisa exemplificando o teste de suscetibilidade de *C. albicans* ao fluconazol. Colunas 1 a 10: diluições seriadas da droga (64 a 0,125 (µg/mL); Linhas A a H: diferentes isolados clínicos. CP: controle positivo (meio + inóculo); CN: controle negativo (meio + droga).

## **6. DISCUSSÃO**

---

A seleção prévia dos isolados do presente trabalho foi feita através da avaliação da coloração e aspecto da colônia durante cultivo em meio cromogênico Chromagar Candida<sup>®</sup>, que é o método mais amplamente empregado na literatura para identificação de *Candida* spp. (Gatica *et al.*, 2002; Ballesté *et al.*, 2005). No entanto, quando se trata de diferenciação entre espécies de *C. albicans* e não *albicans*, é necessário realizar testes complementares utilizando microcultivo e testes bioquímicos, como por exemplo, assimilação de carboidratos (kit API 20C<sup>®</sup>), para que se tenha um diagnóstico preliminar específico. Além disso, o uso de diferentes temperaturas de incubação e o cultivo em Sabouraud Dextrose Hipertônico permite a diferenciação entre as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* (Finegald *et al.*, 1989; Fitzpatrick *et al.*, 1998; Galle *et al.*, 2004).

Como *C. dubliniensis* apresenta características semelhantes a *C. albicans*, muitos autores tem se preocupado em padronizar a identificação desta espécie com provas fenotípicas que possam ser implantadas em rotina de laboratórios (Jabra-Rizk *et al.*, 1999b; Bikandi *et al.*, 1998; Pinjon *et al.*, 1998; Gales *et al.*, 1999). Características fenotípicas discriminatórias de *C. dubliniensis* como diferença de coloração dos cultivos em CHROMagar Candida<sup>®</sup>, diferença no padrão de assimilação de carboidratos e na capacidade de crescimento em temperaturas elevadas (42 e 45°C), bem como produção de grande quantidade de clamidoconídios, têm sido apontadas, entre outras. No entanto, nenhuma delas parece ser suficiente para uma identificação definitiva de espécie (Schorling *et al.*, 2000).

Assim, através do emprego de métodos convencionais ou clássicos para identificação dos isolados estudados no presente trabalho, observa-se que 75% dos mesmos pertencem à espécie *C. albicans* (105 isolados), enquanto 25% pertencem a outras espécies de *Candida* (Tabelas 3a, 3b, 4a e 4b; Figuras 1, 2 e 3). Dentre as espécies não *albicans* foram encontradas, por ordem de prevalência, *C. tropicalis* (16), *C. parapsilosis* (5), *C. krusei* (4), *C. famata* (3), *C. norvegensis* (3), *C. dubliniensis* (3) e *C. lusitaniae* (1), (Figura 1). Resultados similares têm sido encontrados na literatura e confirmam as observações de que existe um aumento

da incidência de espécies não *albicans*, ainda que *C. albicans* seja a espécie prevalente (Odds *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 1997). De fato, dentro do gênero *Candida*, alguns estudos têm demonstrado uma crescente frequência de infecções por espécies de *C. não-albicans*, com várias espécies deste gênero sendo responsáveis por infecções sangüíneas, associadas à doença periodontal e outros sítios anatômicos (Ficher-Hoch, Hutwagner, 1995; Coleman *et al.*, 1998).

Um substancial aumento no número de registros de espécies de *Candida não-albicans* também tem sido reportado em pacientes com AIDS expostos a tratamentos repetidos de drogas antifúngicas, especialmente o fluconazol (Barchiesi *et al.*, 1996; Dronda *et al.*, 1996). No Brasil, Milan *et al.* (1998) mostraram que *Candida não-albicans* foi isolada de cavidade oral de 28% dos pacientes com AIDS, avaliados em estudo realizado no Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, entre 1995 e 1996.

Com relação à identificação particularmente de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, na presente investigação, optou-se pela utilização do teste de crescimento em 42°C e Teste de Saboraud Hipertônico como principais testes para triagem de *C. dubliniensis*, por apresentarem as seguintes características: rapidez e facilidade na realização, leitura objetiva, baixo custo e bom poder discriminatório para as espécies de leveduras em questão (Pinjon *et al.*, 1998; Jabra-Rizk *et al.*, 1999a). Do total de 108 isolados que apresentaram cor verde em CHROMagar Candida, sugestivo de *C. albicans* ou *C. dubliniensis*, três isolados não cresceram ou tiveram fraco crescimento quando incubados a 42°C, sendo o mesmo observado quando tais isolados foram submetidos ao teste em meio Sabouraud Hipertônico. Assim, pudemos confirmar a identificação de tais isolados como *C. dubliniensis*. O teste de crescimento em temperaturas de 42 ou 45°C é considerado pela maioria dos autores como a melhor triagem para *C. dubliniensis*.

Mariano *et al.* (2003), observaram que isolados de *C. dubliniensis* apresentaram produção abundante de clamidoconídios, quando comparadas com *C. albicans*, formando arranjos duplos ou triplos nas terminações das pseudohifas. Esta característica pode também ser observada em alguns casos, em amostras de

*C. albicans*, apesar de em menor quantidade. Alguns pesquisadores descrevem *C. dubliniensis* apresentando formação abundante de clamidoconídios, com arranjos de dois, três ou mais unidades produzidas de uma mesma terminação de pseudohifa (Sullivan *et al.*, 1995; Coleman *et al.*, 1997). Por outro lado, Schoofs *et al.* (1997) não observaram abundância na formação destas estruturas em amostras de *C. dubliniensis* que não se apresentaram em pares ou conjugações maiores. Possivelmente, esta discordância indica a possibilidade de existir muitas variações na expressão deste fenômeno, dependendo das condições em que são mantidas as cepas. Ao observar isoladamente o microcultivo de uma amostra, não é possível dizer quando se trata de *C. dubliniensis* ou de *C. albicans*, sendo esta uma característica muito subjetiva, o que torna impraticável utilizá-la como prova de triagem entre estas espécies relacionadas e o mesmo se atribui as demais espécies de *C. não albicans* (Tintelnot *et al.*, 2000; Schorling *et al.*, 2000).

Com o objetivo de avaliar o perfil de assimilação de carboidratos por *Candida* spp. foi utilizado o sistema de identificação comercial API 20C (Biomérieux). As leituras obtidas foram algumas vezes contraditórias, sendo que nessas alguns açúcares apresentaram assimilação fraco positiva nas primeiras 48h de incubação, que apenas se confirmaram após 72h. Isso gerou dúvidas no caso de algumas amostras, resultando em interpretação dúbia entre as espécies de *Candida*, que só puderam ser sanadas quando da união dos resultados obtidos através dos demais métodos utilizados, para um diagnóstico específico das espécies identificadas no presente trabalho. Também Tintelnot *et al.* (2000) encontraram considerável variabilidade na assimilação de DL- lactato, D- xilose e  $\alpha$ -metil-D-glucosídeo por *C. dubliniensis*, quando testadas pelo sistema ID32C, mesmo com leitura visual do teste. Estes autores também mencionaram a ocorrência de reações fraco-positivas após 48 horas de incubação. Estes resultados demonstraram que o perfil de assimilação de carboidratos é muito variável, não devendo ser a única prova realizada em testes de triagem para identificação de espécies de *Candida*.

Dentre os 53 pacientes investigados, 19 apresentaram colonização oral por *Candida* spp, sendo que em 14 deles (26,4%) havia colonização na bolsa periodontal. A presença de leveduras em bolsas periodontais tem sido relatada em cerca de 20% dos pacientes com doença periodontal severa (Slots *et al.*, 1988; Listgarten *et al.*, 1993; Dahlén & Wikström, 1995). Embora não esteja totalmente definida a participação destes organismos na patogênese desta doença, os resultados obtidos são sugestivos, considerando o fato de que todos os pacientes analisados não apresentavam doenças sistêmicas ou fatores que podem contribuir com o desenvolvimento de infecções por leveduras, como imunossupressão, uso de antibióticos ou corticosteróides.

A ocorrência de resistência para os antifúngicos azólicos foi maior para o grupo das espécies de *C. não-albicans* (42,8%) em relação ao observado para *C. albicans* (3,6%). Foi possível observar a ocorrência de resistência cruzada entre os antifúngicos itraconazol e cetoconazol, para cinco amostras de três pacientes. Embora a ocorrência de resistência fosse baixa para os azólicos, observa-se uma diminuição na susceptibilidade a estes antifúngicos, demonstrada pelo elevado índice de SDC, especialmente para itraconazol e cetoconazol. O fluconazol mostrou ser o antifúngico mais efetivo para a maioria das amostras dentre todas as espécies de *Candida* testadas. Estudos têm demonstrado que a suscetibilidade aos antifúngicos azólicos entre isolados de *Candida* spp. de bolsas periodontais pode ser variável, ocorrendo resistência cruzada. Muñoz *et al.* (1997), também destacaram a ocorrência de resistência cruzada entre os antifúngicos azólicos, fundamentada na presença de mecanismos de ação similares. Isso demonstra padrões diferentes de suscetibilidade das mesmas cepas às drogas testadas (Arikan *et al.*, 1995). Esse fato vem corroborar dados recentes, que indicam uma crescente resistência entre espécies de *Candida* aos antifúngicos azólicos, sugerindo que a cavidade oral poderia ser um reservatório de leveduras resistentes (Waltimo *et al.*, 2000; Kutsyk & Pavliuk, 2003; Ito *et al.*, 2004; Kuriyama *et al.*, 2005).

Um correto diagnóstico microbiológico deve ser considerado em lesões periodontais refratárias ao tratamento convencional. A aplicação conjunta de tratamento antifúngico pode ser útil em casos de infecções oportunistas por *Candida* spp. no periodonto, especialmente em pacientes com elevado risco de desenvolver candidíase sistêmica (Listgarten *et al.*, 1993; Pizzo *et al.*, 2002 ). A elevada ocorrência de resistência a Anfotericina B encontrada entre as espécies analisadas indica a necessidade de se fazer estudos mais acurados para este antifúngico. Realmente, considerando o potencial fungistático dos antifúngicos azólicos e o potencial fungicida da anfotericina B (antifúngico poliênico), seria esperado encontrar maior número de isolados sensíveis a esta última droga e não às demais.

Considerando a literatura pertinente, constatou-se que não existe um padrão usual de comportamento de isolados clínicos em relação à suscetibilidade aos antifúngicos testados, uma vez que diferentes autores encontraram diferentes resultados neste aspecto. Marra & Camargo (2002), por exemplo, concluíram em seu trabalho, que a eficácia dos dois tipos de drogas fluconazol e anfotericina B foi equivalente.

Desta forma, os resultados obtidos na presente pesquisa podem ser sugestivos da ocorrência de seleção de cepas resistentes à anfotericina B convencional. O mesmo não tem acontecido com outra forma de apresentação da anfotericina B, a lipossomal, cuja formulação permite a liberação gradual, embora constante, do princípio ativo. Tal formulação tem sido considerada como uma melhor opção terapêutica nos casos de resistência. Com isso, observa-se a importância da identificação preliminar do microrganismo causador da doença para que se prescreva a droga e concentração apropriada da mesma, evitando dessa maneira a seleção de cepas resistentes (Magaldi *et al.* 2001; Paniagua *et al.*, 2002; Camargo *et al.*, 2002).

Quanto à concentração inibitória mínima (CIM) das diferentes drogas estudadas em relação aos isolados, foram determinadas a CIM 50 e a CIM 90, que representam, respectivamente, as concentrações capazes de inibir 50% e

90% dos isolados. Os resultados da Tabela 9 mostram que no caso do fluconazol, a CIM 50 diferiu entre os isolados de *C. albicans* e não *albicans*, sendo de 8,0 µg/mL e 0,5 µg/mL, respectivamente. A CIM 90, por outro lado, foi igual (2,0 µg/mL).

A CIM 50 e CIM 90 das drogas itraconazol e anfotericina B para os isolados de *C. albicans* foram equivalentes, ou seja, 0,25 µg/mL e 4,0 µg/mL, respectivamente, enquanto para espécies não *albicans* foi necessária uma maior concentração dos antifúngicos para inibir 90% dos isolados (Tabela 9). A CIM 50 e CIM 90 do cetoconazol para as espécies *C. albicans* e não *albicans* foram similares (Tabela 9).

Mariano *et al.*, (2002) observaram que todos os isolados de *C. dubliniensis* foram sensíveis aos quatro antifúngicos testados. As amostras de *C. albicans* apresentaram maior variação das CIMs para os antifúngicos azólicos em comparação com *C. dubliniensis* e os valores de CIM 50 e CIM 90 não expressaram diferenças significativas entre as duas espécies. No entanto, Moran *et al.* (1997), reportaram casos de reduzida susceptibilidade ao fluconazol (CIM entre 8,0 e 32 µg/mL) em isolados de *C. dubliniensis* entre 20% dos pacientes com AIDS estudados. Adicionalmente, eles observaram rápido desenvolvimento de resistência estável em *C. dubliniensis* in vitro, após exposição à droga. Dados subsequentes demonstraram que *C. dubliniensis* codifica proteínas transportadoras de drogas, as quais medeiam a resistência ao fluconazol em isolados clínicos e pode ser rapidamente mobilizada, particularmente in vitro, sob exposição ao fluconazol (Moran *et al.*, 1998). Ruhnke *et al.* (2000), descreveram o desenvolvimento de resistência ao fluconazol em uma paciente com AIDS infectada por *C. albicans* e *C. dubliniensis* simultaneamente. A paciente apresentava candidose oral recorrente devido às duas espécies, estando sob uso de fluconazol por quatro anos. Análises moleculares mostraram persistência dos mesmos isolados durante o período, ocorrendo o desenvolvimento de resistência nas duas espécies.

Pesquisas que envolvem estudos sobre o crescimento e suscetibilidade de cepas de *Candida* spp. à uma ampla variedade de drogas antifúngicas tem demonstrado resistência cruzada á anfotericina B e antifúngicos azólicos em indivíduos que não haviam tido contato com os mesmos, sugerindo que não se trata de um efeito no metabolismo de esterol e sim de que novos mecanismos de resistência estão envolvidos em isolados clínicos (Perea *et al.*, 2000; Swinne *et al.*, 2004).

Esses dados, somados aos obtidos na presente pesquisa, sugerem que para se obter eficácia na terapêutica utilizada são necessários estudos comparativos entre os diversos antifúngicos normalmente utilizados, ou seja, azólicos e poliênicos, confrontando seus respectivos mecanismos de ação e fatores de origem local como má higiene bucal, presença de cáries e próteses, que ocasionariam o acúmulo microbiano. Além disso, devem-se considerar ainda fatores de ordem sistêmica relacionados a desordens do metabolismo do hospedeiro, terapias imunossupressoras, má nutrição, infecção pelo vírus HIV já que, a união dessas condições contribui para o agravamento da doença, visto que o microrganismo causador da mesma é oportunista (Lindhe, 1999; Muñoz *et al.*, 1997; Galle *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de um programa rotineiro que inclua testes de sensibilidade aos antifúngicos para monitoramento das amostras bucais, determinando a droga e concentração eficiente da mesma no tratamento. Isto também evitaria a seleção de cepas resistentes, cuja suscetibilidade dependa da concentração da droga (Lindhe, 1999; Muñoz *et al.*, 1997; Galle *et al.*, 2004).

Estudos que venham a contribuir para um maior entendimento das relações entre os microrganismos e antimicrobianos deverão ser levados a efeito no sentido de se elucidar os complexos mecanismos que envolvem a resistência microbiana a drogas.

## **7. CONCLUSÃO**

---

Os dados obtidos na presente pesquisa, permitem concluir que:

**1** – A espécie *C. albicans* é a mais prevalente na microbiota bucal considerando-se os diversos sítios analisados, confirmando os achados de Barros (2005). Verifica-se ainda um aumento na incidência de espécies de *C. não albicans* nesses sítios, acompanhado de uma maior resistência das últimas às drogas testadas.

**2** - Pacientes com doença periodontal apresentam níveis de colonização por *Candida* spp relevantes, principalmente na mucosa bucal e bolsa periodontal.

**3** - Os padrões de suscetibilidade dos isolados de *C. albicans* e *C. não albicans* aos diferentes antifúngicos estudados diferem consideravelmente.

**4** - Não há ocorrência de resistência para o fluconazol e pequena parcela de isolados de *Candida* spp. mostrou Suscetibilidade Dependente de Concentração (SDC) em relação a essa droga, ocorrendo o oposto para o itraconazol e cetoconazol. A maioria dos isolados é Resistente à anfotericina B.

**5** - Os valores da Concentração Inibitória Mínima CIM50 e CIM90 dos antifúngicos azólicos para as amostras de *C. albicans* são inferiores aos encontrados para as demais espécies. Para a anfotericina B, os valores de CIM50 e CIM90 não são diferentes entre estas e *C. albicans*.

## ***8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

- Abu-Elteen KH, Abu- Alteen RM. The prevalence of *Candida albicans* populacions in the mouths of complete denture wearers. **New Microbiol.** 1998; 21(1): 41-48.
- Alpagot T, Duzgunes N, Wolff, L.F. LEE, A. Risk factors for periodontitis in HIV patients. **J Periodontol. Res.** 2004; 39 (3); 149-157.
- Alves ACBA. Análise da diversidade genética de *Prevotella intermídia* em indivíduos com doença periodontal. Piracicaba, 2003. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas.
- Alves SH, *et al.*, Hypertonic Saboraud brotth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. **Diag Microbiol Infect Deas.** 2002; 43(1):85-86.
- Arendorf TM, Walker DM.The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Arch Oral Biol.** 1980; 25:1-10.
- Arikan A, Kulak Y, Kadir T. Comparison of different treatment methods for localizad and generalized simple denture stomatitis. **J Oral Rehalbil.** 1995; 22(5):365-369.
- Ballesté R *et al.* Evaluación del médio cromógeno CHROMagar Candida para la identificación de levaduras de interés médico. **Rev Med Uruguay.** 2005; 21:186-193.
- Barchiesi F, Morbidutcci V, Ancarani F, Scalise G. Emergence of oropharyngeal candidiasis caused by non-*albicans* species of *Candida* in HIV-infected patients. **Eur J Epidemiol** 1993; 9:455-6.
- Barlow AJ, Chattaway F W. Observations on the carriage of *Candida albicans* in man.**Br J Dermatol.** 1969; 81(2):103-106.
- Barros LM. **Ocorrência de *C. albicans* e *C. dubliniensis* em sítios subgengivais e nas mucosas da cavidade bucal: Genotipagem por RAPD e atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases.** (tese). Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.
- Baumgartner C, Freydiere A-M, Gille Y.Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar Candida plates. **J Clin Microbiol.** 1996; 34: 454-456.
- Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurence of *Candida albicans* in infections of endodontics origin. **J Endodontics.** 2000 26(12):695-698.

Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsfor DSR, *et al.* Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. **J Clin Microbiol.** 1995; 33 (11):3025-3027.

Berenguer J, Diaz-Guerra TM, Ruiz-Diez B. Genetic dissimilarity of two fluconazole-resistant *Candida albicans* strains causing meningitis and oral candidiasis in the same AIDS patient. **J Clin Microbiol.** 1996; 34 (6); 1542-1545.

Bikandi J, Millán RS, Moragues MD, Cebas G, Clarke M, Coleman DC, Sullivan DJ, Quindós G, Pontón J. Rapid identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C. dubliniensis* blastospores and *Candida albicans* germ tubes. **J Clin Microbiol.** 1998; 36(9): 2428-33

Budtz-Jørgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. Community. **Dent Oral Epidemiol.** 1975; 3(3):115-119.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology.** 2001; 9(7): 327-335.

Campisi G, Pizzo G, Mancuso S Margiotta V. Gender differences in HIV-related oral lesions: an Italian study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2001, 93 (3); 281-286.

Candido RC, Azevedo RVP .Ito II. Yeasts: the prevalence in the oral cavity of individuals with or without denture. **Rev Odontol Unacid.** 1995; 7: 27-33.

Carlstedt K, Krekmanova L, Dahllof G. *et al.* Oral carriage of *Candida* species in children and adolescents with Down's syndrome. **Int J Paediatr Den.** 1996; 6(2):95-100.

Chien HY, Cox SW, Eley BM. *et al.* Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. **J Clin Periodontol.** 2004; 27:366-369.

Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaisse EL, Li A, Sullivan DJ. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Medical Mycology** 1998; 36(suppl 1): 156-65.

Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, *et al.* Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. **AIDS.** 1997; 11:557-67.

- Dahlen G, Wikstrom M. Occurrence of enteric rods, staphylococci and *Candida* in subgingival samples. **Oral Microbiol Immunol**. 1995; 10(1):42-46.
- Darwazeh AM Al-Bashir A. Oral candidal flora in healthy infants. **J Oral Pathol Med**. 1995; 24(8):361-364.
- Davies AN, Brasilsford S, Broadley K, Beigthon D. Oral yeast carriage in patients with adavanced cancer. **Oral Microbiol Immunol**. 2002; 17 (2); 79-84.
- De Repentigny L, Aumont F, Bernard K,Belhumeur P. Caracterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. **Infect. Immun**. 2000; 68(6):3172-3179.
- Dronda F, Alonso-Sanz M, Laguna F, Chaves F, Martinez-Suarez JV, Rodriguez-Tudella JL, Gonzalez-Lopez A, Valencia E. Mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non-*albicans Candida* strains in HIV- infected patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 1996; 15: 446- 52
- Dronda F. *et al.* E. Mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non-*albicans Candida* strains in HIV- infected patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 1996; 15: 446- 5.
- Finegald S, Diagnóstico Microbiológico. **Ed. Panamericana Buenos Aires**. 1989.
- Fiscer-Hoch SP, Hutwagner L. Opportunistic candidiasis: an epidemic of the 1980s. **Clin Infect Dis**. 1995; 21: 897-904.
- Fitzpatrick T. Atlas de Dermatología clínica. **Ed. McGraw- Hill**, 1998.
- Fukayama M, Calderone RA. Adherence of cell surface mutants of *Candida albicans* to buccal ephitelial cells and analyses of the cell surface proteins of mutants. **Infect Immun Washington**. 1991, 59(4):1341-1345.
- Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, Soll DR. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xilose and  $\alpha$ -methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC sistemas. **J Clin Microbiol**. 1999: 37(12): 3804-8.
- Galle LC, *et al.* Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **Bras Patol Med Lab**. 2004; 40(4): 229-236.
- Gattica M. *et al.* Utilidad del agar Cromocandida para el Diagnostico Diferencial de *Candida* spp. Aisladas de muestras vaginales. **Rev Chil Obstet Ginecol**. 2002; 67(4): 300- 304.

Hagihara Y. *et al.*, Degradation of human dentine collagen by an enzyme produced by the yeast *Candida albicans*. **Arch Oral Biol.** 1988; 33(8):617-619.

Hannula J, Saarela M. Phenotypic and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and the United States. **Oral Microbiol Immunol.** 1997; 12:358-365

Hannula J, Saarela M, Josimies-Somer H. Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal species and stability of colonization in young children. **Oral Microbiol Immunol.** 1999; 14:176-182.

Hannula J. *et al.* Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. **Oral Microbiol Immunol.** 2000; 15 (4):238-244.

Hannula J, Dogan B, Slots J. Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. **Oral Microbiol Immunol.** 2001; 16:113-118.

Hasenclever HF, Mitchell W O. Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. **J Bacteriol.** 1961; 82: 570-3.

Haynes K. Virulence in *Candida* species. **Trends in Microbiology.** 2001; 9(12):591-596.

Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. **Clin Microbiol Rev.** 1995; 8: 462-78.

Hofling JF, Rosa EAR. Main techniques employed in the molecular epidemiology of *Candida* species. **Alpe Adria Microbiol. J.** 1999; 8(1):5-23.

Höfling JF *et al.* Differentiation and numerical analysis of oral yeasts based on SDS-PAGE profiles. Influence of the culture media on the whole-cell protein extracts. **Braz J Biol.** 2001; 61(3): 507-516.

Holmes AR. Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. **J Gen Microbiol.** 1995; 15 (3): 208-213 1995.

Hoog GS, Guarro J, Genô J & Fiqueras M J. **Atlas of Clinical Fungi.** Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 1126p.

Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology.** 2001; 147(8):1997-2005.

Hube B. Possible role of proteinases in *Candida* infections. **Rev Iberoam Micol.** 1998; 15:68-71.

Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brown AE, Calandra T, Feld R, Pizzo PA, Rolston KV, Shenep JL, Young LS "2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer." **Clin Infect Dis.** 2002; 34(6): 730-751.

Ibrahim AS. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor *Candida albicans*. **Infect Immun.** 1995; 63(5): 1993-1998.

Ito K, Yumi C, Paiva CA; Loberto, J C S Santos, Cardoso JAO. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from patients with chronic periodontitis and control patients. **Pesquisa Odontológica Brasileira.** 2004; 18(1): 80-84.

Jabra-Rizk MA, Baqui AAMA, Kelley JI, Falkler Jr. WA, Merz WG, Meiller TF. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. **J Clin Microbiol.** 1999a; 37(2): 321-6.

Jabra-Rizk MA, Falkler Jr. WA, Merz WG, Kelley JI, Baqui AAMA, Meiller TF. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. **J Clin Microbiol** 1999b; 37(5): 1464-8.

Jabra-Rizk MA, Falkler Jr, Merz WG. New Assay for Measuring Cell Surface Hydrophobicities of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **Clin Diag Lab Immunol.** 2001; 8(3):585-587.

Kam AP, Xu J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. **Diag Microbiol Infect Dis.** 2002; 43:19-28.

Kindelan SA, Yeoman CM, Douglas CW. Comparison of intraoral *Candida* carriage in Sjogren's syndrome patients with healthy xerostomic controls. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** 1998; 85(2):162-167.

Kirkpatrick WR; Revankar SG; McAtee RK; Lopez-Ribot JL; Fothergill AW; McCarthy DI; Sanche SE; Cantu RA; Rinaldi MG; Patterson TR. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. **J Clin Microbiol.** 1998; 36(10): 3007-12.

Kleinegger CL, Lockhart SR, Vargas K. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. **J Clin Microbiol.** 1996; 34:2246-2254.

Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D and Lewis MA. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. **Oral Microbiology Immunology**. 2005; 20(6): 349-353.

Kutsyk RV, Pavliuk TD. Investigation of quantitative and species composition and antifungal drug susceptibility of yeasts isolated from patients with generalized periodontitis complicated by candidosis. **Microbiol**. 2003; 65(5):26-29.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1992; **Medical Mycology**.

Lacaz C S, **Candidíases**. São Paulo: EPU – EDUSP, 1980. 190p.

Lamkim MS, Oppenheim FG, Structural features of salivary function. **Crit Rev Oral Biol Med**. 1993; 4 (3/4): 251-259,

Lamont RJ, Jenkinson H. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. **Microbiol Mol Biol Rev**. 1998; 62(4):1244-1263.

Lamster IB, Grbic JT, Mitchell-Lewis DA, Begg MD, Mitchell A. New concepts regarding the pathogenesis of periodontal disease in HIV infection. **Ann Periodontol**. 1998; 3 (1):62-75.

Leung WK, Dassanayke RS, Yau JYY. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. **J Clin Microbiol**. 2000; 38(6): 2219-2226.

Lindhe J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 1999.

Lockhart SR, Joly S Vargas K.. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. **J Dent Res**. 1999; 78(4): 857-868.

Lynch D P. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1994; 78 (2):189-193.

Magaldi S. In Vitro susceptibility of 137 *Candida* spp. isolates from, HIV patients to several antifungal drugs. **Micopathologia**. 2001; 149:63-68.

Mardegan RC. **Enzimagem e genotipagem de isolados de *C. albicans* da Cavidade Oral de crianças cárie ativas e livres de cárie**. (dissertação). Piracicaba: UNICAMP/ FOP; 2003.

Mariano PLS, Milan EP, Matta DA, Colombo AL. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2003; 98(4): 533-538.

Mariano PLS, Milan EP, Martinez R Queiroz TF, Ferreira MS, Alcantara AP, Carvalho MT, Colombo AI. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2002; 97(2): 253- 257.

Marra A. & Camargo LF A. Fluconazol ou Anfotericina B no Tratamento de Candidemias em pacientes internados na UTI. **Rev Assoc Med Brás.** 2002; 48(2): 93-117.

Mata A L, Rosa RT, Rosa EAR. Clonal variability among oral *Candida albicans* assessed by allozyme electrophoresis analysis. **Oral Microbiol Immunol.** 2000; 15(6):350-354.

McCullough MJ, Ross B, Reade PC. Characterization of genetically distinct subgroup of *Candida albicans* strains isolated from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. **J Clin Microbiol.** 1995; 33:696-700.

McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. **J Clin Microbiol.** 1999, 37:417-421.

McMullan-Vogel CG, Judehd, Ollert MW, Vogel CW. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. **Oral Microbiol Immunol.** 1999; 14(3):183-189.

Mehta SK. Distribution of *Candida albicans* genotypes among family members. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 1999; 34 (1): 19-25.

Menon T. Efficacy of fluconazole and itraconazole in the treatment of oral candidiasis in HIV patients. **Acta Trop.** 2001; 80(2):151:154.

Milan EP, De Laet Santana P, De Azevedo Melo AS. Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2001; 41(1/2): 29-35.

Millon L *et al.* Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: Persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. **J Clin Microbiol.** 1994; 32: 1115- 1118

Moalic E *et al.* The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationship with dental caries. **Caries Res.** 2001; 35(2): 149-155.

Moran GP, Sanglard D, Donnelly SM, Shanley DB, Sullivan DJ, Coleman DC. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrob Agents Chemother.** 1998; 42(7): 1819-30.

Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Shanley DB, Coleman DC. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. **Antimicrob Agents Chemother.** 1997; 41(3): 617-23.

Muñoz AJC, *et al.* Resistencia *in vitro* al Fluconazol e Itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida* spp e *Cryptococcus neoformans*. **Rev Iberoam Micol.** 1997; 14:50-54.

National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Publication M27-A: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard. Wayne, PA. **NCCLS.** 1997; 17(9): 1-28.

Newman MG, Takel HH, Carranza FA., 2004. **Periodontia Clínica** Rio de Janeiro: 9º Ed. Guanabara Koogan.

Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque past and recent concerns. **J Dentistry.** 1998; 26:299-304.

Nikawa H, Samaranayake LP, Tenovuo J, Pang KM, Hamada T. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Arch Oral Biol.** 1993; 38(12):1057-1063.

Odds FC, Abbott A. A simple system for presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. **Saboraudia.** 1980; 18(4):301-307.

Odds FC. 1988. **Candida and Candidosis.** London. 2 edn. Baillière Tindall, Oksala E., Factors predisposing to oral yeasts infections. **Acta Odont Scand.** 1990; 48 (1):71-74.

Ollert MW, Wende C, Görlich M. Increase expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from Human Immunodeficiency Virus-positive patients. **J Clin Microbiol.** 1995; 33(10):2543-2549.

Ollila P, *et al.* Risk factors for colonization of salivary lactobacilli and *Candida* in children. **Acta Odontol Scand.** 1997; 55 (1):9-13.

Paniagua LG, *et al.* Susceptibility to 5- Fluorocytosine, miconazole and amphotericin B of *Candida albicans* strains isolated from the throat of non-AIDS patients. **Rev Latinoam Microbiol.** 2002; 44(2):65-68.

Perea S. Azole resistance in *Candida albicans* **Rev Esp Quimioter.** 2000;13: 314-317.

Perea S, López-Ribot JL, Wickes LB. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from Human Immunodeficiency Virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother.** 2002; 46(6):4695-1703.

Perfect JR, Schell WA. The new fungal apportunists are coming. **Clin infect Dis.** 1996; 22(supl 2): S112-8.

Persons D, *et al.* Fluconazole and *Candida krusei* fungemia. **N Engl J Med.** 1991; 325: 1351.

Peterson DE, Minah GE, Overholser CD, *et al.* Microbiology of acute periodontal infection in myelosuppressed cancer patients. **J Clin Oncol.** 1987; 5(9):1461-1468.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, *et al.* Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. **J Clin Microbiol.** 2003; 41(12):5729-5731.

Pfaller MA. Epidemiology of fungal infections: The promise of molecular typing. **Clin Infect Dis.** 1995; 20:1535-1539.

Pienihäkkinen K. Salivary lactobacilli and yeast in relation to caries increment. Annually repeated measurements versus a single determination. **Acta Odont Scand.** 1988; 46(1):57-62.

Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **J Clin Microbiol.** 1998; 36(7): 2093-5.

Pires FR, Santos EBD, Bonan PRF, *et al.* Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. **J Oral Rehabilitation**. 2002; 19:1115-1119.

Pizzo G, Giuliana G, Milici ME. Effect of dietary carbohydrates on the in vitro epithelial adhesion of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*. **New Microbiol**. 2000; 2(1):63-71.

Poulter RT. Natural auxotrophic heterozygosity in *Candida albicans*. **Crit Rev Microbiol**. 1987; 15(1):97-101.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**. 1982; 20(1):7-14.

Rams TE, Flynn MJ, Slots J. Subgingival microbial associations in severe human periodontitis. **Clin Infect Dis**. 1997; 25(2):224-226.

Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK. Yeasts in periodontal pockets. **J Clin Periodontol**. 2001; 28(9):860-864.

Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Morschhäuser J. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. **J Antimicrob Chemother**. 2000; 46: 291-5.

Salyers A, Witt D. Virulence factors that promote colonization. **ASM Press**. 1994; 30-46.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clin Microbiol Rev**. 2001; 14(2):398-429.

Samaranayake YH, Samarnayake LP, Pow E.H. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. **J Clin Microbiol**. 2001; 39(9):3296-3302.

Sandven P., 1990. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontol. Scand**. 48:27-36.

Schorling SR, Kortinga HC, Froschb M, Mühlischlegel FA. The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected individuals. **Crit Rev Microbiol**. 2000; 26(1): 59-68.

Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. **Oral Microbiol Immunol.** 1988; 3:47-52.

Slots J, Taubman MA. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology.** 1992; St. Louis, Missouri. Mosby Year Book.

Slots J. Update on human cytomegalovirus in destructive periodontal disease. **Oral Microbiol. Immunol.** 2004; 19(4): 217-223.

Spolidorio D M, Spolidorio LC, Barbeiro RH. Quantitative evaluation of *Streptococcus mutans* and *Candida species* and salivary factors in the oral cavity of patient undergoing radiotherapy. **Pesqui Odontol Bras.** 2001; 15(4): 354-358.

Starr JR, White TC, Leroux BG, *et al.* Persistence of oral *Candida albicans* carriage in healthy Portuguese schoolchildren followed for 3 years. **Oral Microbiol Immunol.** 2002; 17(5):304-310.

Steele C, Fidel PL Jr. Ce and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. **Infect Immun.** 2002; 70(2):577-583.

Stenderup A. Oral mycology. **Acta Odontol Scand.** 1990; 48 (1): 3-10.

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov. phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV infected individuals. **Microbiol.** 1995; 141: 1507-21.

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, *et al.* *Candida dubliniensis* sp. Nov.; phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology.** 1995; 141:1507-1521.

Swinne D, Watelle M, Van der Flaes M. *In vitro* activities of variconazole(UK-109, 496), fluconazole, itraconazole and amphotericin B against 132 non-*albicans* bloodstream yeast isolates(CANARI study). **Mycoses.** 2004;47; 177-183.

Tintelnot K, *et al* Evaluation of Phenotypic Markers for selection and Identification of *Candida dubliniensis* **J Clin Microbiol.** 2000:1599-1608.

Torres SR, Peixoto CB, Caldas D M, *et al.* Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts subjects with xerostomia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral radiol Endod.** 2002; 93(2): 149-154.

Vargas KG, Joly S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral species vary in the progression to oral candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-positive individuals. **J Clin Microbiol.** 2002; 40(2):341-350.

Velegraki A, *et al.* Presumptive identification of an emerging yeast pathogen: *Candida dubliniensis* reduces 2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 1998; 20:239-241.

Vidotto V, Koga-Ito CY, Milano R, *et al.* Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans*. **Ver Iberoam Micol.** 1999; 16(4):208-210.

Waltimo T M, Dassanayake R S, Orstavik D. Phenotypes and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Candida albicans* isolates from root canal infections in a Finnish population. **Oral Microbiol Immunol.** 2001; 16:106-112.

Willis A M, Coulter WA, Fulton CR, *et al.* Oral candidal carriage and infection in insulin-treated diabetic patients. **Diabet Med.** 1999; 16(8):675-679.

Xu YY, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro susceptibility of *Candida species* to lactoferrin. **Med Mycol.** 1999; 37(1):35-41.



## ANEXO I. Tabela de identificação de leveduras pelo método API 20 C AUX.

| TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE /<br>TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO /<br>ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIERINGSTABELL / IDENTIFIKATIONSTABEL /<br>TABELA IDENTYFIKACJI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| % de réactions positives après 48-72 h (± 6 h) à 29°C ± 2°C / % of reactions positive after 48-72 hrs. (± 6 hrs) at 29°C ± 2°C /<br>% der positiven Reaktionen nach 48-72 Std. (± 6 Std) bei 29°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 48-72 H (± 6 H) a 29°C ± 2°C /<br>% di reazioni positive dopo 48-72 ore (± 6 ore) a 29°C ± 2°C / % das reacções positivas após 48-72 H (± 6 H) a 29°C ± 2°C /<br>% θετικών αντιδράσεων μετά από 48-72 ώρες (± 6 ώρες) στους 29°C ± 2°C / % positiva reaktioner efter 48-72 h. (± 6 h) vid 29°C ± 2°C /<br>% af positive reaktioner efter 48-72 timer ved 29°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 48-72 godzinach (± 6 godzin) w 29°C ± 2°C |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| API 20 C AUX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | V3.0 | 0   | GLU | GLY | 2KG | ARA | XYL | ADO | XLT | GAL | INO | SOR | MDG | NAG | CEL | LAC | MAL | SAC | TRE | MLZ | RAF | HYP |
| Candida albicans 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 0    | 100 | 14  | 99  | 2   | 88  | 94  | 90  | 99  | 0   | 94  | 85  | 99  | 0   | 0   | 99  | 97  | 97  | 5   | 0   | 99  |     |
| Candida albicans 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 0    | 100 | 1   | 99  | 1   | 90  | 1   | 75  | 99  | 0   | 70  | 1   | 99  | 0   | 0   | 90  | 1   | 5   | 1   | 0   | 99  |     |
| Candida boidinii                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 0    | 100 | 55  | 1   | 0   | 89  | 70  | 89  | 25  | 0   | 95  | 1   | 55  | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 100 |     |
| Candida ciferrii                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 0    | 100 | 80  | 80  | 100 | 100 | 71  | 60  | 100 | 100 | 43  | 0   | 99  | 60  | 0   | 99  | 100 | 99  | 0   | 99  | 100 |     |
| Candida colliculosa                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0    | 100 | 96  | 100 | 0   | 0   | 0   | 5   | 13  | 0   | 60  | 1   | 0   | 0   | 0   | 3   | 99  | 60  | 0   | 96  | 25  |     |
| Candida dubliniensis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 0    | 100 | 96  | 99  | 0   | 0   | 99  | 50  | 100 | 3   | 99  | 0   | 40  | 0   | 0   | 100 | 60  | 0   | 0   | 0   | 99  |     |
| Candida famata                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 0    | 100 | 96  | 98  | 60  | 60  | 98  | 75  | 99  | 0   | 100 | 99  | 99  | 89  | 70  | 100 | 100 | 96  | 78  | 75  | 1   |     |
| Candida glabrata                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 0    | 100 | 20  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 94  | 0   | 0   | 1   |     |
| Candida guilliermondii                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0    | 100 | 99  | 97  | 79  | 85  | 97  | 92  | 99  | 0   | 97  | 88  | 99  | 95  | 0   | 94  | 100 | 99  | 90  | 95  | 46  |     |
| Candida kefyr                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 0    | 100 | 27  | 0   | 1   | 18  | 1   | 25  | 100 | 0   | 34  | 0   | 0   | 1   | 95  | 1   | 100 | 1   | 1   | 96  | 75  |     |
| Candida krusei/inconspicua                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0    | 99  | 73  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 6   | 0   | 2   | 0   | 64  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 79  |     |
| Candida lusitanae                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0    | 100 | 90  | 95  | 1   | 65  | 95  | 20  | 30  | 0   | 99  | 60  | 95  | 80  | 0   | 100 | 99  | 100 | 99  | 0   | 75  |     |
| Candida magnoliae                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0    | 100 | 32  | 50  | 0   | 0   | 0   | 0   | 10  | 0   | 60  | 0   | 0   | 0   | 0   | 2   | 97  | 10  | 1   | 75  | 1   |     |
| Candida norvegensis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0    | 100 | 85  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 0   | 0   | 0   | 25  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 93  |     |
| Candida parapsilosis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 0    | 100 | 94  | 88  | 89  | 89  | 93  | 3   | 99  | 0   | 99  | 89  | 99  | 0   | 0   | 100 | 100 | 93  | 99  | 1   | 99  |     |
| Candida pelliculosa                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0    | 100 | 99  | 0   | 0   | 67  | 1   | 1   | 56  | 0   | 70  | 95  | 1   | 70  | 0   | 97  | 99  | 87  | 96  | 30  | 70  |     |
| Candida rugosa                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 0    | 100 | 74  | 0   | 1   | 70  | 1   | 26  | 99  | 0   | 94  | 0   | 59  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 99  |     |
| Candida sphaerica 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0    | 100 | 31  | 2   | 0   | 2   | 0   | 62  | 99  | 0   | 99  | 68  | 0   | 35  | 1   | 95  | 100 | 99  | 29  | 76  | 99  |     |
| Candida sphaerica 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0    | 100 | 88  | 1   | 0   | 1   | 0   | 36  | 94  | 0   | 99  | 50  | 0   | 31  | 99  | 80  | 100 | 53  | 80  | 64  | 1   |     |
| Candida tropicalis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 0    | 100 | 9   | 99  | 1   | 96  | 99  | 12  | 99  | 0   | 99  | 69  | 99  | 17  | 1   | 99  | 73  | 100 | 72  | 1   | 99  |     |
| Candida utilis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 0    | 100 | 99  | 0   | 0   | 60  | 0   | 1   | 5   | 0   | 1   | 3   | 0   | 37  | 0   | 98  | 96  | 16  | 72  | 79  | 69  |     |
| Candida zeylanoides                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0    | 100 | 100 | 87  | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 99  | 0   | 99  | 0   | 0   | 0   | 0   | 74  | 0   | 0   | 75  |     |
| Cryptococcus albidus                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 0    | 100 | 0   | 98  | 80  | 81  | 0   | 0   | 6   | 30  | 60  | 65  | 0   | 99  | 10  | 98  | 100 | 82  | 81  | 51  | 1   |     |
| Cryptococcus humicolus                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0    | 100 | 82  | 100 | 100 | 100 | 36  | 64  | 100 | 100 | 95  | 100 | 100 | 98  | 100 | 100 | 99  | 99  | 95  | 99  | 99  |     |
| Cryptococcus laurentii                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0    | 100 | 6   | 92  | 99  | 99  | 69  | 76  | 99  | 84  | 53  | 76  | 92  | 96  | 99  | 92  | 99  | 92  | 96  | 99  | 25  |     |
| Cryptococcus neoformans                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0    | 100 | 0   | 100 | 14  | 91  | 71  | 1   | 93  | 97  | 100 | 99  | 88  | 10  | 0   | 99  | 99  | 75  | 97  | 88  | 25  |     |
| Cryptococcus terreus                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 0    | 100 | 0   | 100 | 87  | 100 | 0   | 0   | 45  | 50  | 99  | 0   | 96  | 96  | 36  | 0   | 0   | 54  | 0   | 0   | 1   |     |
| Cryptococcus uniguttulatus                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0    | 100 | 3   | 99  | 99  | 99  | 3   | 0   | 1   | 99  | 50  | 99  | 100 | 0   | 0   | 100 | 100 | 75  | 100 | 7   | 25  |     |
| Geotrichum capitatum                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 0    | 95  | 92  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 25  | 0   | 10  | 0   | 2   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 95  |     |
| Geotrichum penicillatum                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0    | 100 | 100 | 0   | 0   | 92  | 0   | 0   | 75  | 0   | 88  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 92  |     |
| Hansenula polymorpha                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 0    | 100 | 84  | 0   | 1   | 1   | 66  | 36  | 0   | 0   | 90  | 1   | 1   | 20  | 0   | 94  | 90  | 46  | 97  | 0   | 2   |     |
| Kloeckera spp                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 0    | 100 | 0   | 50  | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 96  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   |     |
| Pichia ohmeri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 0    | 100 | 99  | 96  | 0   | 0   | 66  | 0   | 84  | 0   | 93  | 98  | 99  | 56  | 0   | 99  | 99  | 93  | 0   | 80  | 84  |     |
| Prototheca wickerhamii                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0    | 100 | 100 | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 55  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 100 | 0   | 0   | 1   |     |
| Rhodotorula glutinis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 0    | 100 | 15  | 91  | 0   | 0   | 8   | 0   | 50  | 0   | 84  | 3   | 0   | 1   | 0   | 91  | 100 | 59  | 84  | 96  | 1   |     |
| Rhodotorula mucilaginosa 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0    | 100 | 5   | 4   | 15  | 33  | 92  | 61  | 10  | 0   | 5   | 0   | 0   | 0   | 0   | 33  | 100 | 5   | 1   | 87  | 25  |     |
| Rhodotorula mucilaginosa 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0    | 100 | 60  | 1   | 80  | 80  | 64  | 52  | 80  | 0   | 60  | 1   | 0   | 1   | 0   | 98  | 100 | 95  | 86  | 98  | 25  |     |
| Rhodotorula minuta                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 0    | 100 | 100 | 100 | 98  | 95  | 3   | 0   | 0   | 0   | 5   | 0   | 85  | 60  | 1   | 0   | 95  | 95  | 95  | 0   | 1   |     |
| Saccharomyces cerevisiae 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0    | 100 | 8   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 78  | 0   | 1   | 13  | 0   | 0   | 0   | 75  | 90  | 2   | 1   | 62  | 30  |     |
| Saccharomyces cerevisiae 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0    | 100 | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 99  | 0   | 1   | 29  | 0   | 0   | 0   | 99  | 99  | 99  | 85  | 81  | 25  |     |
| Sporobolomyces salmonicolor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0    | 100 | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 5   | 0   | 80  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 100 | 85  | 0   | 70  | 90  |     |
| Trichosporon asahii                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0    | 100 | 20  | 100 | 100 | 100 | 0   | 5   | 100 | 0   | 1   | 94  | 100 | 100 | 100 | 100 | 98  | 66  | 20  | 0   | 95  |     |
| Trichosporon inkin                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 0    | 100 | 4   | 100 | 0   | 98  | 0   | 0   | 95  | 98  | 0   | 100 | 57  | 100 | 95  | 100 | 100 | 95  | 89  | 0   | 95  |     |
| Trichosporon mucoides                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0    | 100 | 40  | 99  | 74  | 100 | 53  | 65  | 100 | 92  | 78  | 100 | 94  | 100 | 100 | 100 | 100 | 78  | 82  | 99  | 95  |     |

**ANEXO II-A.** O quadro abaixo exibe o Padrão de assimilação dos açúcares presentes no kit API 20C pelas leveduras não *albicans*.

| Cepas              | 0 | Glu | Gly | 2Kg | Ara | Xyl | Ado | Xlt | Gal | Ino |
|--------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 26 <sup>A</sup> 6  | - | +   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   |
| 26 <sup>A</sup> 7  | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 2-6 <sup>A</sup> 8 | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 30 <sup>A</sup> 6  | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 30 <sup>A</sup> 7  | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 30 <sup>A</sup> 8  | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 34 <sup>A</sup> 6  | - | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 34 <sup>A</sup> 7  | - | +   | +   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 34 <sup>A</sup> 8  | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 34 <sup>A</sup> 9  | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 34 <sup>A</sup> 10 | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 34B2               | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 34M2               | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 45M0               | - | +   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 45M2               | - | +   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 45M4               | - | +   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 45M5               | - | +   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 46M                | - | +   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 50M6               | - | +   | +   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 53M6               | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 53M7               | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 53M8               | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 56M1               | - | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 56M3               | - | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 56M4               | - | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 56M5               | - | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 56M6               | - | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 56M7               | - | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 56M8               | - | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -   |
| 56M9               | - | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 56M10              | - | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 56M11              | - | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |

(+): para assimilação positiva / (-): para assimilação negativa Relação de açúcares testados: (0) nenhum/ (Glu) D-glucose/ (Gly) Glicerol/ (2Kg) cálcio 2- ceto- Gluconato/ (Ara) L- arabinose/ (Xyl) D- xilitose/ (Ado) Adonitol/ (Xlt) Xilitol/ (Gal) D- galactose/ (Ino) Inositol

**ANEXO II - B.** O quadro abaixo exibe o padrão de assimilação dos açúcares presentes no kit API 20C pelas leveduras não *albicans*.

| Cepas              | Sor | Mdg | Nag | Cel | Lac | Mal | Sac | Tre | Mlz | Raf |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 26 <sup>A</sup> 6  | +   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | +   | -   | -   |
| 26 <sup>A</sup> 7  | +   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | +   | -   | -   |
| 26 <sup>A</sup> 8  | +   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | +   | -   | -   |
| 30 <sup>A</sup> 6  | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 30 <sup>A</sup> 7  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| 30 <sup>A</sup> 8  | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 34 <sup>A</sup> 6  | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| 34 <sup>A</sup> 7  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 34 <sup>A</sup> 8  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 34 <sup>A</sup> 9  | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 34 <sup>A</sup> 10 | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 34B2               | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 34M2               | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 45M0               | -   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 45M2               | +   | -   | +   | -   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 45M4               | +   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 45M5               | +   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | -   | +   | -   |
| 46M                | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 50M6               | +   | +   | +   | -   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 53M6               | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 53M7               | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 53M8               | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 56M1               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| 56M3               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 56M4               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 56M5               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 56M6               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 56M7               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| 56M8               | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   |
| 56M9               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 56M10              | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 56M11              | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |

(+): para assimilação positiva / (-): para assimilação negativa. Relação de açúcares testados : (Sor) D- Sorbitol/ (Mdg) Metil- $\alpha$ D-Glucopiranosido/ (Nag) N- Acetil- Glucosamina/ (Cel) D-celobiose/ (Lac) L- lactose/ (Mal) D- Maltose/ (Sac) D- Sacarose/ (Tre) D- Trealose/ (Mlz) D-Melezitose/ (Raf) Rafinose

**ANEXO III.** Composição dos meios de cultura utilizados nos testes***Meios de cultura*****Meio Completo para levedura**

|                              |               |
|------------------------------|---------------|
| Peptona                      | 10 g          |
| Extrato de levedura          | 10 g          |
| Fosfato dibásico de potássio | 0,5 g         |
| Glicose                      | 20 g          |
| Ágar bacteriológico          | 20 g          |
| Água destilada               | q.s.p 1000 mL |

Autoclavar por 15 minutos a 121°C

**Yest Peptone Dextrose(YPD)**

|                     |               |
|---------------------|---------------|
| Extrato de levedura | 10 g          |
| Peptona             | 10 g          |
| Glicose             | 20 g          |
| Água destilada      | q.s.p 1000 mL |

Autoclavar por 15 minutos a 121°C

**Yest Peptone Dextrose com glicerol a 15%(YPD- glicerol)**

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Yest Peptone Dextrose | 700 mL |
| Glicerol              | 300 mL |

Autoclavar por 15 minutos a 121°C

### **Ágar- Fubá Tween 80**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Fubá                | 6,25 g |
| Ágar bacteriológico | 1,9 g  |
| Água destilada      | 150 mL |
| Tween 80            | 1,5 mL |

Autoclavar por 15 minutos a 121°C

### **Meio para Teste de Assimilação de Carboidratos**

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Sulfato de amônia   | 5 g     |
| Sulfato de magnésio | 0,3 g   |
| Fosfato de potássio | 1 g     |
| Ágar bacteriológico | 16,5 g  |
| Água destilada      | 1000 mL |

Autoclavar por 15 minutos a 121°C

### **Meio para Fermentação**

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Extrato de levedura | 5 g     |
| Peptona             | 5 g     |
| Água destilada      | 1000 mL |

Autoclavar por 15 minutos a 121°C

### **CHROMagar Candida**

|                                            |         |
|--------------------------------------------|---------|
| CHROMagar Candida (CHROMagar)              | 24,0 g  |
| Água destilada esterelizada por 15 minutos | 1000 mL |

a 121°C

**RPMI-1640 (meio para teste de susceptibilidade aos antifúngicos)**

|                                                |         |
|------------------------------------------------|---------|
| L-glutamina                                    | 46,5 g  |
| glicose                                        | 20 g    |
| Água destilada                                 | 1000 mL |
| Ácido morfolinopropanosulfônico                | 0,165 M |
| Ausência de bicarbonato de sódio               |         |
| Esterilizado por filtração em filtro biológico |         |

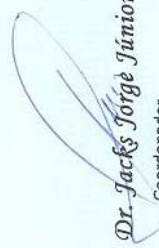
**Sabouraud Dextrose Hipertônico**

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Peptona                           | 1 g     |
| Glicose                           | 4 g     |
| Cloreto de Sódio 6,5%             | 6,5 g   |
| Água destilada                    | 1000 mL |
| Autoclavar por 15 minutos a 121°C |         |

**Agar Sabouraud Dextrose**

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Peptona                           | 10 g    |
| Glucose                           | 40 g    |
| Agar bacteriológico               | 15 g    |
| Água destilada                    | 1000 mL |
| Autoclavar por 15 minutos a 121°C |         |

**ANEXO IV – Comitê de Ética em pesquisa aprovado pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (# 008/2003).**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p><b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b><br/>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS<br/>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA</p> <p><b>CERTIFICADO</b></p>  | <p>Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Prevalência de Candida spp. em bolsas periodontais e outros sítios da cavidade bucal de pacientes com doença periodontal. Fatores de virulência, susceptibilidade aos antifúngicos e tipagem molecular", sob o protocolo nº 008/2003, das Pesquisadoras <b>Letizia Monteiro de Barros, Vivian Fernandes Furletti e Priscilla de Laet Sant'Ana Mariano</b>, sob a responsabilidade do Prof. Dr. <b>José Francisco Hofling</b>, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP, em 05 de maio de 2003.</p> <p>We certify that the research project with title "Prevalence of candida spp in periodontal pockets and other oral sites from patients with periodontal disease.virulence factors, susceptibility tests and genotyping", protocol nº 008/2003, by Researcher <b>Letizia Monteiro de Barros, Vivian Fernandes Furletti and Priscilla de Laet Sant'Ana Mariano</b>, responsibility by Prof. Dr. <b>José Francisco Hofling</b>, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas), in May 05 2003.</p> | <p>Piracicaba, SP, Brazil, September 03 2004</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="1157 1176 1284 1724"> <br/> <b>Prof<sup>a</sup>. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchouy</b><br/>             Secretária<br/>             CEP/FOP/UNICAMP           </div> <div data-bbox="1093 660 1284 996"> <br/> <b>Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior</b><br/>             Coordenador<br/>             CEP/FOP/UNICAMP           </div> </div> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|