

CLÉLIA APARECIDA DE PAIVA MARTINS

**PRESENÇA DE MICRORGANISMOS DOS GÊNEROS
Staphylococcus E *Candida* NA CAVIDADE BUCAL
HUMANA**



Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, Área de Concentração em Biopatologia Bucal.

Orientador: Prof. Adj. Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2001

ND 17

M 366p

t 1445

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:

BELLINI, A. B.; SILVA, E.A. **Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico**. São José dos Campos: FOSJC/UNESP, 2000, 81p.

MARTINS, C.A.P. **Presença de microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Candida* na cavidade bucal humana**. 2001. 124f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

A Deus,

que sempre iluminou e guiou meu caminho.

...é maravilhoso, Senhor, ter tanto a pedir e muito mais a agradecer.

A meus pais, **Galdino** e **Maria**, que, com sacrifício, deixaram de lado seus sonhos para realizar os meus, pelo amor incondicional que, em minha vida foi sempre abrigo e alavanca, com amor, souberam me ensinar a amar e com compreensão, entenderam os momentos de minha ausência.

A **Paulo Rogério**, marido e amigo, pelo apoio e compreensão nas horas mais difíceis.

Aos meus irmãos **Celso, Carlos, Cleonice, Claudisney** e **César**, pela amizade, confiança e amor.

Às minhas cunhadas, **Aparecida, Lourdes** e **Nadir** pela atenção e afeto.

Às minhas sobrinhas **Débora, Jéssica, Joyce** e **Renata**, esperança de um futuro melhor.

Aos meus amigos **Evanir, Edner** e **Edmilson**, pela força e apoio demonstrados em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Prof. Adj. **Antonio Olavo Cardoso Jorge**, agradeço pela orientação, exemplo de dedicação e idealismo incansável, incentivando e orientando-me, não só neste trabalho, mas também ao longo da minha carreira.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, na pessoa de sua diretora, Profa. Titular **Maria Amélia Máximo de Araujo**, pela oportunidade de realizar este curso e concretizar este trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal, em especial à Profa. Adj. **Yasmin Rodarte Carvalho**, Coordenadora de Área, pela inestimável colaboração.

À Profa. Adj. **Carmelinda Schmidt Unterkircher**, pelas valiosas sugestões, imensa boa vontade e simpatia durante a realização do presente trabalho.

À Profa. Dra. **Rosilene Fernandes da Rocha**, pela atenção com que sempre me acolheu nos momentos de incertezas.

À Profa. Dra. **Mônica Fernandes Gomes**, pela colaboração, e carinho que sempre demonstrou para comigo.

Ao Prof. **Ivan Balducci** pela ajuda na elaboração da análise estatística.

Às Bibliotecárias **Ângela de Brito Bellini** e **Silvana Alvarez** da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, pela colaboração, dedicação e amizade demonstrada durante a elaboração deste trabalho.

Ao pessoal técnico de serviço da Biblioteca e Documentação, pela colaboração imprescindível nas referências bibliográficas.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação, pela paciência e disponibilidade no decorrer do curso.

Aos queridos amigos **Antônio Carlos, Fujiko Yamasiro, Maria Victória, Claudia Ota e Sônia Khouiri**, com quem dividi meus sonhos e esperanças durante o tempo de convivência.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal, pelo apoio, carinho e compreensão.

À Sra. **Terezinha de Fátima Arantes de Mello** e **Sílvia Scarpel**, pela atenção e presteza dispensadas durante a realização deste trabalho.

À minha querida amiga **Terezinha Sant'Ana de Oliveira Costa**, pela amizade, dedicação, compreensão e paciência na digitação deste trabalho.

"Querer é uma grande coisa porque ação e trabalho costumam acompanhar o querer e quase sempre o trabalho é seguido de êxito. Porque as três coisas: Vontade, Trabalho e Êxito acompanham a existência humana. A vontade abre a porta para carreiras brilhantes e felizes, o trabalho faz penetrar por ela, e, no fim da jornada, o êxito vem coroar a obra".

PASTEUR, 1831

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE QUADROS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Gênero <i>Candida</i>	18
2.1.1 <i>Candida albicans</i>	20
2.1.2 <i>Candida glabrata</i>	24
2.1.3 <i>Candida guilliermondii</i>	24
2.1.4 <i>Candida kefyr</i>	25
2.1.5 <i>Candida krusei</i>	25
2.1.6 <i>Candida parapsilosis</i>	26
2.1.7 <i>Candida tropicalis</i>	27
2.1.8 <i>Candida dubliniensis</i>	28
2.2 Patogenicidade do Gênero <i>Candida</i>	29
2.3 Gênero <i>Staphylococcus</i>	38
3 PROPOSIÇÃO	51
4 MATERIAL E MÉTODO	52

4.1 Coleta do material	52
4.2 Identificação dos isolados	53
4.2.1 Produção de clamidoconídeos	54
4.2.2 Produção de tubo germinativo	54
4.2.3 Fermentação de carboidratos	55
4.2.4 Assimilação de carboidratos	55
4.2.5 Interpretação	56
4.3 Verificação do fator <i>killer</i>	58
4.4 Produção de fosfolipase	60
4.5 Produção de proteinase	60
4.6 Identificação de <i>Staphylococcus spp</i>	61
4.6.1 Produção de catalase	62
4.6.2 Produção de coagulase	62
4.6.3 Voges Proskauer (VP)	63
4.6.4 Fermentação de D-treose	63
4.6.5 Beta-galactosidase (ONPG)	63
4.7 Análise estatística	64
5 RESULTADOS	65
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO	84
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	108
ABSTRACT	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Média de UFC/ml e distribuição de frequência das espécies de leveduras do gênero <i>Candida</i> isoladas da cavidade bucal de indivíduos de 25 a 75 anos através de enxágüe bucal.....	65
Tabela 2-	Média e distribuição de frequência das espécies do gênero <i>Staphylococcus</i> isoladas da cavidade bucal de indivíduos de 25 a 75 anos através de enxágüe bucal.....	66
Tabela 3-	Distribuição de frequência Biotipos <i>killer</i> e grau de atividade enzimática entre proteinase e fosfolipase de amostras isoladas de seres humanos através de enxágüe bucal	68
Tabela 4-	Dados referente à contagem de unidades formadoras de colônia de <i>C.albicans</i> e de bactérias do gênero <i>Staphylococcus</i> isolados da cavidade bucal de trinta (42,85%) dos indivíduos examinados	69
Tabela 5-	Dados referente à contagem de unidades formadoras de colônia de <i>C.albicans</i> e <i>S.aureus</i> isolados da cavidade bucal de de cinco pacientes (7,14%) dos indivíduos examinados	69
Tabela 6-	Dados referente à contagem de unidades formadoras de colônia de <i>Staphylococcus aureus</i> e leveduras do gênero <i>Candida</i> isoladas da cavidade bucal de nove pacientes (12,85%) dos indivíduos examinados	70
Tabela 7-	Dados referente à contagem de unidades formadoras de colônia <i>S.hyicus</i> , <i>S.schleiferi</i> , <i>C.tropicalis</i> e <i>C.albicans</i> isoladas da cavidade bucal de seres humanos através do enxágüe bucal	70

Tabela 8-	Correlação entre o logaritmo das unidades formadoras de colônia de <i>Candida</i> e <i>Staphylococcus</i> isoladas das cavidade bucal através do enxágüe bucal	119
Tabela 9-	Correlação entre o logaritmo das unidades formadoras de colônia de <i>Candida</i> e <i>Staphylococcus</i> e as respectivas espécies identificadas, isoladas da cavidade bucal através de enxágüe bucal.....	121

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Características culturais, assimilação e fermentação de carboidratos pelas amostras de <i>Candida</i> isoladas da cavidade bucal de indivíduos de 25 a 75 anos através do enxágüe bucal	57
Quadro 2-	Cepas padrão com sua procedência, utilizadas para verificação do fator <i>Killer</i>	59
Quadro 3-	Modelos de biótipo killer segundo Polonelli et al ¹¹⁰ ., 1983. O código é atribuído considerando-se 3 dígitos.....	59
Quadro 4-	Atividade enzimática conforme o Pz e o código, segundo Price et al ¹¹⁴ ., 1982	61
Quadro 5-	Características culturais de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	=	porcentagem
µm	=	micrograma
DNA	=	ácido desoxirribonucleico
Fc	=	fragmento cristalizado
G + C	=	guanina e citosina
IgG	=	imunoglobulina
K	=	killer
KOH	=	hidróxido de potássio
M	=	mol
mg	=	miligrama
mL	=	mililitro
mm	=	milímetro
°C	=	grau Celsius
ONPG	=	orto-nitrofenilgalactosideo
PBS	=	solução fisiológica tamponada
pH	=	potencial de hidrogênio iônico
spp	=	espécies
UFC/ml=	=	unidades formadoras de colônia de microrganismo por mililitro
VP	=	Voges Proskauer
Xg	=	gravidade
K ₂ HPO ₄	=	hidrogenofosfato de potássio

MARTINS, C.A.P. Presença de microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Candida* na cavidade bucal humana. 2001. 124f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

RESUMO

A presença de leveduras do gênero *Candida* e *Staphylococcus* na cavidade bucal humana adquire importância, pois pode atuar como microbiota suplementar e, em determinadas situações, ocasiona doença bucal ou sistêmica. O objetivo do presente trabalho foi correlacionar a presença de leveduras do gênero *Candida* e espécies de *Staphylococcus* na cavidade bucal humana. Enxágüe bucal foram coletados de setenta indivíduos e, a seguir semeados em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e ágar Baird-Parker. Após crescimento, os microrganismos foram isolados e identificados através das provas bioquímicas. Os dados foram analisados através de análise de variância (Anova). Leveduras do gênero *Candida* foram encontradas em 71,42% dos indivíduos examinados, sendo *C.albicans* a mais frequente. *Staphylococcus* spp. foram isolados em 92,85% das cavidades bucais, sendo 41 cepas coagulase-negativas (63%). Das cepas coagulase positivas, nove eram *S.aureus*, 11 *S.hyicus* e quatro *S.schleiferi* subespécie *coagulans*. Não ocorreu entretanto correlação entre as quantidades de unidades formadoras de colônia de *Candida* e *Staphylococcus* encontradas nos enxágües bucais dos indivíduos examinados.

PALAVRAS-CHAVE: *Staphylococcus*; *Candida*; fosfolipase; proteinase; fator *killer* ,
cavidade oral

1 INTRODUÇÃO

A prevalência de microrganismos do gênero *Candida* e *Staphylococcus* é comum na microbiota bucal humana. Esses microrganismos acham-se amplamente distribuídos na natureza e podem ser isolados de ambientes ou como habitantes comensais da pele, mucosas e outros sítios em seres humanos e animais.

C.albicans é a principal espécie do gênero *Candida* e é o agente etiológico da candidose, infecção oportunista, com desenvolvimento relacionado a fatores predisponentes locais ou sistêmicos. A infecção por *Candida* é freqüente no palato de portadores de próteses totais, na glossite rombóide mediana, em pacientes imunocomprometidos e naqueles que receberam antibioticoterapia ou drogas que causam xerostomia.

Staphylococcus aureus é um importante patógeno bacteriano no ser humano e pode provocar ampla gama de doenças, incluindo doenças sistêmicas fatais, infecções oportunistas e doenças das vias urinárias. Outras espécies de *Staphylococcus* também são responsáveis por diversas infecções oportunistas no ser humano e em animais.

A presença de leveduras e *Staphylococcus* na cavidade bucal humana adquire importância, pois podem atuar como microbiota suplementar e, em determinadas situações, ocasionar doença bucal ou sistêmica. Assim, a partir do exposto, o objetivo do presente trabalho foi correlacionar a presença de leveduras do gênero *Candida* e espécies de *Staphylococcus* na cavidade bucal humana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gênero *Candida*

Em 1959 realizou-se em Montreal (Canadá) o 9º Congresso Internacional de Botânica, onde o gênero *Candida* foi consagrado como “*nomen conservandum*”, substituindo antigas denominações que eram utilizadas na terminologia médica como *Oidium* e *Monillia* (Lodder⁷⁴ 1970).

O gênero *Candida* compreende aproximadamente duzentas espécies, número que, com o passar do tempo, está sofrendo mudanças contínuas em sua taxonomia e nomenclatura (Barnett et al.⁶,1991).

Por não apresentar formas sexuadas, o gênero *Candida* é classificado como fungo imperfeito da classe *Deuteromycetes* (McCullough et al.⁸³ 1996). *C.albicans*, *C.tropicalis* e *C.glabrata* são as espécies mais freqüentemente isoladas de candidoses (mais de 80%). *C.parapsilosis*, *C.stellatoidea*, *C.guilliermondii*, *C.krusei* são também isoladas de diferentes espécimes clínicos (Scully et al.¹³⁶ 1994). No entanto, o principal patógeno humano do gênero é, sem dúvida, *C.albicans*, embora outras espécies também atuem como importantes

agentes de infecções humanas e animais (Rinaldi¹²¹, 1993; Neville et al.⁹⁰, 1995).

Em 1997 foi descrita na literatura *C.dubliniensis*, uma nova espécie capaz de causar infecção em humanos que até aquele momento não se diferenciava de *C.albicans* (Coleman et al.²¹, 1997).

As infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* afetam o homem freqüentemente e sua incidência tem aumentado com o crescente uso de antibiótico de amplo espectro, drogas anti-fúngicas, agentes imunossupressores e, mais recentemente, com a epidemia da AIDS (Frost et al.³³, 1996).

Quando ocorre uma ruptura do equilíbrio biológico, geralmente resultante de fatores predisponentes (patológicos, fisiológicos, imunológicos e mecânicos), há um aumento na multiplicação e/ou invasão de microrganismos em tecidos, instalando-se a infecção (Odds⁹³, 1988; Ghannoum & Abu-Elteen³⁷ 1990).

Segundo Brawner & Cutler¹⁷ (1989), a ocorrência de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal varia de 10 a 50%, atingindo em alguns casos até 80%. Esta diferença pode ser decorrente de inúmeros fatores tais como: método da coleta, sítios anatômicos analisados, grupos de indivíduos selecionados por idade, sexo, dieta alimentar, dentados sadios e os que fazem uso de próteses parciais ou totais.

Peçanha et al.¹⁰⁴ (1996) sugeriram que esses microrganismos podem ser usados como método complementar de monitoração da qualidade da água e verificaram diferenças significantes na contagem desse gênero entre locais poluídos e não poluídos do Ribeirão Claro, em Rio Claro (São Paulo). Os autores sugerem que a água pode ser fonte de contaminação para humanos.

Paula et al.¹⁰³ (1990) estudaram cinquenta pacientes com câncer bucal antes e durante a radioterapia. Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas antes da radioterapia 56% e durante a radioterapia 72%.

Kubo et al.⁶⁹ (1997) isolaram leveduras do gênero *Candida* em 11% dos canais radiculares de dentes com comprometimento pulpar, sendo a espécie *C.albicans* encontrada em 8% dos canais examinados.

2.1.1 *Candida albicans*

Sob o ponto de vista microbiológico, *C.albicans* é um fungo dimórfico que, na forma de levedura, apresenta-se como células globosas, Gram positivas, ovaladas ou alongadas, medindo em média 3 a 7µm de largura por 3 a 14µm de comprimento. Quando na forma de micélio, apresenta-se como pseudohifas ou hifas verdadeiras que se

alongam a partir das leveduras em formas filamentosas (Odds⁹²⁻³, 1987 e 1988).

Em meio de cultura líquido, *C.albicans* forma sedimento, enquanto em ágar Sabouraud, a colônia apresenta coloração branca amarelada, com 4 a 8mm de diâmetro, podendo apresentar filamentos nas bordas. No microcultivo, a formação de pseudo-hifas é abundante, podendo-se detectar hifas verdadeiras. Em soro a 37°C, produz tubo germinativo. Quando cultivada em ágar fubá, desenvolve estruturas esféricas características formando clamidoconídeos ou clamidósporos. Fermenta glicose e maltose, não ocorrendo o mesmo com lactose. Geralmente não fermenta sacarose, sendo a fermentação de galactose variável. Como fontes de carbono, assimila dextrose, galactose, maltose, trealose, xilose, sacarose, manitol e, eventualmente, arabinose, ribose e glucitol (Meyer et al.⁸⁷, 1984).

C.albicans cresce em aerobiose, podendo, porém, ser capaz de crescer em anaerobiose (Odds⁹², 1987). A formação de micélio *in vitro* é acentuada em condições de anaerobiose (Dahle & Olsen²⁵, 1991) e a presença de microfilamentos no citoplasma parece ser essencial para sua filamentação. É classificada em sorotipos A e B (Hasenclever & Mitchell⁴⁷,1961; Yokoyama et al.¹⁶⁰, 1990; McMullan-Vogel et al.⁸⁵, 1999), porém o grau de virulência das amostras de *C.albicans* para camundongos não está bem relacionada com os mesmos (Hasenclever & Mitchell⁴⁸,1962). Nas candidoses e na estomatite por

prótese total, predomina o sorotipo A (Martin & Lamb⁸¹, 1982), porém, em indivíduos imunocomprometidos, como na Aids, a predominância é do sorotipo B (Brawner & Cutler¹⁷, 1989; McMullan-Vogel et al.⁸⁵, 1999).

A parede celular de *C. albicans* é formada por uma estrutura complexa constituída de cinco a oito camadas e com aproximadamente 100 a 300nm de espessura. Seus principais componentes, em ambas as fases (leveduras e filamentos), são carboidratos presentes na forma de glucanas e mananas (80 a 90%), apresentando também proteínas (3 a 6%) e lipídeos (2%) (Ghannoum & Radwan³⁸, 1990; Shepherd¹³⁷, 1990). Análises bioquímicas demonstraram que seu principal constituinte é a manana (polissacarídeos altamente ramificados), representando 35 a 40% do seu peso total (Summers et al.¹⁴⁶, 1964). Diferenças em sua estrutura são observadas frente a sorotipos A e B (Hasenclever & Mitchell⁴⁷, 1961).

Jorge et al.⁵⁶ (1997) relataram a presença de *C.albicans* em 27,6% das cavidades bucais de 428 jovens (17-23 anos) e em 33,1% das crianças (3-14 anos) com saúde bucal. Os autores demonstraram que a presença de *Candida* foi maior em indivíduos que apresentavam fatores predisponentes com o uso de prótese total (50%), aparelhos ortodônticos extrabuciais (45%), periodontite do adulto (43%), aparelho ortodôntico fixo (38%) e respiração bucal (35%).

Produção de enzimas representa um importante mecanismo de patogenicidade de *C.albicans*, facilitando sua penetração

nos tecidos. Vários autores relataram a produção de proteinase (Borg & Rüchel¹³⁻⁴, 1988 e 1990; Neely & Holder⁸⁹, 1990, Pires et al.¹⁰⁶, 1996) e fosfolipase por amostras do gênero *Candida* (Price et al.¹¹⁴, 1982; Barret-Bee et al.⁷, 1985; Banno et al.⁵, 1985, Oliveira et al.⁹⁸, 1998). Analisando cepas de *Candida* isoladas do sulco gengival de indivíduos sadios e portadores de periodontite crônica do adulto, Jorge⁵⁴ (1995) verificou a produção de hialuronidase e condroitin sulfatase em menor porcentagem nos controles do que na presença de periodontite. No mesmo trabalho, relatou isolamento de *C.albicans* em número maior na saliva de pacientes com periodontite crônica em relação aos pacientes controles com diferença significativa.

As candidoses por *C.albicans* podem ser superficiais ou profundas, com localização mucosa, mucocutânea, visceral ou sistêmica e com fungemias. Pode causar flebite supurativa, artrite, osteomielite, endoftalmite, vaginite, balanite e lesões do sistema nervoso central. A administração endovenosa de *C.albicans* em coelho e camundongos produz grave infecção renal (Lacaz et al.⁷¹, 1998).

C.stellatoidea tem sido considerada atualmente como uma variante sacarose negativa de *C.albicans* devido à identidade existente entre as bases de DNA destas duas leveduras (Kwon-Chung et al.⁷⁰, 1989; Meyer et al.⁸⁷, 1984; Lacaz et al.⁷¹, 1998).

2.1.2 *Candida glabrata*

C. glabrata é isolada freqüentemente na cavidade bucal de pacientes portadores de prótese total, inclusive naqueles com estomatite (Vandenbussche & Swinne¹⁵², 1984). Denominada anteriormente *Torulopsis glabrata*, representa aproximadamente 7% das espécies isoladas da boca. As colônias geralmente são pequenas, lisas e branco-amareladas (Larone⁷³, 1995). Não produzem pseudo-hifas ou hifas verdadeiras em microcultivo, podendo estar relacionadas com endocardite e fungemias sistêmicas (Komshian et al.⁶⁵, 1989), havendo também a possibilidade de acometerem o trato urinário, atingir os pulmões e outros locais (Larone⁷³, 1995).

2.1.3 *Candida guilliermondii*

C. guilliermondii apresenta células curtas, ovóides ou cilíndricas, medindo cerca de 2 a 4µm de comprimento. Suas colônias têm coloração creme, são brilhantes e lisas ou opacas e rugosas. Forma pseudomicélio, fermenta glicose exibindo fraca reação para galactose, sacarose e maltose. Além de ser recuperada normalmente da cavidade bucal, tem sido citada como agente etiológico de endocardites, fungemias hospitalares e outras doenças (Stenderup¹⁴³, 1990). Tem sido isolada de vagina, urina, cavidade bucal, ouvido e trato gastrintestinal. A espécie foi

encontrada em casos de mastite em bovinos e caprinos e também em abortos bovinos. Sua inoculação em animais de laboratório não produz infecção sistêmica (Larone⁷³, 1995; Lacaz et al.⁷¹, 1998).

2.1.4 *Candida kefyr*

C.kefyr, denominada anteriormente de *C. pseudotropicalis*, apresenta blastoconídeos alongados ou cilíndricos. Em ágar Sabouraud, apresenta colônias de tonalidade creme, lisas, opacas, com aproximadamente 1 a 2mm de diâmetro e são irregulares (Larone⁷³, 1995; Lacaz et al.⁷¹, 1998). No microcultivo, o pseudomicélio é abundante em algumas amostras, porém escasso em outras. É a única espécie de importância médica que fermenta e assimila lactose (Meyer et al.⁸⁷ 1984). Na cavidade bucal, sua presença tem sido associada com estomatite por prótese total (Olsen⁹⁹, 1974).

2.1.5 *Candida krusei*

C.krusei apresenta células ovóides e predominantemente cilíndricas, formando pseudomicélio. O tamanho das células é variável, medindo aproximadamente 3 a 5µm de largura por 6 a 20µm de comprimento. Em ágar Sabouraud dextrose, apresenta colônias amareladas, com aspecto parcialmente opaco e superfície lisa e rugosa.

Fermenta e assimila apenas glicose. Além de ser isolada da cavidade bucal de indivíduos saudáveis (Stenderup¹⁴³, 1990), tem sido descrita em outras infecções e fungemias hospitalares (McLlory⁸⁴, 1991).

No homem, pode provocar doença renal, esofagite, peritonite, vaginite e infecção urinária. Tem sido isolada de pacientes queimados, úlcera gástrica, unhas e escarro, e também de hemoculturas de pacientes com câncer (Larone⁷³, 1995; Lacaz et al.⁷¹, 1998). Apresenta alto nível de resistência ao fluconazol e tem aumentado os relatos de sua atividade como patógeno quando se tem usado mais essa substância em profilaxia antifúngica (Samaranayake & Samaranayake¹³¹, 1994).

2.1.6 *Candida parapsilosis*

C.parapsilosis apresenta células ovóides, curtas ou alongadas, medindo de 2,5 a 4µm de largura por 2,5 a 9µm de comprimento, podendo ocorrer pseudomicélio longo (Meyer et al.⁸⁷, 1984). Em ágar Sabouraud dextrose, apresenta colônias de tonalidade creme, opacas e lisas (Lacaz et al.⁷¹, 1998). Não fermenta lactose, sacarose e maltose, podendo ter provas fracamente positivas, mas assimila sacarose. É levedura oportunista no homem, podendo causar candidose superficial e sistêmica em pacientes imunocomprometidos. Causa vaginite, peritonite, candidose bucal, infecção no trato urinário, endocardite e

septicemia. Tem sido isolada do hemocultivo de usuários de droga (Larone⁷³, 1995; Lacaz et al.⁷¹, 1998).

Casos de fungemia por esta espécie foram associados a nutrição parenteral, uso de drenos e cateteres, antibióticos de largo espectro e diabetes (Watanakunakorn et al.¹⁵⁶, 1968; Plouffe et al.¹⁰⁷, 1977; Kontou-Kastellianou et al.⁶⁷, 1990).

2.1.7 *Candida tropicalis*

C.tropicalis demonstra células em brotamento, esféricas, ovais ou alongadas, medindo 2,5µm de largura por 3 a 14µm de comprimento, podendo apresentar-se em cachos ou cadeias, quando de observações em microscopia de luz. Cresce bem de 25 a 37°C em ágar Sabouraud dextrose, em aerobiose, produzindo colônias lisas e brancas, e forma película em caldo. No microcultivo, *C.tropicalis* forma pseudohifas, mas não clamidoconídeos (Meyer et al.⁸⁷, 1984). Embora algumas amostras possam formar tubos germinativos atípicos, a maioria não os produz (Martin⁸⁰, 1979; Martin & White⁸², 1981; Gelfand³⁴, 1989). Assimila glicose, maltose, sacarose, galactose, celobiose, xilose e trealose e fermenta glicose, maltose, sacarose, galactose e trealose (Gelfand³⁴, 1989). Segundo Nikawa et al.⁹¹ (1997), algumas cepas podem produzir tubo germinativo. Pode significar cerca de 7% dos isolados bucais do gênero *Candida* (MacFarlane⁷⁶1990). Muitos de seus isolados

apresentam alta frequência de variabilidade fenotípica e quase todos secretam proteinases durante infecção em humanos (Ruechel¹²⁵, 1990).

É implicada em candidoses invasivas e hospitalares (Marina et al.⁷⁹, 1991), cujas infecções são clinicamente indistinguíveis daquelas produzidas por *C.albicans*. Pode ser encontrada no ambiente bem como em culturas de rotina de nariz, garganta, pele, vagina e trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis ou isolados de pacientes com neutropenias graves (Komshian et al.⁶⁵ 1989).

2.1.8 *Candida dubliniensis*

Recentemente *C.dubliniensis* foi reconhecida como uma nova espécie de levedura, podendo causar infecções oportunistas, principalmente em imunocomprometidos. Geralmente *C.dubliniensis* é isolada de indivíduos HIV positivos com candidose bucal e da cavidade bucal de indivíduos saudáveis (Coleman et al.²¹, 1997; Rodero et al.¹²², 1998).

C.dubliniensis cresce bem a 30 e 37°C em meio rotineiramente usado para o desenvolvimento de outras espécies. Em meio de cultura convencional, é impossível distinguir *C.albicans* de *C.dubliniensis*, pois possuem características fenotípicas comuns, como a produção de tubo germinativo e clamidoconídeos (Coleman et al.²¹, 1997; Gilfillam et al.⁴⁰, 1998; Sullivam & Coleman¹⁴⁴, 1998).

Uma alternativa para o isolamento de *C.dubliniensis* é o uso do *CHROMagar*, um meio seletivo, utilizado também para identificar culturas mistas de leveduras do gênero *Candida*. Neste meio, as colônias de *C.dubliniensis* apresentam coloração verde escura, *C.albicans*, verde claro, *C.tropicalis*, azul acinzentada, *C.krusei*, rosa intenso e em outras espécies, creme (Odds & Bernaerts⁹⁶, 1994).

2.2 Patogenicidade do Gênero *Candida*

Progressos têm sido feitos na investigação de fatores de virulência das leveduras do gênero *Candida*. A variabilidade fenotípica, aderência a tecidos do hospedeiro, produção de toxinas, enzimas, produção de tubo germinativo, crescimento à 37°C e hifas/pseudo-hifas são os fatores de virulência mais estudados. Algumas espécies secretam proteinases, lipases e fosfolipases, as quais podem contribuir para proliferação e invasão, causando danos para as células do hospedeiro (Tsuboi et al.¹⁵¹, 1994).

Leveduras do gênero *Candida* foram reconhecidas em 1994 nos Estados Unidos da América (EUA) como o quarto patógeno responsável por infecção sistêmica hospitalar, apresentando taxa de mortalidade entre 55 a 70% (Branchini et al.¹⁶, 1994; Voss et al.¹⁵³, 1994). Levantamentos de candidoses invasivas em recém-nascidos de baixo peso variam entre 0,9% a 3,8% e, em pacientes leucopênicos, a

incidência desse quadro clínico é ainda maior, com, cerca de 15%, sendo a associação com mortalidade em torno de 92% (Hunter⁵¹, 1991; Schmid et al.¹³⁵, 1995). A patogenicidade do gênero depende, segundo a literatura, mais do hospedeiro que do fungo (Odds⁹³, 1988).

Os mecanismos pelos quais *C.albicans* causa doença são pouco conhecidos, entretanto vários fatores têm sido sugeridos: capacidade de aderência à mucosa e hidrofobicidade, habilidade de formar pseudo-hifas, presença de substâncias semelhantes a toxinas, secreção de enzimas histolíticas e supressão da imunidade específica (Odds⁹², 1987; Ghannoum³⁶, 1988; Curtis et al.²³, 1991).

O primeiro fator de virulência a ser estudado foi a aderência *in vitro* dos blastoconídeos de *C.albicans* às células epiteliais da mucosa vaginal (Sobel¹⁴⁰, 1985). Vários estudos têm sido realizados quanto aos mecanismos de aderência de microrganismos às várias superfícies do organismo, apresentando a adesão como um fator importante na determinação da virulência, em especial por *Candida* (Ghannoum & Radwan³⁸, 1990; Silva et al.¹³⁸, 1995; Pires et al.¹⁰⁶, 1996).

A aderência é conceituada como a capacidade que o microrganismo tem de se ligar à superfície da pele e/ou mucosa. Acredita-se que a adesão seja a primeira etapa da colonização da levedura às células epiteliais (Odds⁹⁴, 1994), podendo ocorrer subseqüentemente disseminação quando existir um desequilíbrio das defesas do hospedeiro.

A aderência de *Candida* spp. sobre superfícies da mucosa é um fator importante para desenvolvimento das candidoses, tanto localizadas como disseminadas. A aderência às células epiteliais ou mucosas bucal e vaginal tem sido muito estudada e uma correlação cuidadosa é observada entre adesão de várias espécies de *Candida* e sua habilidade de provocar infecção (Ruechel¹²⁵, 1990). *C.albicans* e *C.tropicalis* são as espécies mais virulentas e que demonstraram uma forte aderência, sendo que a *C.tropicalis* revelou alta afinidade por polímeros plásticos (Minagi et al.⁶⁸, 1985).

C.albicans tem capacidade de aderir fortemente às células do epitélio bucal, quando comparada a outras espécies, como *C.tropicalis* e *C.stellatoidea*. *C.parapsilosis*, *C.krusei* e *C.kefyr*, por sua vez, aderem menos às células epiteliais (Ghannoum & Radwan³⁸, 1990), indicando que esta propriedade não é igual para todas as espécies, interferindo no grau de virulência (Rinaldi¹²¹, 1993).

C.albicans adere às células esfoliativas bucais e vaginais em maior número do que *C.tropicalis*, que normalmente é menos patogênica (Douglas²⁸, 1987). Em coágulo de fibrina, *C.albicans* apresenta adesão, enquanto a *C.krusei*, *C.guilliermondii* e *C.glabrata* aderem menos (Samaranayake et al.¹³⁰, 1988).

A adesão do fungo nos tecidos bucais provavelmente é feita através dos componentes de sua parede celular e dos receptores nas células do hospedeiro (Ghannoum et al.³⁹, 1990; Samaranayake &

MacFarlane¹²⁸, 1990). Em *C.albicans*, manoproteínas, glucano, quitina, proteínas da parede celular, glicoproteínas e lipídeos são possíveis adesinas (Olsen¹⁰⁰, 1990). Moléculas de fibronectina, fucose, lipídeos manose, N-acetil glicosamina, mucinas, lamininas e colágeno são considerados por alguns autores (Olsen¹⁰⁰, 1990) como receptores teciduais.

Existe correlação entre germinação e aumento de aderência de *C.albicans* nas células epiteliais da boca, visto que a inibição parcial da germinação resulta em diminuição da aderência (Kimura & Pearsall⁵⁹, 1980). Cotter et al.²² (1997) demonstraram que alterações na membrana de células, nos estágios iniciais de apoptose, diminuem a aderência de *C.albicans*.

A produção de tubo germinativo por *C.albicans* propicia retenção adicional desta espécie às células epiteliais bucais, ao acrílico (Kimura & Pearsall⁵⁹, 1980; Tronchin et al.¹⁵⁰, 1988) e à pele (Ray & Payne¹¹⁹, 1988), enquanto que sua inibição pelo uso de drogas diminui a aderência (Ghannoum et al.³⁹, 1990).

A formação de tubo germinativo tem sido considerada como um critério de diagnóstico importante da espécie *C.albicans*, embora outras amostras também possam formá-lo (Samaranayake & MacFarlane¹²⁸, 1990, Wellmer & Bernhardt¹⁵⁷, 1997).

A relação entre patogenicidade e produção de hifas está baseada em dados experimentais. A formação de hifas tem sido

considerada um atributo de virulência em *C.albicans*, podendo exercer um papel importante nos processos invasivos. Parece que há maior capacidade invasiva aparente sobre as células do hospedeiro e maior resistência à fagocitose (Odds⁹³⁻⁴, 1988, 1994; Hunter et al.⁵¹, 1991).

Candida pode causar infecção, quer como levedura ou hifa, e, apesar da forma micelial ser mais encontrada nos tecidos com lesão, existem poucas evidências de que esta forma é significativamente mais patogênica que as leveduras (Ashman & Papadimitriou³, 1990).

Vários autores relataram a produção de fosfolipases (Price & Cawson¹¹³, 1977; Pugh & Cawson¹¹⁶, 1977; Barret-Bee et al.⁷, 1985; Banno et al.⁵, 1985, Kothavade & Panthaki⁶⁸, 1998; Oliveira et al.⁹⁸, 1998), e proteinases (Rüchel¹²³, 1984; Borg & Rüchell¹³⁻⁴, 1988, 1990; Neely & Holder⁸⁹, 1990, Pires et al.¹⁰⁶, 1996), por cepas de *Candida*.

Fosfolipase é uma enzima que degrada fosfolipídeos, comuns em todas as formas de vida e freqüentemente compõem-se em associações com membranas celulares (Banno et al.⁵, 1985; Kothavade & Panthaki⁶⁸, 1998), podendo tomar parte do processo de invasão de *C.albicans* nos tecidos (Price & Cawson¹¹³, 1977). Em 1975, Pugh & Cawson¹¹⁵ demonstraram a presença de lisofosfolipase A em blastóporos, hifas, membranas e parede celular de *C.albicans* através de métodos citoquímicos.

Fosfolipases extracelulares (fosfolipase A, fosfolipase C, lisofosfolipase e lisofosfolipase-transacilase) secretadas por *C.albicans*,



74495

têm sido bastante estudadas (Price & Cawson¹¹³, 1977; Pugh & Cawson¹¹⁶, 1977; Banno et al.⁵, 1985; Takahashi et al.¹⁴⁷, 1991).

Barret-Bee et al.⁷ (1985) verificaram uma correlação direta entre as amostras de *C.albicans* com alta atividade fosfolipásica, virulência em camundongos e aderência em células epiteliais bucais. Almeida¹ (1991) demonstrou a produção desta enzima em 20% das amostras de *C.guilliermondii* estudadas, no entanto, as espécies *C.krusei*, *C.parapsilosis* e *C.tropicalis* não produziram tal enzima. Maffei⁷⁷ (1996) demonstrou que cerca de 51% das amostras de *C.albicans* isoladas de gestantes produziram fosfolipase.

Há produção de fosfolipase por amostras de *C.albicans* isoladas de diferentes sítios anatômicos de indivíduos saudáveis ou com diversas patologias (Maffei⁷⁷, 1996; Pires et al.¹⁰⁶, 1996; Oliveira et al.⁹⁸, 1998).

C.albicans é capaz de produzir protease extracelular e essa enzima tem sido associada à patogenicidade da mesma (MacDonald & Odds⁷⁵, 1980; DeBernardis et al.²⁷, 1990).

Estudos realizados por vários autores têm demonstrado que a maioria das amostras de *C.albicans* são produtoras de proteinase (Rüchel¹²³, 1984; Cassone et al.¹⁹, 1987; Silva et al.¹³⁸, 1995).

Rüchel et al.¹²⁴, em 1982, verificaram a existência de três tipos de proteinases. Uma delas era uma proteinase completa, e as outras duas apresentavam atividade proteolítica parcial.

Em relação à patogenicidade, a produção de proteinase extracelular tem sido apontada como relevante na virulência de determinada cepa. Muitos microrganismos patogênicos possuem enzimas hidrolíticas que destroem, alteram ou danificam a integridade da membrana celular do hospedeiro, levando a uma disfunção ou interrupção das suas atividades, representando importante mecanismo de patogenicidade de *C.albicans*, possivelmente por facilitar sua penetração nos tecidos.

Kaminishi et al.⁵⁸ (1995) estudaram o efeito da proteinase extracelular de *C.albicans* sobre a atividade bactericida e de opsonização pelo soro humano. Os resultados mostraram que a capacidade de leucócitos polimorfonucleares humanos em destruir *Staphylococcus aureus* foi bastante reduzida quando a bactéria foi opsonizada com soro humano tratado com proteinase de *Candida*. A redução da atividade de opsonização foi atribuída pelos autores à degradação da porção Fc da IgG pela ação da proteinase de *C.albicans* e à redução da atividade bactericida do soro à degradação do complemento (proteína C₃).

Ray & Payne¹¹⁸ (1990) demonstraram a atividade de proteases isoladas de culturas de *C.albicans* em degradar hemoglobina, albumina, caseína, colágeno e queratina. Os autores encontraram correlação entre a produção de protease e patogenicidade de seis espécies de *Candida* (*C.albicans*, *C.stellatoidea*, *C.tropicalis*,

C.parapsilosis, *C.guilliermondii* e *C.krusei*) em candidose cutânea experimental em camundongos.

Almeida¹ (1991) verificou produção de proteinase em sete das oito amostras estudadas de *C.albicans* e em todas as dez amostras de *C.tropicalis*, *C.krusei* e *C.guilliermondii*.

Algumas espécies de *Candida* produzem substâncias proteicas que podem agir como fatores de virulência, denominados fatores, toxinas ou proteínas *killer* (Bendová¹⁰, 1986). Toxinas *killer* são proteínas extracelulares produzidas por certas cepas de leveduras que destroem outras leveduras sensíveis (McCullough et al.⁸³, 1996). São secretadas *in vitro* por várias amostras de *Candida* e possuem efeito antibiótico, semelhante às bacteriocinas, para outros fungos e várias bactérias (Polonelli & Morace¹⁰⁸, 1986). As leveduras são imunes à sua própria proteína *killer* (Bendová¹⁰, 1986.; Polonelli & Morace¹⁰⁸, 1986).

O fenômeno *killer* foi descoberto primeiro em cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* por Bevan & Makower¹¹ (1963), conforme citação de Woods & Bevan¹⁵⁹, 1968, e subseqüentemente encontrado em vários outros gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis*, *Trigonopsis*, *Pichia*, *Rhodotorula* (Polonelli & Morace¹⁰⁸, 1986; Magaró et al.⁷⁸, 1989; Polonelli et al.¹¹¹, 1990).

As leveduras podem ser agrupadas em *killer*, que produzem uma toxina letal, mas são resistentes a esta toxina; em neutras,

que não produzem a toxina letal e são resistentes ao fator *killer* e em sensíveis, que são as que morrem em presença desta toxina ou fator *killer* (Farris et al.³⁰, 1991).

Polonelli & Morace¹⁰⁹(1987) preconizaram um método de biotipagem das leveduras, verificando a produção do fator *killer*, o qual denominaram de sistema *killer*, que é verificado por três dígitos cujos resultados são representados pela sensibilidade das amostras, frente a nove cepas padrão *killer* pertencentes aos gêneros *Pichia* e *Hansenula*.

Magaró et al.⁷⁸ (1989) biotiparam cinquenta cepas de *C.albicans* utilizando as cepas padrão *killer* de Polonelli et al.¹¹⁰ (1983) e outras pertencentes aos gêneros *Candida* e *Hansenula*. O mesmo biotipo (111) foi encontrado em 90% das cepas.

Kagan⁵⁷ (1983) estudou o mecanismo de ação destas toxinas, em leveduras sensíveis, demonstrando sua ação tóxica em nível de membrana citoplasmática, acarretando um aumento da permeabilidade, com perda de íons de potássio, inibição do transporte ativo de aminoácidos e acidificação do interior celular, culminando com a morte da célula. Polonelli et al.¹¹²(1992) sugeriram que o efeito *killer* demonstrado por leveduras é medido pela presença de receptores celulares específicos da parede celular e pela ausência de um sistema de imunidade específica do hospedeiro.

Pires et al.¹⁰⁶ (1996) estudaram amostras de *C.albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com positividade para HIV.

Encontraram 70% das amostras pertencentes ao sorotipo A, 92% produtoras de proteinase, 88% produtoras de fosfolipase e 64,5% correspondente ao biotipo 211.

Maffei⁷⁷ (1996) concluiu que a tipagem de *C.albicans* pela sensibilidade às toxinas *killer* isoladas de gestantes em seguimento pré-natal revelou três tipos com predominância do biotipo 211 em todos os sítios anatômicos (52,1% em média).

Oliveira et al.⁹⁸ (1998) estudaram amostras isoladas de *C. albicans* da mucosa bucal de indivíduos com câncer quanto a sensibilidade às toxinas *killer* e provou que essas amostras expressam na sua maioria apenas um biotipo. Entre os isolados de *C.albicans*, 95,8% mostraram-se com biotipo 811.

2.3 Gênero *Staphylococcus*

Descrito em 1882, Sir Willian Ogston introduziu o nome *Staphylococcus* para descrever cocos que formavam cachos, quando isolados em abscessos piogênicos. Em 1884, Rosembach usou a produção de pigmentos para classificar *Staphylococcus* em *S.aureus* virulentos e produtores de pigmentos dourados e os não virulentos, *S.albus* (brancos) (Rupp & Archer¹²⁶, 1994)

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*, juntamente com *Micrococcus*, *Stomatococcus* e

Planococcus. O gênero *Staphylococcus* é composto de 33 espécies que estão amplamente distribuídas na natureza, muitas fazendo parte da microbiota normal de mamíferos e aves. *S.aureus* são cocos Gram-positivos de tamanho variável entre 0,5 e 1,5µm de diâmetro, imóveis, não esporulados, catalase positiva e geralmente encapsulados. Suas colônias em meio sólido (ágar sangue) apresentam diâmetro de 2 a 3mm após 24 horas de incubação a 35°C ou acima de 7mm após 48 a 72 horas de incubação. São geralmente opacas, convexas, de consistência e coloração branca ou amarelada. Podem aparecer isoladas aos pares, na forma de tétrades, cadeias curtas (três ou quatro células) ou na forma de cachos regulares. São anaeróbios facultativos, com metabolismo oxidativo, fermentativo e utilizam carboidrato e aminoácidos como fontes de energia e carbono. Possuem a parede celular sensível à ação da lisostafina, (é uma endopeptidase que cinde as ligações cruzadas dos pentapeptídeos ricos em glicina do glicopeptídeo da parede celular dos estafilococos). Essa atividade torna as células sensíveis à lise osmótica, porém, resistente a lisozima. Seu conteúdo de guanina citosina (G+C) no DNA varia de 32-36 mol%. Produzem as enzimas coagulase e DNase e são capazes de crescer em altas concentrações de cloreto de sódio (NaCl 10%) (Kloos & Bannerman⁶⁰, 1995; Konneman et al.⁶⁶, 1997).

A principal característica do gênero *Staphylococcus* é a produção da enzima coagulase. Com base nesta característica, as espécies são classificadas em coagulase positiva e negativa. As espécies

coagulase positivas são: *S.aureus*, *S.intermedius*, *S.hyicus* e *S.schleiferi* subespécie *coagulans*. Algumas espécies são freqüentemente encontradas como agente etiológico de uma variedade de infecções humanas e de animais, principalmente, domésticos. *S.aureus* é o mais importante patógeno do gênero, relacionado com infecções humanas (Kloos & Bannerman⁶⁰, 1995; Koneman et al.⁶⁶, 1997).

S.aureus é um patógeno comum em várias doenças infecciosas tais como: impetigo, pneumonia e sepsis. Na cavidade bucal, causa osteomielite e abscessos alveolares (Rams et al.¹¹⁷, 1990; Suzuki et al.¹⁴⁶, 1997).

A parede celular de *S.aureus* é composta de peptidoglicano (mais de 60% do peso seco) que é responsável pela resistência de rigidez da parede. Apresenta também ácido teicóico, que participa do processo de aderência das bactérias à superfície das mucosas (Kloos & Bannerman⁶⁰, 1995; Konneman et al.⁶⁶, 1997)

As infecções hospitalares, que apresentam uma das mais freqüentes e graves complicações, podem acometer os doentes hospitalizados. Constituem-se em uma das principais causas de mortalidade, aumento no tempo de hospitalização e elevação nos custos de tratamento (Gross et al.⁴³, 1980; Green et al.⁴², 1982; Schaffener¹³⁴, 1987). Nos Estados Unidos da América, entre 2,2% e 4,1% dos pacientes internados adquirem pelo menos uma infecção durante a hospitalização (Haley et al.⁴⁴, 1981).

S.aureus é um dos mais comuns agentes causadores de infecções graves e generalizados, principalmente em ambiente hospitalar. Estas infecções podem ser algumas vezes de difícil diagnóstico e em muitos casos apresentam altos índices de mortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos ou com severas doenças de base, como neoplasias, diabetes melito, tuberculose, pacientes em diálise, transplantados, pacientes submetidos a processos invasivos (cirúrgicos, cateteres sondas, etc) e outros (Bendhack et al.⁹, 1986). É também o agente etiológico mais freqüentemente isolado das infecções de pele, as quais incluem celulite, pústulas, furúnculo, carbúnculo, impetigo, infecções em feridas cirúrgicas e em queimados. Pode causar intoxicações alimentares, bacteriemia, endocardite, meningite, pneumonia, osteomielite e síndrome do choque tóxico (Kloos & Jorgensen⁶¹, 1985; Kloos & Bannerman⁶⁰, 1995).

Incluindo-se todas as espécies de *Staphylococcus*, estas são responsáveis por mais de 49% das infecções hospitalares (Horan et al.⁵⁰, 1988), sendo que este número tem aumentado nos últimos anos (Stamm et al.¹⁴², 1993). Atualmente *S.aureus* é o mais freqüente e mais importante agente isolado de infecções hospitalares e continua a ser a principal causa de infecções adquiridas na comunidade (Walsh et al.¹⁵⁵, 1993; Tenover et al.¹⁴⁹, 1994). O conhecimento da epidemiologia destas infecções é fundamental para que se possam instituir medidas adequadas

de controle (Stamm et al.¹⁴², 1993; Tenover et al.¹⁴⁹, 1994; Bannerman et al.⁴, 1995; Hartstein & Mulligan⁴⁶, 1996).

Nos hospitais, *S.aureus* é causa comum de infecções endoteliais (Tally¹⁴⁸, 1993). As bacteriemias são conseqüentes das infecções estafilocócicas localizadas, em que um grande número de bactérias atinge a corrente circulatória e, conseqüentemente, resultam em focos metastáticos em quase todos os órgãos do hospedeiro (Medoff⁸⁶, 1993; Tally¹⁴⁸, 1993).

Este microrganismo é ainda a principal causa de osteomielite (Medoff⁸⁶, 1993), acometendo principalmente pacientes pós-trauma ou cirurgia ortopédica, assim como pacientes diabéticos e portadores de outras doenças.

Bloom & Brown¹² (1964) estudaram a influência de aparelhos ortodônticos na cavidade bucal de 12 jovens, submetendo à cultura amostras de saliva estimulada por meio de mastigação de parafina. Realizaram a contagem antes e depois do tratamento ortodôntico e estimaram quantitativamente os diferentes grupos de microrganismos presentes. Em relação aos *Staphylococcus*, verificaram que, antes do tratamento, o número médio desses microrganismos era de 12.660 colônias por mililitro de saliva e após o tratamento, de 15660 colônias por mililitro de saliva.

Ikeda et al.⁵² (1964) cultivaram amostras de saliva coletadas de 58 pessoas sadias, cujas idades variavam de sete a 61

anos. Isolaram 49 cepas das quais 11 (19%) eram *S.aureus* (coagulase-positiva).

Knigthon⁶⁴ (1965) estudou a ocorrência de estafilococos coagulase-positivos nas áreas bucal e nasal de acadêmicos de Odontologia. Foram pesquisados 1375 indivíduos, sendo que estafilococos coagulase-positivo foi encontrado 653 (47,5%) da saliva e 573 (41,7%) de fossas nasais. Segundo o autor, a íntima relação numérica dos resultados sugere que, como reservatório de estafilococos patogênicos, a cavidade bucal é, possivelmente, tão importante quanto as fossas nasais.

Çetin et al.²⁰ (1971) pesquisaram a ocorrência de microrganismos patogênicos da cavidade bucal e nasal de 1663 acadêmicos de medicina, farmácia, ciências e odontologia. Dentre os portadores, duzentos (18%) eram acadêmicos de medicina, setenta (26%) da farmácia, 34 (27%) de odontologia e 36 (23%) de ciências.

Socransky & Manganiello¹⁴¹ (1971) verificaram a ocorrência de estafilococos em diferentes nichos da cavidade bucal de indivíduos adulto e observaram que a média dos estafilococos na saliva era de 4%; na língua, de 6,5% e na placa dental, de 0,3% e, no sulco gengival, de 1,7%.

Piochi & Zelante¹⁰⁵ (1973) verificaram a ocorrência do grupo estafilococos e micrococcos em sessenta amostras de saliva não estimulada, obtidas de quatro grupos de indivíduos distintos em idade,

instrução, condições sócio-econômicas e higiene bucal. Encontraram o *S.aureus* em 35% das amostras de saliva, o que permitiu que os autores sugerissem que a cavidade bucal seja tão importante quanto a nasofaringe como reservatório de estafilococos patogênicos.

S.aureus pode causar infecções nosocomiais e oportunistas, sugerindo que eles podem, quando presentes em um hospedeiro comprometido, ser risco potencial para infecções bucais (Öhman et al.⁹⁷, 1995). Segundo estes autores, a colonização tem sido demonstrada em culturas de gengiva, língua, saliva, superfície da mucosa e próteses. *S. aureus* tem sido também associada com infecções agudas dentoalveolares, lesão da mucosa bucal e estomatite induzida pelo uso de prótese.

O nicho ecológico de *S.aureus* no organismo humano são as narinas anteriores. Inúmeros estudos têm mostrado que as narinas são as mais importantes e freqüentes áreas onde estes microrganismos podem ser encontrados. Esta teoria é confirmada quando os portadores nasais são tratados e o microrganismo desaparece também, na maioria dos casos, de outras áreas do corpo (Bechara⁸, 1971; Fantinato & Zelante²⁹, 1977; Reagan et al.¹²⁰, 1991; Parras et al.¹⁰¹, 1995).

Os portadores de *S.aureus* podem ser divididos em três grupos (Willians¹⁵⁸, 1963):

- a) portadores persistentes: são aqueles indivíduos que quase sempre estão colonizados por um tipo de cepa; correspondem aproximadamente a 20% do total;
- b) portadores temporários: correspondem aos indivíduos que são colonizados por um determinado período de tempo, porém, algumas vezes perdem seu estado de portador. Nestes indivíduos ocorrem trocas de cepas com variada frequência; correspondem aproximadamente a 60% da população;
- c) não portadores: são indivíduos que quase nunca são colonizados por *S.aureus*. Os não portadores correspondem a uma minoria da população, aproximadamente 20%.

É mais comum crianças serem portadores persistentes do que adultos, sendo que muitos indivíduos trocam o tipo de portador entre a idade de dez a vinte anos. A causa destas diferenças no modelo de colonização não está bem esclarecida. Os portadores persistentes de uma determinada cepa de *S.aureus* possuem um efeito protetor para aquisição de outras cepas diferentes, pelo menos durante a hospitalização (Willians¹⁵⁸, 1963).

A incidência e a prevalência de portadores nasais de *S.aureus* pode variar de acordo com a população estudada. Em geral, cerca de 37% dos indivíduos são portadores nasais destes

microrganismos (Boyce¹⁵, 1996; Kluytmans et al.⁶², 1997). Segundo estes autores, estes valores são mais altos para indivíduos que apresentam alguma doença de base ou para pessoas idosas. Os indivíduos que são portadores nasais de *S.aureus* desempenham uma importante função no desenvolvimento de infecções estafilocócicas. O estado de portador é o principal fator de risco para o desenvolvimento de infecções em certos grupos de indivíduos, como pacientes de hemodiálise, diabéticos, pacientes com diálise peritoneal constante, pacientes cirúrgicos, pacientes com cateteres intravasculares e indivíduos com o vírus HIV.

Outros sítios do organismo podem ser colonizados com *S.aureus*, como as axilas, trato respiratório superior, alguns sítios da pele (incluindo feridas cirúrgicas, queimaduras, locais de traqueostomia, locais de contato constante com objetos estranhos), períneo e reto (Walsh et al.¹⁵⁴, 1987).

Entre outras bactérias, Rams et al.¹¹⁷, (1990) isolaram estafilococos da microbiota subgengival de 50,4% dos pacientes com periodontite crônica. Do total de estafilococos isolados, *S.epidermides* resultou em 45,8% e *S.aureus* em 22,3%.

Iwase et al.⁵³ (1990) relataram que a produção de toxina por *S.aureus* no sítio subgengival exibe atividade citotóxica para os neutrófilos, podendo agir como co-fator no desenvolvimento da doença periodontal.

Slots et al.¹³⁹ (1990) demonstraram que 28% dos 3075 pacientes que participaram do estudo apresentaram estafilococos subgengivais.

Segundo Hartstein et al.⁴⁵ (1992), a habilidade em se distinguir uma doença recorrente de uma nova infecção tem aplicação importante na avaliação do paciente. Os autores também afirmam que *S.aureus* pode continuar colonizando um paciente após a infecção ter sido resolvida e, segundo eles, é comum acontecer bacteriemia por *S.aureus*.

Dahlén²⁶, em 1993, afirmou que a presença de patógenos potenciais, como enterobactérias, *S.aureus* e *Candida*, deve ser considerada, especialmente em pacientes com desordens sistêmicas, como *diabetes mellitus*, neutropenia, agranulocitose ou Aids.

Segundo Scannapieco & Mylotte,¹³³ 1996, a higiene bucal pobre e a doença periodontal podem facilitar a colonização por patógenos potenciais, incluindo espécies da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, os quais podem causar superinfecção (um termo que também é aplicado ao crescimento de patógeno-alvo que desenvolvem resistência ao antibiótico). Nesta situação, uma linhagem resistente ao antibiótico substitui a linhagem original sensível, e a infecção prossegue.

Os estafilococos coagulase-negativos eram considerados contaminantes de pouca importância clínica. Entretanto, durante as duas

últimas décadas, esses microrganismos foram reconhecidos como agentes de doenças humanas. Com o passar do tempo, estão sendo reconhecidas mais espécies que causam infecções em humanos (Koneman et al.⁶⁶, 1997). Os tipos de infecções associadas aos estafilococos coagulase-negativos incluem: infecções urinárias, nosocomiais, infecções associadas a dispositivos, bacteriemia em hospedeiros comprometidos, endocardite de válvulas cardíacas, osteomielite e endoftalmia pós-cirúrgica (Rupp & Archer¹²⁶, 1994). Entre os estafilococos coagulase-negativos, os mais importantes são *S.epidermidis* e *S.saprophyticus*.

S.epidermidis é, consideravelmente, o microrganismo recuperado com maior frequência, representando de 50% a mais de 80% dos isolados. As infecções produzidas por *S.epidermidis* incluem endocardite de válvulas cardíacas naturais e protéticas, bacteriemia, osteomielite e infecções das vias urinárias (Koneman et al.⁶⁶, 1997).

A espécie coagulase-negativa *S.saprophyticus* merece menção especial por ser um patógeno causador de infecções urinárias agudas, sobretudo em mulheres jovens saudáveis e sexualmente ativas (Rupp & Archer¹²⁶, 1994). Nessa população, *S.saprophyticus* é a segunda causa mais frequente de cistite, sendo precedida por *Escherichia coli*. Pacientes com essa infecção em geral apresentam disúria, piúria e hematúria (Fihn et al.³¹, 1998).

Os estudos *in vitro*, relacionados à aderência dessas espécies a diversos tipos celulares, demonstraram que *S.saprophyticus* aderem às células uroepiteliais, uretrais e periuretrais em maior número do que outros estafilococos e que não aderem a outros tipos celulares, incluindo as células da pele e da mucosa bucal (Koneman et al.⁶⁶, 1997).

S.schleiferi foi descrito pela primeira vez em 1988, foi isolado a partir de várias infecções humanas, entre elas empiema cerebral, infecções de feridas no pós-operatório, bacteriemia como complicação de osteíte vertebral, infecção de prótese de quadril e infecção de cateteres permanentes (Grattard⁴¹, 1993, Kluytmans et al.⁶³, 1998). A espécie foi subdividida em duas subespécies; os isolados humanos são denominados *S.schleiferi* subespécie *schleiferi* e os isolados caninos são designados *S.schleiferi* subespécie *coagulans*.

A subespécie *coagulans* causa infecções em cães e em seres humanos. Essa subespécie é negativa para o fator de aglutinação e coagulase-positiva em tubo (as cepas de *S.schleiferi* subespécie *schleiferi* mostram reações opostas nessas provas). Tanto *S.schleiferi* subespécie *schleiferi* quanto a subespécie *coagulans* podem ser diferenciadas de *S.aureus* pela ausência de produção de ácido a partir de maltose e trealose (Koneman et al.⁶⁶, 1997).

S.hyicus, encontrado em suínos, bovinos e no leite de vaca, está associado a epidermite exsudativa, uma doença aguda de

suínos lactentes e desmamados (Lämmle⁷²,1991, Koneman et al.⁶⁶,1997).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho constituiu-se:

- a) verificar a presença e identificar as principais espécies de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal humana;
- b) verificar a presença e identificar as principais espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivas na cavidade bucal humana;
- c) correlacionar a presença de *Candida* e *Staphylococcus* na cavidade bucal humana.

4 MATERIAL E MÉTODO

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP - SP (Anexo A).

4.1 Coleta do material

Participaram do presente estudo setenta indivíduos, com idades de 25 a 75 anos, atendidos na clínica da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, que foram informados sobre a finalidade da pesquisa, bem como, sobre os métodos de coleta das amostras (Anexo B). Na concordância por parte do paciente, este assinou o termo de autorização (Anexo C). Após consentimento, foi realizada anamnese e preenchimento da ficha clínica com os dados necessários ao estudo (Anexo D).

As amostras foram coletadas através de enxágüe bucal. Foram fornecidos 10mL de solução fisiológica tamponada (PBS) (0,1M pH 7,2) em um recipiente universal estéril descartável para cada indivíduo enxaguar a boca por 60 segundos. A seguir, o enxágüe bucal foi devolvido ao recipiente, mantido em gelo até ser levado ao laboratório de

Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, tendo-se respeitado um período máximo de 3 horas entre coleta e processamento. Cada amostra foi centrifugada a 3000 Xg por 10 minutos e o sobrenadante descartado. A seguir o depósito foi ressuspensionado em 2,5mL de PBS e agitado (Vortex) por 30 segundos, produzindo assim a suspensão final. Imediatamente, 0,1mL de cada suspensão foi semeado em placas contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco) com cloranfenicol (0,1mg de Quemicetina Succinato Carlo Erba, por mL de meio) e ágar Baird Parker em duplicata, e foram incubados a 37°C por 48 horas. As amostras também foram semeadas em *CHROMagar*. Após crescimento das colônias características, foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFC) e feitos esfregaços os quais foram corados pelo método de Gram para confirmação microscópica. Para colônias com morfologia idêntica de leveduras, foram isoladas cinco amostras para ágar Sabouraud inclinado e, para cocos Gram-positivos cinco amostras em ágar TSA (Tryptic Soy ágar) inclinado. A seguir, as cepas isoladas foram identificadas.

4.2 Identificação dos isolados

As cepas de *Candida* isoladas foram identificadas, de acordo com Samaranayake & MacFarlane¹²⁸ (1990) e Sandvén¹³² (1990), realizando-se as seguintes provas:

4.2.1 Produção de clamidoconídeos

Foi utilizado o meio *Corn Meal* Ágar (Difco) adicionado de 1% de *Tween* 80. Para a execução da prova, o ágar previamente fundido foi distribuído em lâminas de vidro colocada no interior de placas de Petri esterilizadas. Após a solidificação do ágar, cada cepa de levedura testada foi semeada em estria única na superfície do meio e colocada uma lamínula no centro da lâmina. Após incubação, por 48 a 72 horas, a temperatura ambiente, a leitura foi feita em microscópio óptico (aumento de quatrocentas vezes), observando-se presença de clamidoconídeos, leveduras e hifas/pseudohifas.

4.2.2 Produção de tubo germinativo

Foi adicionada uma alçada de cultura pura de 24 horas da levedura em tubo de ensaio (13x17mm) contendo 0,5mL de soro estéril de coelho. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C e a formação de tubo germinativo foi observada em microscópio (aumento de quatrocentas vezes), colocando-se uma gota da suspensão entre lâmina e lamínula, considerando-se incubação mínima de 2 e máxima de 3 horas.

4.2.3 Fermentação de carboidratos

Foi usado caldo vermelho de fenol (Difco) distribuído em tubos de ensaio, com tubos de Duhran invertidos em seu interior e autoclavados a 121°C/15 minutos. Cada açúcar (glicose, maltose, sacarose e lactose), esterilizado por filtração (filtro Millipore, GSWP-02500), foi adicionado de forma a obter concentração de 1%. Os tubos foram semeados a partir de cultura pura de 24 horas da levedura em ágar Sabouraud dextrose e a leitura foi realizada após 48 horas e confirmada após uma semana, considerando-se a produção de ácido pela viragem de pH do meio (mudança da cor vermelha para amarela) e a produção de gás no interior dos tubos de Duhran.

4.2.4 Assimilação de carboidratos

Utilizou-se o meio quimicamente definido (Anexo E). Para cada cepa a ser testada, foi feita uma suspensão de levedura com turvação ao tubo dez da escala MacFarlane, a qual foi semeada em profundidade. A seguir foi colocado um disco de papel de filtro embebido em uma solução a 10% dos seguintes açúcares; glicose, galactose, lactose, maltose e sacarose na superfície do meio. Após incubação de 48 horas a 37°C, a leitura foi feita pela observação da formação de halo de crescimento da amostra ao redor do açúcar assimilado.

4.2.5 Interpretação

As amostras foram caracterizadas em espécies de acordo com as características de produção de tubo germinativo em soro estéril de coelho, produção de pseudo-hifas e clamidoconídeos, em *Corn meal* ágar + Tween 80, fermentação e assimilação de carboidratos, baseando-se em Samaranayake & MacFarlane¹²⁸, 1990 e Sandvén¹³², 1990 (Quadro 1).

Quadro 1 - Características culturais, assimilação e fermentação de carboidratos pelas amostras de *Candida* isoladas da cavidade bucal de indivíduos de 25 a 75 anos através do enxágüe bucal. ¹²⁸⁻¹³²

ESPÉCIES DE CANDIDA	FERMENTAÇÃO					ASSIMILAÇÃO					TUBO	CLAM.	HIFA VERD.
	GLIC	SAC	MALT	LACT	GAL.	GLIC	SAC	MALT	LACT	GAL.			
<i>C. albicans</i>	AG	A/-	AG	-/-	A/G	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>C. stellatoideia</i> *	AG	A/-	AG	-/-	A/G	+	-	+	-	+	V	V	+
<i>C. guilliermondii</i>	AG	AG	-/-	-/-	A/G	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>C. glabrata</i>	AG	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	AG	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. lipolytica</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. lusitaniae</i>	AG	AG	-/-	-/-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>C. parapsilosis</i>	AG	-/-	-/-	-/-	V	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>C. tropicalis</i>	AG	AG	AG	-/-	V	+	+	+	-	+	-	V	+
<i>C. kefyr</i> (<i>C. pseudotropicalis</i>)	AG	AG	-/-	AG	A/G	+	+	-	+	+	-	-	+

* Atualmente considerada como uma variante de *C. albicans*

A = produção ácido

G = produção de gás

+

- = prova negativa

V = variável

4.3 Verificação do fator *killer*

As cepas de *Candida* que foram testadas e as cepas produtoras de toxinas *killer* foram repicadas com 24 horas de antecedência em ágar Sabouraud dextrose modificado, para, a seguir, ser realizada a biotipagem de sensibilidade às toxinas *killer*. A metodologia seguida foi a de Polonelli et al.¹¹⁰ (1983) (Anexo E). Utilizou-se como padrão, a linhagem de *C.albicans* F72, proveniente do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP. Cada cepa de *Candida* a ser observada foi semeada em *pour-plate* e a seguir as leveduras produtoras de toxinas *killer* foram inoculadas por picada na superfície do meio. As placas foram incubadas 72 horas a temperatura ambiente. As cepas foram testadas frente às cepas produtoras de toxinas *killer* (Quadro 2). Para leitura do teste, foram considerados sensíveis (+) os cultivos que produziram halo incolor ao redor das cepas padrão, e resistentes (-) os cultivos que apresentaram crescimento em torno das mesmas. Após a leitura do teste para verificação do fator *killer*, os resultados da biotipagem foram designados através do esquema proposto por Pollonelli et al.¹¹⁰ (1983), composto por três dígitos, cada um representando uma combinação dos resultados obtidos no *triplet* de três cepas (Quadro 3).

Quadro 2 – Cepas padrão com sua procedência, utilizadas para verificação do fator *Killer*

Cepas Padrão	Coleção original	Polonelli
<i>Hansenula sp</i>	Stumn 1034	K ₁
<i>Pichia sp</i>	Stumn 1034	K ₂
<i>Hansenula anomala</i>	Um milano 3	K ₃
<i>Hansenula anômala</i>	CBS 5759	K ₄
<i>Hansenula anômala</i>	Ahearn UM 866	K ₅
<i>Hansenula californica</i>	Ahearn WC 40	K ₆
<i>Hansenula canadensis</i>	Ahearn WC 41	K ₇
<i>Hansenula dimennae</i>	Ahearn WC 44	K ₈
<i>Hansenula mrakii</i>	Ahearn WC 51	K ₉

Quadro 3 – Modelos de biótipo killer segundo Polonelli et al¹¹⁰, 1983. O código é atribuído, considerando-se 3 dígitos.

Atividade do 1º "triplet"				Atividade do 2º "triplet"				Atividade do 3º "triplet"			
Leveduras				Leveduras				Leveduras			
K ₁	K ₂	K ₃	código	K ₄	K ₅	K ₆	código	K ₇	K ₈	K ₉	Código
+	+	+	1	+	+	+	1	+	+	+	1
+	+	-	2	+	+	-	2	+	+	-	2
+	-	+	3	+	-	+	3	+	-	+	3*
-	+	+	4*	-	+	+	4*	-	+	+	4
+	-	-	5	+	-	-	5	+	-	-	5
-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-	6
-	-	+	7	-	-	+	7	-	-	+	7
-	-	-	8	-	-	-	8	-	-	-	8

* Amostra corresponde ao código 443

4.4 Produção de Fosfolipase

A produção desta enzima foi verificada, segundo Price et al.¹¹⁴ (1982), utilizando-se meio ágar fosfolipase (Anexo E). As cepas de *Candida* foram repicadas em pontos eqüidistantes no meio ágar-fosfolipase e as placas contendo cinco inóculos de diferentes cultivos permaneceram incubadas a 37°C, durante quatro dias. A presença da enzima foi observada pela formação de um halo de cor amarelada ao redor da colônia. O halo formado ocorre quando da ação da fosfolipase sobre os fosfolipídios contidos na gema de ovo, liberando ácidos graxos que se ligam ao cálcio presente no meio e precipitam. A atividade enzimática foi medida de acordo com Price et al.¹¹⁴ (1982), através do valor PZ, que é obtido dividindo-se o diâmetro da colônia (dc) pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), ou seja, $PZ=dc/dcp$ (Quadro 4).

4.5 Produção de Proteinase

Para verificação desta enzima, foi utilizada técnica descrita por Rüchel et al.¹²⁴, 1982 (Anexo E). As cepas de *Candida* foram repicadas em pontos eqüidistantes no meio de ágar-proteinase, em duplicata. As placas contendo cinco inóculos de diferentes cultivos foram incubadas a 37°C durante quatro dias e a presença da enzima foi

observada pela formação de halo ao redor da colônia de levedura. A atividade enzimática foi calculada segundo Price et al.¹¹⁴ (1982), utilizando-se valor o de PZ (Quadro 4).

Quadro 4 – Atividade enzimática conforme o Pz e o código, segundo Price et al.¹¹⁴, 1982.

Pz	Atividade enzimática	Código
= 1,00	Negativa	1
$\geq 0,64 < 1,00$	Positiva	2
< 0,64	Fortemente positiva	3

4.6 Identificação de *Staphylococcus* spp

As culturas puras de estafilococos foram identificadas bioquimicamente, realizando-se as provas descritas a seguir (baseando-se Forbes et al.³², 1998, com modificações) (Quadro 5). As cepas de estafilococos coagulase-positivas foram identificadas em espécies e as coagulase-negativas foram consideradas como um grupo. Para o controle positivo de todas as provas, foi utilizada a linhagem *S.aureus* ATCC 6538. Para a prova de beta-galactosidase, o controle positivo foi a linhagem de *Escherichia coli* ATCC 8739.

Quadro 5 – Características culturais de *Staphylococcus coagulase* positiva.

Espécies	Catalase	Coagulase	V.P	D. trealose	ONPG
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	-
<i>S. intermedius</i>	+	+	-	+	+
<i>S. hycus</i>	+	+	-	+	-
<i>S. schleiferi</i> *	+	+	+	-	Indeter.

*sub-espécie coagulans**

V.P = Voges Proskauer

ONPG = orto-nitrofenilgalactosídeo

4.6.1 Produção de catalase

Foi adicionado 1mL de água oxigenada (20 volumes) em uma cultura pura do microrganismo em caldo TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) incubando 24 horas a 37°C. Quando ocorreu, após leve agitação, o desprendimento de pequenas bolhas, o teste foi considerado positivo.

4.6.2 Produção de coagulase

Foi verificada a produção de coagulase após a adição de 0,5mL de cultura 24 horas em caldo TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) à 0,5 mL de plasma de coelho diluído, contendo 5 UI de heparina por mL, diluído 1:5. Leituras periódicas foram realizadas no período de incubação de 4 a 24 horas a 37°C. A formação de coágulo foi considerada prova positiva. Os estafilococos coagulase negativos foram considerados como um grupo.

4.6.3 Voges Proskauer (VP)

Uma colônia da cepa a ser testada, cultivada em ágar TSA (Tryptic Soy Ágar, Difco), foi semeada em meio para VP (Anexo E) incubada a 37°C/24horas. Após incubação, foram adicionados à cultura 0,2mL de solução de KOH (40%) e 0,6mL de solução alcoólica de alfa-naftol (5%) à cultura. A prova foi considerada positiva quando da presença de anel de coloração vermelha no tubo.

4.6.4 Fermentação de D-trealose

Tubos em coluna alta, contendo meio para fermentação de D-trealose (Anexo E), foram semeados com uma colônia da cepa a ser testada, cultivada em ágar TSA (Tryptic Soy Ágar, Difco) a 37°C/24 horas, em profundidade, com agulha de platina e foram incubados a 37°C. A prova foi considerada positiva pela viragem de pH e as leituras realizadas após 24 horas e uma semana.

4.6.5 Produção de Beta-galactosidase

Foi preparada suspensão da cepa a ser testada, a partir do crescimento em TSI (Triptic Sugar Iron, Difco), a 37°C/24horas, até o tubo número 6 da escala MacFarlane. A seguir, colocou-se uma gota de

tolueno, agitou-se delicadamente e colocou-se um disco de beta-galactosidase (ONPG). A prova foi considerada positiva quando do aparecimento de coloração amarela após 10 minutos de incubação a 37°C em banho maria e confirmada após 24 horas.

4.7 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente, realizando-se análise de variância (ANOVA). Considerou-se diferença estatística quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas de 50 (71,42%) dos 70 indivíduos examinados. *C.albicans* foi a espécie mais freqüente (62%) nos isolamentos, seguindo-se *C.tropicalis* (22%), *C.glabrata* (4%) e *C.kefyr* (2,%), conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Média de UFC/ml e distribuição de frequência das espécies de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de indivíduos de 25 a 75 anos através de enxágüe bucal.

Espécie	n	%	Média UFC/ml
<i>C. albicans</i>	31	62	151,19
<i>C. tropicalis</i>	11	22	68,91
<i>C. glabrata</i>	02	4	153,00
<i>C. kefyr</i>	01	2	59,00
<i>Candida spp</i>	05	10	220,17
Total de espécies	50	100	

Microrganismos do gênero *Staphylococcus* foram isolados em 65 (92,85%) indivíduos. Destes isolamentos, 41 cepas (63%) eram coagulase-negativos. Das 24 cepas positivas, nove eram *S.aureus*, 11 *S.hyicus*, e quatro, *S.schleiferi* subespécie *coagulans* (Tabela 2).

Tabela 2 – Média e distribuição de frequência das espécies do gênero *Staphylococcus* isoladas da cavidade bucal de indivíduos de 25 a 75 anos através de enxágüe bucal.

Espécie	n	%	Média UFC/ml
<i>S. aureus</i>	09	13,9	149,56
<i>S. hyicus</i>	11	17,0	64,19
<i>Staphylococcus</i> *	41	63,0	184,92
<i>S. schleiferi</i> **	04	6,1	139,75
Total	65	100	

* coagulase-negativo

** subespécie *coagulans*

Não houve correlação linear ($R^2 = 0,8\%$) entre a quantidade de unidades formadoras de colônia de *Candida* e *Staphylococcus*, o que pode ser observado na Figura 1.

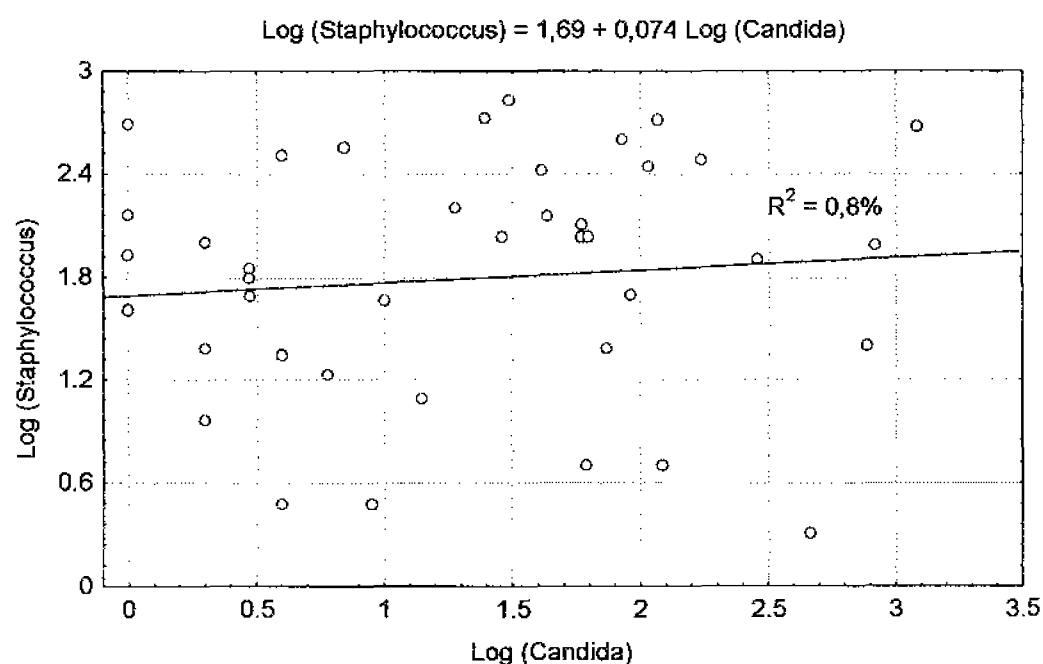


FIGURA 1 – Diagrama de dispersão, reta de regressão e coeficiente de correlação entre o logaritmo dos valores de unidades formadoras de colônia de *Staphylococcus* e de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal, correspondente a seres humanos através de enxágüe bucal.

A tipagem *killer* realizada com as cepas de leveduras isoladas demonstrou maior frequência do biotipo 111, com 29 (58%) cepas, seguindo-se o biotipo 114, com 11 (22%) cepas (Tabela 3).

Vinte e sete (87,09%) das 31 cepas de *C. albicans* produziram fosfolipase e 30 (96,77%), proteinase; destas, ocorreu predominância de cepas fortemente positivas (54,83% para fosfolipase e 67,74% para proteinase). Vinte (64,51%) das cepas de *C. albicans* foram fortemente positivas para as duas enzimas. Para as espécies *C. tropicalis* e *C. glabrata*, não foi possível observar diferenças entre o número de cepas negativas e positivas. As cepas de *C. kefyr* e *Candida* spp. não produziram fosfolipase e proteinase.

Tabela 3 – Distribuição de frequência Biotipos *killer* e grau de atividade enzimática entre proteinase e fosfolipase de amostras isoladas de seres humanos através de enxágüe bucal.

Espécie	Biotipo killer	n	Fosfolipase - GAE			Proteinase – GAE		
			1	2	3	1	2	3
<i>C.albicans</i>	111	19	0	9	10	0	6	13
	114	03	2	0	1	0	1	2
	116	01	0	0	1	0	1	0
	411	03	1	0	2	0	0	3
	443	01	0	0	1	0	0	1
	888	04	1	1	2	1	1	2
Total		31	3	10	17	1	9	21
<i>C.tropicalis</i>	111	06	2	2	2	1	3	2
	114	03	1	1	1	1	1	1
	888	02	1	0	1	1	0	1
Total		11	4	3	4	3	4	4
<i>C.glabrata</i>	111	02	0	1	1	0	2	0
	114	01	0	0	1	1	0	0
Total		03	0	1	2	1	2	0
<i>C. kefyr</i>	111	01	1	0	0	1	0	0
<i>Candida spp</i>	111	01	4	0	0	0	1	0
	114	04	1	0	0	4	0	0
Total		05	5	0	0	4	1	0
Total de espécies		50						

GAE – Grau de atividade enzimática: 1) negativo, 2) positivo, 3) fortemente positivo

As Tabelas 4 a 7 apresentam as correlações entre as unidades formadoras de colônia de *Candida* e *Staphylococcus*, considerando-se os dois gêneros e as espécies mais encontradas. Dos setenta indivíduos examinados, 41 apresentam os dois gêneros na cavidade bucal. Cinco indivíduos (7,14% da amostra) apresentaram *C.albicans* e *S.aureus* nos isolados de enxágüe bucal, porém não ocorreu correlação entre as unidades formadoras de colônia (UFC) encontradas para as duas espécies.

Tabela 4 -- Dados referente à contagem de unidades formadoras de colônia de *C.albicans* e de bactérias do gênero *Staphylococcus* isolados da cavidade bucal de trinta (42,85%) dos indivíduos examinados.

Paciente	UFC <i>C.albicans</i>	UFC <i>Staphylococcus</i>
02	01	84
04	122	05
05	463	02
06	10	46
07	02	09
12	91	49
17	1210	472
18	61	05
19	117	517
20	172	300
24	31	664
25	19	159
29	43	140
31	25	524
32	74	24
33	828	95
35	09	03
36	01	144
37	29	107
40	07	356
42	108	275
44	776	25
46	09	03
48	14	12
50	04	03
54	85	400
60	63	108
64	04	22
65	03	62
67	59	126
Média ± Desvio Padrão	148 ± 288,65	158 ± 189,35

Tabela 5 -- Dados referente à contagem de unidades formadoras de colônia de *C.albicans* e *S.aureus* isolados da cavidade bucal de cinco pacientes (7,14%) dos indivíduos examinados.

Paciente	UFC <i>C.albicans</i>	UFC <i>S.aureus</i>
05	463	02
06	10	46
07	02	09
19	17	517
33	828	95
Média ± Desvio Padrão	264 ± 371,43	134 ± 217,37

Tabela 6 - Dados referentes à contagem de unidades formadoras de colônia de *Staphylococcus aureus* e leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de nove pacientes (12,85%) dos indivíduos examinados.

Paciente	UFC <i>S.aureus</i>	UFC <i>Candida</i>
05	02	463
06	46	10
07	09	02
14	483	01
19	517	117
33	95	828
44	25	776
45	70	03
53	99	02
Média ± Desvio Padrão	149 ± 201,81	244 ± 349,50

Tabela 7 - Dados referentes à contagem de unidades formadoras de *S.hyicus*, *S.schleiferi*, *C.tropicalis* e *C.albicans* isoladas da cavidade bucal de seres humanos através do enxágüe bucal.

Paciente	UFC <i>S.hyicus</i>	UFC <i>S. schleiferi</i>	UFC <i>C. tropicalis</i>	UFC <i>C.albicans</i>
02	84	-	-	01
04	05	-	-	122
07	-	-	09	02
08	58	-	-	-
10	12	-	-	-
11	40	-	40	01
12	49	-	-	91
13	17	-	-	06
15	-	05	-	04
20	300	-	-	172
23	-	-	79	288
34	-	173	-	-
39	-	-	319	04
42	-	275	275	108
43	-	-	275	41
45	-	-	70	03
47	-	-	24	02
49	-	-	48	03
51	26	-	-	-
54	-	-	400	-
59	-	107	107	59
62	99	-	-	-
63	-	-	-	247
68	16	-	-	-
Média ± Desvio Padrão	65 ± 83,84	140 ± 113,47	150 ± 138,79	68 ± 91,95

6 DISCUSSÃO

A microbiota bucal é numerosa tanto na quantidade de espécies quanto no total de microrganismos. Calcula-se para a saliva a média de 750 milhões de microrganismos por mililitro. Das 350 a 400 espécies de microrganismos descritos como residentes da microbiota bucal, cerca de duzentos espécies são freqüentes para cada indivíduo em particular (Jorge⁵⁵, 1998). Deve-se ainda considerar a presença de microrganismos transitórios e suplementares.

O gênero *Candida* representa microrganismo habitante normal da microbiota bucal de seres humanos, sendo considerado como o único gênero de fungos que é residente na boca humana. Sua ocorrência na cavidade bucal é bastante variável e estão documentadas taxas de isolamento de 10 a 50%, atingindo em alguns relatos até 80% (Brawner & Cutler¹⁷, 1989; Scully et al.¹³⁶, 1994; Jorge et al.⁵⁸, 1997). Na ocorrência de ruptura do equilíbrio biológico, geralmente na presença de fatores predisponentes (patológicos, fisiológicos, imunológicos ou mecânicos), pode ocorrer aumento na multiplicação ou na invasão de *Candida* nos tecidos, instalando-se candidose (Odds⁹³, 1988; Ghannoum & Abu-Elteen³⁷, 1990). Esta infecção, causada por leveduras do gênero *Candida*, afeta o homem freqüentemente e sua incidência tem aumentado com o

crescente uso de antibióticos, drogas antifúngicas, agentes imunossupressores e outras doenças infecciosas, principalmente AIDS (Frost et al.³³, 1996).

Por outro lado, bactérias do gênero *Staphylococcus* também são encontradas na microbiota bucal (Rams et al.¹¹⁷, 1990; Öhman et al.⁹⁷, 1995), apesar de no ser humano seu nicho ecológico principal ser considerado as narinas anteriores (Reagan et al.¹²⁰, 1991; Parras et al.¹⁰¹, 1995). *S.aureus* é a principal causa de infecções bacterianas adquiridas na comunidade, além de ser o microrganismo mais freqüente nas infecções hospitalares e apresentar cepas com resistência extremamente elevada aos antibióticos (Horam et al.⁵⁰, 1988; Stamm et al.¹⁴², 1993; Walsh et al.¹⁵⁵, 1993; Tenover et al.¹⁴⁹, 1994).

Considerando-se a importância dos gêneros *Staphylococcus* e *Candida*, sua presença usual na boca, sua possibilidade de atuar como microbiota suplementar e, em determinadas situações, ocasionar doença, procurou-se no presente trabalho correlacionar a quantidade destes microrganismos na cavidade bucal humana. Öhman & Jontell ⁹⁶ (1988) observaram associação de *C.albicans* e *Staphylococcus aureus* em queilite angular e observaram que a eliminação do fungo com nistatina levou à cura da lesão. Nos resultados do presente trabalho, não foi observada correlação entre estes dois gêneros de microrganismos na população estudada. Importante salientar que os indivíduos do presente estudo não apresentavam queilite angular

ou qualquer outro tipo de lesão bucal que sugerisse candidose ou infecção por estafilococos.

Neville et al.⁹⁰. (1995) relataram que 20% dos casos de queilite angular são causados somente por *C.albicans*, sendo que 60% são devidos à infecção combinada de *C.albicans* e *S.aureus*, e 20% são associados somente com *S.aureus*.

O isolamento de *C.albicans* e outras espécies do gênero na cavidade bucal, na ausência de lesões, não significa evidência de candidose (Cannon et al.¹⁸, 1995), fato observado no presente estudo, visto que nenhum dos indivíduos apresentava candidose clínica.

Os resultados do presente trabalho demonstraram presença de microrganismo do gênero *Candida* na cavidade bucal de 50 (71,42%) indivíduos examinados, sendo a espécie *C.albicans* a mais freqüente, o que é relatado pela maioria dos autores (Samaranayake,¹²⁷ 1992; Frost et al.³³, 1996; Jorge et al.⁵⁶, 1997). *C.tropicalis* é considerada a segunda espécie de *Candida* que pode atuar como patógeno oportunista e produzir doença de indivíduos imunocomprometidos (Odds⁹², 1987; Gelfand,³⁴ 1989), e foi também a segunda mais isolada nos dados do presente trabalho (22% das amostras de *Candida* isoladas, representando 15,7% dos indivíduos examinados).

C.albicans é isolada de candidoses superficiais e profundas, com localização mucosa, mucocutânea, visceral ou sistêmica e

com fungemias. Pode causar flebite supurativa, artrite, osteomielite, endoftalmia, vaginites, balanites e lesões do sistema nervoso central.

C.tropicalis é implicada em candidoses invasivas e hospitalares (Marina et al.⁷⁹, 1991) e as infecções são clinicamente indistinguíveis das produzidas por *C.albicans*. Pode ser encontrada em culturas rotineiras de nariz, garganta, pele, vagina e trato gastrointestinal (Komshian et al.⁶⁵, 1989). Paula et al.¹⁰³ (1990) isolaram 12% de *C.tropicalis* da cavidade bucal de pacientes com câncer submetidos a radioterapia, resultados inferiores ao do presente trabalho (15,7%). Deve-se levar em consideração, entretanto, que, nos indivíduos examinados no presente estudo, não foi considerada a presença de fatores predisponentes.

A capacidade de adesão de *C.tropicalis* a células do epitélio bucal, fator que interfere com o grau de virulência das leveduras, é menos intensa quando comparado com *C.albicans* (Douglas,²⁸1987; Ruechel,¹²⁵ 1990; Ghannoum & Radwan,³⁸1990; Rinaldi,¹²¹ 1993), o que pode explicar, ao menos parcialmente, sua presença em menor número na cavidade bucal humana.

Duas cepas de leveduras foram isoladas no presente estudo (4% das amostras) foram *C.glabrata*. Esta levedura também pode ser isolada da cavidade bucal. Segundo Larone⁷³ (1995), em média 7% dos isolamentos bucais de leveduras são *C.glabrata*. Esta espécie está freqüentemente correlacionada com pacientes usuários de prótese total,

inclusive naqueles com estomatite. Esta espécie é relacionada com endocardite e fungemias sistêmicas (Komshian et al.⁶⁶, 1989) e não produz pseudo-hifas e hifas verdadeiras. Dados experimentais têm relatado que produção de hifas contribuem para a capacidade de invasão de *Candida* às células do hospedeiro, assim como maior resistência à fagocitose. A não produção de hifas por *C.glabrata* é uma possível justificativa para sua menor patogenicidade, assim como o fato de estar mais freqüentemente presente nos pacientes com estomatite por prótese total.

Apenas uma cepa isolada no presente trabalho foi *C. kefyr*. É a única espécie de importância médica que fermenta e assimila a lactose. Na cavidade bucal, sua presença tem sido associada com estomatite por prótese total. Cinco das amostras isoladas dos enxágües bucais não puderam ser identificadas através de provas bioquímicas e foram consideradas *Candida* spp.

A virulência de cepas de *C.albicans* e demais espécies do gênero parece ser determinada mais pelo hospedeiro do que pelo próprio microrganismo. A literatura demonstra freqüente colonização da cavidade bucal em indivíduos sadios sem lesões, que variam de 20 a 55% (Arendorf & Walker², 1979). Nos resultados do presente trabalho, encontrou-se isolamento de *Candida* em 71,42% dos setenta indivíduos examinados, o que foi uma taxa bastante elevada. Das cinquenta amostras isoladas, 31 (62%) eram *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis*

(22%), *C. glabrata* (4%) e *C. kefyr* (2%). MacFarlane⁷⁶ (1990) relata que o isolamento de *Candida* é variável na boca de indivíduos saudáveis, oscilando de 2 a 71%, com média de 34%. Segundo Brawner & Cutler¹⁷ (1989), a ocorrência de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal varia de 10 a 50%, atingindo em alguns casos até 80%, o que permite incluir os relatos encontrados no presente trabalho, nos quais observou-se *Candida* em 71,42% dos indivíduos examinados.

Os resultados relatados pela maioria dos autores, em diferentes grupos, nem sempre podem ser comparáveis, pois incluem várias populações com características próprias e diferentes técnicas utilizadas para coleta, isolamento e identificação de leveduras. O alto percentual de isolamento de *Candida* no presente trabalho pode ter sido decorrente de inúmeros fatores, tais como, método de coleta (enxágüe bucal), sítios anatômicos analisados (cavidade bucal como um todo), grupos de indivíduos não selecionados por idade, tipo de dieta alimentar, presença de dentes e uso de próteses parciais.

A prevalência das infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* afetam o homem, devido ao aumento da administração de antibióticos de amplo espectro, drogas anti-fúngicas e agentes imunossupressores (Frost et al.³³, 1996). A virulência dos fungos oportunistas está intimamente relacionada com a presença de fatores predisponentes intrínsecos (idade avançada, gravidez, prematuridade, neoplasias, hemopatias, avitaminoses, tuberculose, AIDS) e extrínsecos

(antibioticoterapia de largo espectro, corticóides, imunossupressores e agentes físicos e químicos) (Paula¹⁰², 1998).

Jorge et al.⁵⁶ (1997) relataram a presença de *C.albicans* em 27,6% das cavidades bucais de 428 jovens (17 a 23 anos) e em 33,1% das crianças (3 a 14 anos), que apresentavam saúde bucal e não demonstravam, através de anamnese e exame clínico, nenhum fator predisponente às candidoses. Os autores demonstraram que a presença de *Candida* foi maior em indivíduos que apresentavam fatores predisponentes, como o uso de prótese total (50%), aparelhos ortodônticos extrabucais (45%), periodontite do adulto (43%), aparelho ortodôntico fixo (38%) e respiração bucal (35%). No presente trabalho, o número de indivíduos portadores de *Candida* foi superior a todos os demais grupos descritos por Jorge et al.⁵⁶ (1997). Outro fator a ser considerado é a idade dos pacientes. No presente trabalho, estudaram-se adultos de 25 aos 75 anos, sem divisões por faixa etária.

Sabe-se que o hospedeiro possui mecanismos de resistência para controlar e impedir doença pelas leveduras do gênero *Candida*, visto que estes microrganismos podem habitar normalmente microbiota bucal, intestinal, vaginal e, eventualmente, pele (Cutler²⁴, 1991). Entre os fatores de virulência de *C.albicans*, a produção de proteinases e fosfolipases, tem sido amplamente estudada, dado que a ação de enzimas lipolíticas exerce importante papel na patogênese das candidoses.

A liberação de enzimas pelas células leveduriformes aderidas às células do hospedeiro facilita o poder invasor e interfere no metabolismo celular do hospedeiro, devido a alterações no transporte de íons pela célula e ou na permeabilidade seletiva da mesma, podendo conduzir à morte celular (Odds⁹³, 1988 e Ghannoum & Abu-Elteen³⁷, 1990). O conhecimento da produção de enzimas extracelulares como importante fator de virulência de *C.albicans* foi estabelecido através de trabalhos que relacionaram atividade enzimática com aderência às células e com a patogenicidade experimental (Barret-Bee et al.⁷, 1985, Ghannoum & Abu-Elteen³⁶, 1986).

Almeida¹ (1991) demonstrou produção de fosfolipase em 20% das amostras de *C. guilliermondii* estudadas, enquanto que *C.krusei*, *C.parapsilosis* e *C.tropicalis* não produziram fosfolipase. No presente estudo, entretanto, das 11 amostras de *C.tropicalis* isoladas, sete produziram fosfolipase, demonstrando resultados diferentes dos de Almeida¹ (1991).

A determinação da produção enzimática de amostras de *C.albicans* e outras espécies, isoladas de diversas condições e de diferentes sítios anatômicos, foi observada por vários autores (Rüchel et al.¹²⁴, 1982; Samaranayake et al.¹²⁹, 1984; Paula et al.¹⁰³, 1990; Maffei⁷⁷, 1996; Pires et al.¹⁰⁶, 1996; Oliveira et al.⁹⁸, 1998) que apontaram variações de atividade enzimática entre 60% a 100% para proteinase e 50 a 100% para fosfolipase.

Os resultados do presente trabalho estão de acordo com a literatura, visto que 87,09% das cepas de *C.albicans* produziram fosfolipase e 96,7% produziram proteinase, fortemente positivas. Por outro lado, 64,5% das cepas de *C.albicans* foram fortemente positivas para as duas enzimas.

A colonização das superfícies das mucosas por espécies patogênicas de *Candida* depende de sua habilidade de adesão, existindo correlação entre aderência e patogenicidade (Douglas²⁸,1987). Cassone et al.¹⁹, (1987) isolaram amostras de *C.albicans* de pacientes com candidose vulvovaginal e de pacientes saudáveis. Os autores verificaram que praticamente todas as amostras de *C.albicans* eram produtoras de proteinase, mas as isoladas de pacientes com vaginite produziam maior quantidade de enzima do que as isoladas de portadoras saudáveis. O mesmo foi observado por DeBernardis et al.²⁷, (1990), analisando a presença de proteínas ácidas em fluidos vaginais de pacientes sintomáticos e assintomáticos.

Almeida¹ (1991) verificou produção de proteinase em sete das oito cepas estudadas de *C.albicans* e em todas das dez de *C.tropicalis*. Das dez cepas estudadas de *C.parapsilosis*, *C.krusei* e *C.guilliermondii* o autor encontrou proteinase em sete, seis e nove cepas, respectivamente. A proteinase é capaz de degradar IgA secretória e sérica presente na saliva. Os possíveis efeitos protetores destes

anticorpos ficariam diminuídos na presença de amostra de microrganismos capazes de produzir proteinase.

A produção de substâncias protéicas denominadas fatores *killer* são secretadas *in vitro* por várias amostras de *Candida* e possuem efeito antibiótico para outros fungos e várias bactérias, sendo considerados também como fator de virulência (Polonelli & Morace¹⁰⁸,1986). No presente trabalho, utilizando a metodologia de Polonelli et al¹¹⁰. (1983), obtivemos seis diferentes biotipos *killer* (111,114,116, 411, 443, 888), sendo o biotipo 111 o mais freqüente (Tabela 3). Polonelli et al.¹¹⁰ (1983) obtiveram 25 biotipos diferentes numa população de cem amostras, com predominância do biotipo 111, (52%) e Magaró et al.⁷⁸ (1989) registraram três diferentes biotipos *killer* 111, 241 e 411.

O biotipo 888 não foi freqüente nas observações de Polonelli et al.¹¹⁰(1983), porém nos resultados do presente estudo foram encontrados seis cepas com este biotipo. O biotipo 888 significa cepas não tipáveis, ou seja, resistentes às proteínas *killer* produzidas pelas cepas padrão. No ponto de vista epidemiológico, a não tipabilidade é de grande valia, principalmente quando este biotipo é isolado sistematicamente na mesma instituição e/ou sítios anatômicos.

A superfície das mucosas e da pele do organismo humano é colonizada por uma microbiota característica. A pele colonizada serve como reservatório para disseminação de *Staphylococcus*

coagulase-negativo multi-resistente em infecções hospitalares (Rupp & Archer¹²⁶, 1994).

A cavidade bucal é um sistema de crescimento aberto. Somente se estabelecem microrganismos que possuem capacidade de aderência às superfícies da cavidade bucal ou que, de alguma maneira, fiquem retidos. A boca possui uma microbiota própria e a maioria de seus componentes não é capaz de colonizar em qualquer outro local do corpo humano. Os recém-nascidos, no segundo dia de vida, apresentam na cavidade bucal 98% de estreptococos viáveis e os estafilococos aparecem em menor número. No terceiro mês de vida, a boca de todas as crianças já possui microbiota, sendo isolados estafilococos (Jorge⁶⁵, 1998).

Suzuki et al.¹⁴⁶, 1997 relataram que cavidade bucal pode servir como reservatório de *S.aureus*. Os mesmos autores demonstraram a incidência de *S.aureus* na cavidade bucal de crianças, onde 44 (43%) foram positivas para *S.aureus*.

O nicho ecológico de *S.aureus* no organismo humano são as narinas anteriores. Inúmeros estudos têm mostrado que as narinas são as mais importantes e freqüentes áreas onde estes microrganismos podem ser encontrados. Essa teoria é confirmada quando os portadores nasais são tratados e o microrganismo desaparece também, na maioria dos casos, de outras áreas do corpo (Reagan et al.¹²⁰, 1991, Parras et al.¹⁰¹, 1995). Por outro lado, em 1965, Knighton⁶⁴, estudando a presença

de estafilococos coagulase-positivos na cavidade bucal e nasal de acadêmicos de Odontologia, encontrou o microrganismo em 47,5% dos indivíduos, na saliva, e em 41,7% nas fossas nasais. Segundo o autor, a relação numérica entre os dados encontrados sugere que, como reservatórios de estafilococos patogênicos, a cavidade bucal é, possivelmente, tão importante quanto as fossas nasais. Piochi & Zelante¹⁰⁵ (1973) encontraram *S.aureus* em 35% das amostras de saliva examinadas e também sugeriram a importância da cavidade bucal como reservatório de estafilococos patogênicos.

S.aureus foi isolado 13,9% dos enxágües bucais dos indivíduos examinados no presente trabalho. Entretanto, considerando-se estafilococos coagulase-positivos, foram isoladas 24 cepas (37%). Knighton⁶⁴ (1965) demonstrou isolamento de *S.aureus* em 47,5% da cavidade bucal dos indivíduos examinados, resultados superiores aos encontrados neste trabalho, mesmo considerando-se que o critério utilizado para identificação do microrganismo foi realizado até a prova da coagulase, ou seja, todos os cocos Gram-positivos catalase e coagulase-positivos foram considerados como *S.aureus*.

Importante salientar, nos dados do presente trabalho, que foram isoladas cepas de *S.hyicus* (17% das amostras) e de *S.schleiferi* subspécie *coagulans* (6,1% das amostras) na cavidade bucal humana. Não foi encontrado nenhum trabalho na literatura descrevendo a presença destes microrganismos na cavidade bucal.

Staphylococcus coagulase-negativos foram encontrados em 63% dos enxágües bucais examinados no presente estudo. Apesar de já terem sido considerados contaminantes de pouca importância clínica, os estafilococos coagulase-negativos foram reconhecidos como agentes de doenças humanas nas duas últimas décadas (Koneman et al.⁶⁶, 1997). Associa-se com estafilococos coagulase-negativo infecções urinárias, nosocomiais, endocardites, infecções de válvulas cardíacas, osteomielite e endoftalmia pós-cirúrgica (Rupp & Archer¹²⁶, 1994). Houve aumento dramático na incidência de bacteriemia por *Staphylococcus* coagulase-negativos nos últimos 10 a 15 anos. Choque séptico tem sido reportado com incidência de 12 a 15%, e taxas de mortalidade de 30 a 37% foram observadas. Aproximadamente metade dos óbitos associados com bacteremias são por *Staphylococcus* coagulase-negativos.

Helovuo et al.⁴⁹ (1993) demonstraram que 43% dos 24 pacientes que receberam tratamento sistêmico com penicilina apresentaram abscesso periodontal. Segundo os autores, a administração sistêmica de penicilina e eritromicina em pacientes com periodontite podem levar à superinfecção com microrganismos oportunistas como *S. aureus*, *C.albicans* e *C.guilliermondii*.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho possibilitaram as seguintes conclusões.

- a) leveduras do gênero *Candida* foram encontradas em 71,42% dos enxágües bucais dos indivíduos examinados, sendo *C. albicans* a mais freqüente (62%) seguindo-se *C.tropicalis* (22%), *C.glabrata* (4%) e *C.kefyr* (2%);
- b) *Staphylococcus* foram isolados em 92,85% das cavidades bucais dos indivíduos examinados, sendo 41 cepas (63%) coagulase negativas. Das 24 cepas coagulase positivas, nove eram *S.aureus*, 11 *S.hyicus* e quatro *S.schleiferi* subespécie *coagulans*;
- c) não ocorreu correlação entre as quantidades (UFC) de *Staphylococcus* e *Candida* encontradas nos enxágües bucais dos indivíduos examinados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 ALMEIDA, N.Q. **Influência da produção de hialuronidase, proteinase, condroitin-sulfatase e fosfolipase por algumas espécies de *Candida* sobre a patogenicidade para camundongos.** 1991. 111f. Tese (Livre Docência em Microbiologia) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.
- 2 ARENDORF, T.M.; WALKER, D. M. Oral candidal populations in health and disease. **Br Dent J**, v.147, n.10, p. 267-72, Nov. 1979.
- 3 ASHMAN, R.B.; PAPADIMITRIOU, J.M. What's new in the mechanisms of host resistance to *Candida albicans* infection? **Path Res Pract**, Stuttgart v.186, n. 4, p. 527-34, Aug. 1990.
- 4 BANNERMAN, T.L. et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 33, n.3, p. 551-5, Mar. 1995.
- 5 BANNO, Y.; YAMADA, T.; NOZAWA, Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. **Sabouraudia: J Med Vet Mycol**, Edinburgh, v.23, n.1, p.47-54, Feb. 1985.

* Baseado em: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Rio de Janeiro. **Referências bibliográficas NBR 6023**. Rio de Janeiro. 2000. 23p.

- 6 BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts:** characteristics and identification. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, p. 1-37, 1991.

- 7 BARRET-BEE, K. et al. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **J Gen Microbiol**, London, v.131, p.1217-21, 1985.

- 8 BECHARA, Z.M. Portadores sãos de *Staphylococcus aureus* entre escolares de Ribeirão Preto. **O Hospital**, v. 79, n.1, p. 177-87, jan. 1971.

- 9 BENDHACK, L.I., BRANCO, M.E.G.; ARAUJO, R.P.M. Septicemia por *S. aureus*. **J. Epidemiol**, v. 12, p. 8-14, 1986.

- 10 BENDOÁ, O. The *killer* phenomenon in yeasts. **Folia Microbiol**, v.31, n.5, p.422-33, 1986.

- 11 BEVAN, E.A ; MAKOWER, M. The physiological basis of killer character in yeast. **Proc Lith Int Congr Genet I**, 203, 1962 (Abstract) apud WOODS, D.R.; BEVAN, E. A. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **J Gen Microbiol**, London, v. 51, p. 115-26, 1968.

- 12 BLOOM, R.H.; BROWN, L.R. A study of the effects of orthodontic appliances on the oral microbial flora. **Bacteriology**, v. 17, n. 5, p. 658-67, May 1964.

- 13 BORG, M.; RÜCHEL, R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida spp.* during experimental infection of oral mucosa. **Infect Immun**, Washington, v. 56, n. 3, p. 626-31, 1988.

- 14 BORG, M.; RÚCHEL, R. Demonstration of fungal proteinase during phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **J Med Vet Mycol**, Oxfordshire, v. 28, n. 1, p. 3-14, 1990.
- 15 BOYCE, J.M. Preventing Staphylococcal infections by eradicating nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Proceeding with caution. **Infec Control Hosp Epidemiol**, v. 17, n. 12, p. 775-9, Dec. 1996.
- 16 BRANCHINI, M.L. et al. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 32, n. 2, p. 452-6, Feb. 1994.
- 17 BRAWNER, D.L.; CUTTLER, J.E. Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 27, n. 6, p. 1335-41, June 1989.
- 18 CANNON, R.D. et al. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? **J Dent Res**, v. 74, n. 5, p. 1152-61, 1995.
- 19 CASSONE, A. et al. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. **J Infect Dis**, Chicago, v. 156, n.5, p. 777-83, Nov. 1987.
- 20 ÇETIN, E.T. et al. Investigations on aerobic and nasal flora of university students. **Pathol Microbiol**, v. 37, p. 185-93, 1971.
- 21 COLEMAN, D.C. et al. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. **AIDS**, v. 11, n. 5, p. 557-67, Apr.1997.

- 22 COTTER, G. et al. Membrane changes associated with the early stages of apoptosis in Hep-2 cells decrease susceptibility to adherence by *Candida albicans*. **J Med Vet Mycol**, Oxfordshire, v. 35, n. 3, p. 219-24, May/June, 1997.
- 23 CURTIS, M.A. et al. Identification of the major surface protein antigens of *Porphyromonas gingivalis* using IgG antibody reactivity of periodontal case-control serum. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 6, n. 6, p. 321-6, Dec. 1991.
- 24 CUTLER, J.E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annu Rev Microbiol**, v. 45, p. 187-218, 1991.
- 25 DAHLE, U.R.; OLSEN, I. Anaerobiosis and serum promote mycelium formation by *Candida albicans* in colonies on TSBV ágar. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.49, n. 1, p.41-5, Feb. 1991.
- 26 DAHLÉN, G. Role of suspected periodontopathogens in microbiological monitoring of periodontitis. **Adv Dent Res**, v. 7, n. 2, p. 163-74, Aug. 1993.
- 27 DeBERNARDIS, F. et al. Experimental pathogenicity and acid proteinase secretion of vaginal isolates of *Candida parapsilosis*. **J Med Vet Mycol**, Oxfordshire, v. 28, p. 125-37, 1990.
- 28 DOUGLAS, L.J. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. **Crit Rev Microbiol**, Boca Raton, v.15, n.1, p.27-43, 1987.

- 29 FANTINATO, V.; ZELANTE, F. Verificação da existência de portadores de *Staphylococcus aureus* entre estudantes de odontologia. **Rev Fac Odontol São José dos Campos**, v. 6, n.1/2, p. 1-11, jan./dez. 1977.

- 30 FARRIS, G.A.; MANAZZU, I.; BUDRONI, M. Identification of killer factor in the yeast genus *metschnikowia*. **Biotechnol Letters**, v. 13, n.4, p. 297-8, 1991.

- 31 FIHN, S.D. et al. Use of spermicide-coated condoms and other risk factors for urinary tract infection caused by *Staphylococcus saprophyticus*. **Arch Int Med**, v. 158, n.3, p. 281-7, Feb. 1998.

- 32 FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. *Staphylococcus*, *micrococcus*, and similar organisms. In: _____. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology**. 3.ed. St. Louis: Mosby, 1998. cap. 52, p. 602-18.

- 33 FROST, G.I.; CSÓKA, T.; STERN, R. The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview. **Trends Glycosc Glycolechnol**, v. 8, n. 44, p.419-34, Nov. 1996.

- 34 GELFAND, M.S. *Candida tropicalis*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, Thorofare, v. 10, n. 6, p. 280-3, 1989.

- 35 GHANNOUM, M.; ABU ELTEEN, K. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. **J Med Vet Mycol**, v. 24, n. 5, p. 407-13, 1986.

- 36 GHANNOUM, M.A. Mechanisms potentiating *Candida* infections: a review. **Mycoses**, Berlin v. 31, n. 11, p. 543-57, Feb. 1988.
- 37 GHANNOUM, M.A.; ABU-ELTEEN, K.H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, Berlin v.33, n. 6, p. 265-82, June 1990.
- 38 GHANNOUM, M.A.; RADWAN, S.S. ***Candida* adherence to epithelial cells**. New York: CRC, 1990.
- 39 GHANNOUM, M.A. et al. Effects of octenidine and pirtenidine on adhesion of *Candida* species to human buccal epithelial cells *in vitro*. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 249-53, 1990.
- 40 GILFILLAN, G.D. et al. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology**, New York, v. 144, n.4, p. 829-38, Apr. 1998.
- 41 GRATTARD, F. Characterization of unrelated strains of *Staphylococcus schleiferi* by using ribosomal DNA fingerprinting, DNA restriction patterns, and plasmid profiles. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 31, n. 4, p. 812-8, Apr. 1993.
- 42 GREEN, M.S.; RUBINSTEIN, E.; AMIT, P. Estimating the effects of nosocomial infections on the length of hospitalization. **J Infec Dis**, Chicago, v. 145, n. 5, p. 667-73, May 1982.
- 43 GROSS, P.A. et al. Deaths from nosocomial infections: experience in a University Hospital and a Community Hospital. **Am J Med**, New York, v. 68, n. 2, p. 219-23, Feb. 1980.

- 44 HALEY, R.W. et al. Nosocomial infections in U.S. Hospitals, 1975-1976. **Am J Med**, New York, v. 70, n.4, p. 947-59, Apr. 1981.
- 45 HARTSTEIN, A.L. Recurrent *Staphylococcus aureus* bacteremia. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 30, n. 3, p. 670-4, May 1992.
- 46 HARTSTEIN, A.L.; MULLIGAN, M.E. Methicilin – resistant *Staphylococcus aureus*. In: MAYHALL, C.G. **Hospital epidemiology and infection control**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1996. cap.18. p. 290-306.
- 47 HASENCLEVER, H.F.; MITCHELL, W.O. Antigenic studies of *Candida*. I. Observations of two antigenic groups in *Candida albicans*. **J Bacteriol**, Washington, v. 82, p. 570-3, 1961.
- 48 HASENCLEVER, H.F.; MITCHELL, W.O. Antigenic studies of *Candida*. III. Comparative pathogenicity of *Candida albicans* grupo A, group B, and *Candida stellatoidea*. **J Bacteriol**, Washington, v. 82, p. 578-81, 1962.
- 49 HELOVUO, H.; HAKKARAINEN, K.; PAUNIO, K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 8, n.2,p. 75-9, Apr. 1993.
- 50 HORAN, T.C.; CULVER, D.; JARVIS, W. Pathogenes causing nosocomial infections. Preliminary data from the national nosocomial infections surveillance system. **Antimicrob Newslett**, New York, v. 5, p. 65-7, 1988.

- 51 HUNTER, P.R. A critical review of typing methods for *Candida albicans* and their applications. **Crit Rev Microbiol**, Boca Raton, v. 17, n. 6, p. 417-34, 1991.
- 52 IKEDA, T.; ISODA, S.; IIDAKA, T. A study on Staphylococci isolated from the acute suppurative diseases in oral área: with reference to their comparison in pathogenicity. **J Nihon Univ Sch Dent**, v. 6, n. 3, p. 88-99, Sept. 1964.
- 53 IWASE, M. et al. Leukocidal activity of staphylococci isolated from human periodontal lesions. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 5, n.4, p. 233-6, Aug. 1990.
- 54 JORGE, A.O.C. **Presença de *Candida* e de anticorpos anti-*Candida* na cavidade bucal de pacientes com periodontite crônica do adulto**. 1995. 210f. Tese (Livre-Docência em Microbiologia e Imunologia) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.
- 55 JORGE, A.O.C **Microbiologia bucal**. 2.ed. São Paulo: Ed. Santos, 1998. Cap.1, p. 1-20.
- 56 JORGE, A.O.C. et al. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 279-85, out./dez. 1997.
- 57 KAGAN, B.L. Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayer membranes. **Nature**, v. 302, n. 21, p.709-11, Apr. 1983.

- 58 KAMINISHI, H. et al. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. **Infect Immun**, Washington, v. 63, n. 3, p. 984-8, Mar. 1995.
- 59 KIMURA, L.H.; PEARSALL, N.N. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. **Infect Immun**, Washington, v. 28, n. 2, p. 464-8, May 1980.
- 60 KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P.R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 6.ed., Washington: ASM Press, 1995. Cap. 22, p. 282-98.
- 61 KLOOS, W.E.; JORGENSEN, J.H. Staphylococci. In: LINNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, S. **Manual of clinical microbiology**. 4.ed. Washington; American Society for Microbiology, 1985. p. 143-53.
- 62 KLUYTMANS, J.; BELKUM, A. V.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, n.3, p. 505-20, July 1997.
- 63 KLUYTMANS, J. et al. Outbreak of *Staphylococcus schleiferi* wound infections: Strain characterization by randomly amplified polymorphic DNA analysis, PCR ribotyping, conventional ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 36, n. 8, p. 2214-9, Aug. 1998.

- 64 KNIGHTON, H.T. Coagulase-positive Staphylococci in oral and nasal áreas of dental students: a four-year study. **J Dent Res**, v. 44, n. 3, p. 467-70, May/June 1965.
- 65 KOMSHIAN, S.V. et al. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: Frequency, characteristics and evaluation of factors influencing outcome. **Rev Infect Dis**, Chicago, v, 2, n. 3, p. 379-90, May/June 1989.
- 66 KONEMAN, E. et al. The Gram-Positive Cocci: Part I: *Staphylococci* and related organisms. In: _____. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5.ed. Washington: Lippincott – Raven. Cap. 11, p. 539-75. 1997.
- 67 KONTOU-KASTELLANOU, C. et al. A case of *Candida parapsilosis* endocarditis. **Mycoses**, Berlin, v. 33, n. 9/10, p. 427-9, Mar. 1990.
- 68 KOTHAVADE, R.J.; PANTHAKI, M.H. Evaluation of phospholipase activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice. **J Med Microbiol**, Edinburgh, v. 47, n. 2, p. 99-102, Feb. 1998.
- 69 KUBO, C.H.; GOMES, A.P.M.; JORGE, A.O.C. Isolamento de *Candida* de canais radiculares e verificação da sua sensibilidade a medicamentos utilizados na prática endodôntica. **Rev Odontol UNICID**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 119-30, jul./dez. 1997.
- 70 KWON-CHUNG, K.J. et al. Genetic differences between type I and type II. *Candida stellatoidea*. **Infect Immun**, Washington, v. 57, n. 2, p. 527-32, Feb. 1989.

- 71 LACAZ, C.S. et al. Classificações e caracteres gerais dos fungos. In: ____: **Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico**, São Paulo: Sarvier, 1998. Cap. 1, p. 3-45.
- 72 LÄMMLER, C. Characterization of *Staphylococcus hyicus* with the ATB 21 Staph system and with conventional tests. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 29, n. 6, p. 1221-4, June 1991.
- 73 LARONE, D.H. Yeast and yeastlike organism. In: _____. **Medically important fungi: a guide to identification**. 3.ed. Washington: ASM Press, 1995. Cap. 10, p. 61-83.
- 74 LODDER, J. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 1970.
- 75 MacDONALD, F.; ODDS, F.C. Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. **J Med Microbiol**, Edinburgh, v. 13, n.3, p. 423-35, Aug. 1980.
- 76 MacFARLANE, T.W . Ecology and epidemiology of *Candida*. In: SAMARANAYAKE, L.P.; MACFARLANE, T.W. **Oral cansidosis**. London: Wright, 1990. Cap. 3, p. 21-46.
- 77 MAFFEI, C.M.L. **Amstras de *C. albicans* isoladas de gestantes: fatores de virulência, sensibilidade a antifúngicos, tipagem fenotípica e genotípica**. 1996. 181f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

- 78 MAGARÓ, H.M.; BIASOLI, M.S.; BRACALENTI, B.J.C. Sistema "killer" en cepas de *Candida albicans*. Part II. **Bol Micol**, v. 4, n. 2, p. 73-6, 1989.
- 79 MARINA, N.M. et al. *Candida tropicalis* and *Candida albicans*. Fungemia in children with leukemia. **Cancer**, Philadelphia, v. 68, n. 3, p. 594-9, Aug. 1991.
- 80 MARTIN, M.V. Germ-tube formation by oral strains of *Candida tropicalis*. **J Med Microbiol**, Edinburgh, v. 12, n. 2, p. 187-93, May 1979.
- 81 MARTIN, M.V.; LAMB, D.J. Frequency of *Candida albicans* serotypes in patients with denture-induced stomatitis and in normal denture wearers. **J Clin Pathol**, London, v. 35, n. 8, p. 888-91, Aug. 1982.
- 82 MARTIN, M.V.; WHITE, F.H. A microbiologic and ultrastructural investigation of germ-tube formation by oral strains of *Candida tropicalis*. **Am J Clin Pathol**, Philadelphia, v. 75, n. 5, p.671-6, May 1981.
- 83 McCULLOUGH, M.J.; ROSS, B.C.; READE, P.C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes and methods of strain differentiation. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 25, n.2, p. 136-44, Apr. 1996.
- 84 McLLROY, M. A. Failure of fluconazole to suppress fungemia in a patient with Fever, Neutropenia and Typhlitis. **J Infec Dis**, Chicago, v. 163, p. 420-1, Feb. 1991. (Letter).

- 85 McMULLAN-VOGEL, C.G.; et al. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. **Oral Microbiol Immunol**, Copehagen, v. 14, n. 3, p.183-189, June 1999.

- 86 MEDOFF, G. Bone joints and muscles. In: SCHAECHTER, M.; MEDOFF, G.; EISENSTEIN, B.J. **Mechanisms of microbial disease**. 2ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. Cap. 61, p. 760-9.

- 87 MEYER, S.A.; AHEAR, D.G.; YARROW, D. Genus 4. *Candida* Berkhout. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. 3.ed. Amsterdam: Elsevier, 1984. Cap. 4, p. 585-845.

- 88 MINAGI, S. et al. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. **Infect Immun**, Washington, v. 47, n. 1, p. 11-4, Jan. 1985.

- 89 NEELY, A.N., HOLDER, I.A. Effect of proteolytic activity on virulence of *Candida albicans* in burned mice. **Infect Immun**, Washington, v. 58, n. 6, p. 1527-31, June 1990.

- 90 NEVILLE, B.W. et al. Fungal and protozoal diseases. In: _____. **Oral & maxillofacial pathology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. Cap. 6, p.163-80.

- 91 NIKAWA, H. et al. Quantification of thigmotropism (contact sensing) of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 138, n.1, p. 13-9, 1997.

- 92 ODDS, F.C. *Candida* infections: an overview. **Crit Rev Microbiol**, Boca Raton, v. 15, n. 1, p. 1-5, 1987.
- 93 ODDS, F.C. Introduction and historial Note. In: _____. **Candida and candidosis**. London: Baillière Tindall. 1988. Cap. 1, p. 1-15.
- 94 ODDS, F.C. Pathogenesis of *Candida* infections. **J Am Acad Dermatol**, St. Louis, v. 31, n. 3, p. S2-5, 1994.
- 95 ODDS, F.C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 32, n. 8, p. 1923-9, Aug. 1994.
- 96 ÖHMAN, S.C.; JONTELL, M. Treatment of angular cheilitis. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v. 46, n.5, p. 267-72, Oct. 1988.
- 97 ÖHMAN, S.C. et al. The prevalence of *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* species, and *Candida* species and their relation to oral mucosal lesions in a group of 79-year-olds in Göteborg. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v. 53, n.1, p. 49-54, Fev. 1995.
- 98 OLIVEIRA, E.E. et al. Toxinas *killer* e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Rev Soc Bras Med Trop**, Brasília, v. 31, n.6, p. 523-27, nov./dez. 1998.
- 99 OLSEN, I. Denture stomatitis: occurrence and distribution of fungi. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v. 32, n. 5 , p. 329-33, 1974.

- 100 OLSEN, I. Oral adhesion of yeasts. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v. 48, p. 45-53, Feb. 1990.
- 101 PARRAS, F. et al. Comparative study of mupirocin and oral co-trimoxazole plus topical fusidic acid eradication of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 39, n. 1, p. 175-9, Jan. 1995.
- 102 PAULA, C.R. Candidíases. In: ZAITZ, C. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1998. Cap. 8, p. 99-107.
- 103 PAULA, C.R. et al. Oral yeasts in patients with cancer of the mouth, before and during radiotherapy. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 112, n. 2, p. 119-24, Nov. 1990.
- 104 PEÇANHA, M.P. Yeasts and others parameters of pollution of the Ribeirão Claro stream in Rio Claro, São Paulo. **Rev Microbiol**, São Paulo, v. 27, p. 177-81, 1996.
- 105 PIOCHI, B.J.A.; ZELANTE, F. Contribuição para o estudo de *Staphylococcus* isolados da cavidade bucal. I – *Staphylococcus* isolados da saliva. **Rev Fac Odontol S Paulo**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 367-78, 1973.
- 106 PIRES, M.F.C. et al. *Candida albicans* biotypes isolated from the oral cavity of HIV-positive patients. **Rev Microbiol**, São Paulo, v. 27, n.1, p. 46-51, 1996.
- 107 PLOUFFE, J.F. et al. Nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia related to intravenous infusions. **Arch Intern Med**, Chicago, v. 137, p. 1686-9, Dec. 1977.

- 108 POLONELLI, L.; MORACE, G. Reevaluation of the yeast *killer* phenomenon. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 24, n. 5, p. 866-9, Nov. 1986.
- 109 POLONELLI, L.; MORACE, G. Production and characterization of yeast killer toxin monoclonal antibodies. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 25, n. 2, p. 460-2, Feb. 1987.
- 110 POLONELLI, L. et al. *Killer* system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 17, n. 5, p. 774-80, May 1983.
- 111 POLONELLI, L. et al. Production of yeast *killer* toxin in experimentally infected animals. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 100, p. 169-75, 1990.
- 112 POLONELLI, L. et al. Potenzialità del fenomeno killer dei lievite. **Rev Ibero Amer Micol**, v. 9, p. 23-7, 1992.
- 113 PRICE, M.F.; CAWSON, R.A. Phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 15, n.2, p. 179-85, July 1977.
- 114 PRICE, M.F. et al. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 20, n.1, p. 7-14, Mar. 1982.
- 115 PUGH, D.; CAWSON, R.A. The cytochemical localization of phospholipase a and lysophospholipase in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 13, n.1, p. 110-5, Mar. 1975.

- 116 PUGH, D.; CAWSON, R.A. The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 15, p. 29-35, 1977.
- 117 RAMS, T.E.; FEIK, D.; SLOTS, J. Staphylococci in human periodontal diseases. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 5, n. 1, p. 29-32, Feb. 1990.
- 118 RAY, T.L.; PAYNE, C.D. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. **Infect Immun**, Washington, v. 58, n. 2, p. 508-14, Feb. 1990.
- 119 RAY, T.L.; PAYNE, C.D. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in Murine Candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. **Infect Immun**, Washington, v. 56, n. 8, p. 1942-9, Aug. 1988.
- 120 REAGAN, D.R. et al. Elimination of coincident *Staphylococcus aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment. **Ann Intern Med**, v. 114, n. 2, p. 101-6, Jan. 1991.
- 121 RINALDI, M.G. Biology and pathogenicity of *Candida* species. In: BODEY, G.P. **Candidiasis: Pathogenesis, diagnosis and treatment**. New York: Raven Press, 1993. Cap. 3, p.1-20.
- 122 RODERO, L. et al. *Candida dubliniensis*: primer aislamiento en Argentina. **Rev Arg Microbiol**, Buenos Aires, v. 30, n.1, p. 39-41, Jan/Mar. 1998.

- 123 RÜCHEL, R. A variety of *Candida* proteinases and their possible targets of proteolytic attack in the host. **Zbl Bakt Hyg**, v. 257, n. 2, p. 266-74, July 1984.
- 124 RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 20, n.3, p. 233-44, Sep. 1982.
- 125 RUECHEL, R. Virulence factors of *Candida* species. In: SAMARANAYAKE, L.P.; MacFARLANE, T.W. **Oral candidosis**. London: Wright, 1990. Cap. 4, p. 47-65.
- 126 RUPP, M.E.; ARCHER, G.L. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. **Clin Infec Dis**, Chicago, v. 19, n.2, p. 231-45, Aug. 1994.
- 127 SAMARANAYAKE, L.P. Oral mycoses in HIV infection. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 73, n. 2, p. 171-80, Feb. 1992.
- 128 SAMARANAYAKE, L.P.; MacFARLANE, T.W. **Oral candidosis**. London: Wright, 1990.
- 129 SAMARANAYAKE, L.P.; RAESIDE, J.M.; MacFARLANE, T.W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. **Sabouraudia: J Med Vet Mycol**, Edinburgh, v. 22, p. 201-7, 1984.
- 130 SAMARANAYAKE, L.P. et al. The effect of chlorhexidine and benzydamine mouthwashes on mucositis induced by therapeutic irradiation. **Clin Radiol**, Edinburgh, v. 39, n.3, p. 291-4, May 1988.

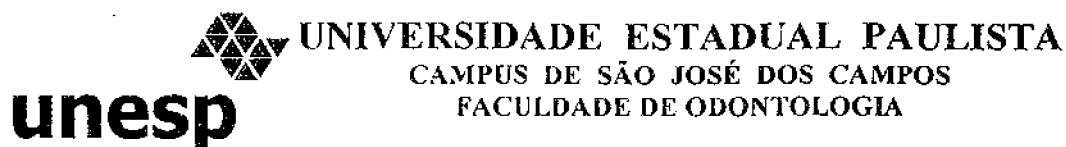
- 131 SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of na emerging pathogen. **J Med Microbiol**, Edinburgh, v. 41, n. 5, p. 295-310, Nov. 1994.
- 132 SANDVÉN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v. 48, n. 1, p. 27-36, Feb. 1990.
- 133 SCANNAPIECO, F.A.; MYLOTTE, J.M. Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia. **J Periodontol**, Indianápolis, v. 67, n. 10, p. 1114-22, Oct. 1996.
- 134 SCHAFFNER, W. The global impact of hospital acquired infections. In: WENZEL, R.P. **Preventions and control of nosocomial infections**. 3.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1987. cap. 1. p. 13-18.
- 135 SCHMID, J. et al. Evidence for nosocomial transmission of *Candida albicans* obtained by Ca3 fingerprinting. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 33, n. 5, p. 1223-30, May 1995.
- 136 SCULLY, C.; EL-KABIR, M.; SAMARANAYAKE, L.P. *Candida* and oral candidosis: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, Alexandria, v. 5, n. 2, p. 125-57, 1994.
- 137 SHEPHERD, M.G. Biology of *Candida* species. In: SARAMANAYAKE, L.P.; MACFARLANE, T.W. **Oral candidosis**. London: Wright, 1990. Cap. 2, p.10-9.

- 138 SILVA, T.M.J.; GLEE, P.M.; HAZEN, K.C. Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Candida albicans* to extracellular matrix protein. **J Med Vet Med**, Oxfordshire, v. 33, p. 117-22, 1995.
- 139 SLOTS, J.; FEIK, D.; RAMS, T.E. Age and sex relationships of superinfecting microorganisms in periodontitis patients. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 5, n.5, p. 305-8, Oct. 1990.
- 140 SOBEL, J.D. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 152, n.7, p. 924-35, Aug. 1985.
- 141 SOCRANSKY, S.S.; MANGANIELLO, S.D. The oral microbiota of man from birth to senility. **J Periodontol**, Indianápolis, v. 42, n. 8, p. 485-94, Aug. 1971.
- 142 STAMM, A.M.; LONG, M.N.; BELCHER, B. Higher overall nosocomial infection rate because of increased attack rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Am J Infect Control**, v. 21, n. 2, p. 70-4, Apr. 1993.
- 143 STENDERUP, A. Oral mycology. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v. 48, n. 1, p. 3-10, Feb.1990.
- 144 SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 36, n. 2, p. 329-34, Feb. 1998.
- 145 SUMMERS, D.F.; GROLLMAN, A.P.; HASENCLEVER, H.F. Polysaccharide antigens of *Candida* cell wall. **J Immunol**, v. 92, p. 491-9, 1964.

- 146 SUZUKI, J. et al. A long-Term of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the oral cavity of children. **Microbiol Immunol**, Japão, v. 41, n. 9, p. 681-6, 1997.
- 147 TAKAHASHI, M.; BANNO, Y.; NOZAWA, Y. Secreted *Candida albicans* phospholipases: purification and characterization of two forms of lysophospholipase-transacylase. **J Med Vet Mycol**, Oxfordshire, v. 29, p. 193-204, 1991.
- 148 TALLY, F.P. *Staphylococcus*: Abscesses and other diseases. In: SCHAECHTER, M.; MEDOFF, G.; EISENSTEIN, B.J. **Mechanisms of microbial disease**. 2.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. Cap. 11, p. 187-97.
- 149 TENOVER, F.C. et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 32, n. 2, p. 407-15, Feb. 1994.
- 150 TRONCHIN, G. et al. Adherence of *Candida albicans* germ tubes to plastic: ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesins. **Infect Immun**, Washington, v. 56, n. 8, p. 1987-93, Aug. 1988.
- 151 TSUBOI, R. et al. Pathogenesis of superficial mycoses. **J Med Vet Mycol**, Oxfordshire, v. 32, suppl., p. 91-104, 1994.
- 152 VANDENBUSSCHE, M.; SWINNE, D. Yeasts oral carriage in denture wearers. **Mykosen**, Berlin, v. 27, n. 9, suppl., p. 431-5, 1984.

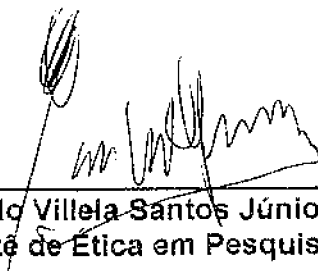
- 153 VOSS, A. et al. Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 32, n. 4, p. 975-80, Apr. 1994.
- 154 WALSH, T.J. et al. Prospective microbiologic surveillance in control of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infect Control**, Thorofare, v. 8, n. 1, p. 7-14, 1987.
- 155 WALSH, T.J. et al. Randomized double-blinded trial of rifampin with either novobiocin or trimethoprim-sulfamethoxazole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization: Prevention of antimicrobial resistance and effect of host factors on outcome. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1334-42, June 1993.
- 156 WATANAKUNAKORN, C. et al. *Candida* endocarditis surrounding a starr-Edwards prosthetic valve. **Arch Intern Med**, Chicago, v. 121, n. 3, p. 243-5, Mar. 1968.
- 157 WELLMER, A.; BERNHARDT, H. Adherence on buccal epithelial cells and germ tube formation in the continuous flow culture of clinical *Candida albicans* isolates. **Mycoses**, Berlin, v. 40, n.9-19, p. 363-8, Dec. 1997.
- 158 WILLIAMS, R.E. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: Its prevalence and importance. **Bacteriol Rev**, v. 27, p. 56-71, 1963.
- 159 WOODS, D.R.; BEVAN, E. A. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **J Gen Microbiol**, London, v. 51, n.1, p. 115-26, Apr. 1968.

- 160 YOKOYAMA, K. et al. The role of microfilaments and microtubules in apical growth and dimorphism of *Candida albicans*. **J Gen Microbiol**, London, v. 136, n. 6, p. 1067-75, June 1990.

Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa**CERTIFICADO**

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 072/99-PH/CEP, sobre “Presença de microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Candida* na cavidade bucal humana”, sob a responsabilidade de Clélia Aparecida de Paiva Martins, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 20 de setembro de 1999.



Prof. Dr. Paulo Villela Santos Júnior
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Anexo B – Termo de Informação e Consentimento para Participação em Pesquisa Clínica

TÍTULO: Presença de microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Candida* na cavidade bucal

PESQUISADORES:

ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE*

CLÉLIA APARECIDA DE PAIVA MARTINS

Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos - UNESP*

Faculdade de Odontologia da Universidade de Taubaté - UNITAU*

1. **INTRODUÇÃO:** As informações a seguir descreverão esta pesquisa e o papel que você terá como participante. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a todas as perguntas que você possa ter sobre o estudo. Por favor, leia-o cuidadosamente e não tenha dúvida em perguntar qualquer coisa sobre as informações abaixo.
2. **PROPÓSITO:** Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa clínica cujo objetivo é determinar a presença de microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Candida* na cavidade bucal humana.
3. **DESCRIÇÃO DO ESTUDO:** Serão selecionados 70 indivíduos com faixa etária a partir de 25 a 75 anos.
4. **DESCONFORTO, RISCOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS:** As amostras serão coletadas através de bochechos e o exame clínico ao qual o paciente será submetido não causa trauma, não acarreta dor ou qualquer risco ou custo ao paciente. Por outro lado, oferece elevada possibilidade de gerar conhecimento para a compreensão, diagnóstico, prevenção e alívio desta infecção por fungo que afeta o bem estar dos participantes desta pesquisa e de outros indivíduos.
5. **COMPENSAÇÃO:** Não existem danos imediatos ou futuros previsíveis, decorrentes da pesquisa, e, portanto, a mesma não inclui a possibilidade de indenização.
6. **CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS:** Concordando em participar desta pesquisa, você permite acesso aos dados obtidos durante o estudo aos pesquisadores nele envolvidos, aos membros

do Comitê de Ética responsáveis pela análise deste projeto. Os resultados deste projeto de pesquisa poderão ser apresentados em congressos ou em publicações, porém sua identidade não será divulgada.

- 7. DIREITO DE PARTICIPAR, RECUSAR OU SAIR:** Ao participar, você concorda em cooperar com os procedimentos que serão executados e que foram descritos acima, não abrindo mão dos seus direitos legais ao assinar o termo de consentimento informado. Sua participação neste estudo é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda dos benefícios aos quais tenha direito.
- 8. CONTATOS:** Se ainda houver qualquer dúvida sobre o estudo, você poderá receber mais esclarecimentos falando com:

Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge*
Clélia Aparecida de Paiva Martins
Departamento de Biopatologia e Diagnóstico/ UNESP, Campus de São José dos Campos*
Telefone: 321-8166 ramal 1205
Departamento de Odontologia - UNITAU *
Telefone: 225-4150 ou 225-4140

Anexo C – Consentimento do Colaborador da Pesquisa

Eu, _____
nascido em ____/____/____ na cidade de _____
portador do R.G. nº _____ residente na _____,
desejo participar da pesquisa sobre "Presença de microrganismos dos
gêneros *Staphylococcus* e *Candida* na cavidade bucal humana" e autorizo
a liberação dos dados obtidos neste estudo aos pesquisadores, assim
como sua publicação em revistas científicas especializadas e
apresentação em congresso e jornadas científicas. Declaro que minha
participação é voluntária e que fui devidamente esclarecido sobre os
objetivos deste estudo. Confirmo também que recebi cópia deste termo de
consentimento.

Assinatura - Data: ____/____/____

Anexo D – Ficha Clínica para Pesquisa Científica

PACIENTE Nº _____ DATA _____

NOME _____ SEXO _____
 ENDEREÇO _____ CIDADE _____
 BAIRRO _____ CEP _____ FONE _____
 PROFISSÃO _____ FONE COMERCIAL _____
 ESTADO CIVIL _____ DATA DE NASCIMENTO _____

HISTÓRIA MÉDICA

1 Está ou esteve recentemente sob tratamento médico? sim () não ()

Por qual motivo? _____

2 Está tomando algum medicamento? sim () não () Qual? _____

3 Tomou antibiótico nos últimos 6 meses? sim () não () Qual? _____

4 Já fez radioterapia? sim () não ()

5 Marcar com um x os problemas que tem ou teve:

diabete () hepatite () herpes () problemas de coração () desmaios ()
 hemorragias ()

problemas de coluna () problemas renais () pressão alta () pressão
 baixa () AIDS ()

outros _____

6 Tem alergia a algum medicamento? sim () não () Qual? _____

7 Fuma? não () sim () Quantos cigarros por dia? _____

8 Consome bebidas alcoólicas? sim () não () 9 Usa drogas? sim () não ()

10 Está grávida? não () sim () Quantos
 meses? _____

R.G. _____

Assinatura _____

Anexo E - Meios de Cultura que Foram Utilizados

a) meio quimicamente definido para assimilação de carboidratos:

- sulfato de Amônia (Reagen)	5,0g
- fosfato de potássio básico (Merck)	1,0g
- sulfato de magnésio (Reagen)	0,5g
- ágar (Difco.)	20,0g
- água destilada	1000mL

Após dissolução dos constituintes em banho-maria, o meio foi distribuído (18-20mL) em tubo de ensaio, autoclavado a 121°C/15 minutos e armazenado em geladeira.

b) ágar Sabouraud-dextrose modificado (Polonelli et al.¹¹⁰, 1983):

- peptona (Difco)	10,0g
- glicose (Difco)	20,0g
- ágar (Difco)	20,0g
- água destilada	1000mL

pH = 7,0

Após dissolução dos constituintes em banho-maria, o meio foi distribuído (4mL) em tubo de ensaio, autoclavado a 121°C/15 minutos e armazenado em geladeira.

c) ágar para verificação do fenômeno *killer* (Polonelli et al.¹¹⁰, 1983):

- peptona.(Difco)	10,0g
- dextrose (Difco)	20,0g
- ágar (Difco)	20,0g
- azul de metileno (Labsynth)	30,0mg
- tampão ácido cítrico	1000mL

Tampão ácido cítrico-fosfato

- ácido cítrico.(Merck)	19,20g
- fosfato de potássio bibásico (Sigma).....	34,80g
- água destilada	1000mL

Após dissolução dos constituintes em banho-maria, o meio foi distribuído (18-20mL) em tubo de ensaio, autoclavado a 121°C/15 minutos e armazenado em geladeira.

d) ágar fosfolipase (Price et al.¹¹⁴, 1982)

- peptona (Difco)	10,0g
- glicose (Difco)	20,0g
- cloreto sódio (Merck)	57,3g
- cloreto de cálcio (Difco)	0,55g
- ágar (Difco)	20,0g

Após aquecimento para dissolução dos ingredientes, o meio foi esterilizado em autoclave 121°C/15 minutos. Depois de resfriado a 50°C, adicionaram-se ao mesmo 160mL de emulsão de ovo a 50% (80g de gema homogeneizada com 80mL de solução fisiológica NaCl 0,85%, estéril em frasco com pérolas de vidro esterilizadas).

e) ágar proteinase (Rüchel et al.¹²⁴, 1982)

• meio A

- Yeast Carbon Base (Difco)	11,7g
- albumina bovina fração V (Sigma)	2,0g
- protovit (Roche)	2,5g
- água destilada	100mL

- meio B

- ágar (Difco)	18,0g
- água destilada	100mL

O meio A foi esterilizado por filtração (membrana Millipore de 0,22 μ m) e o meio B foi esterilizado em autoclave a 121°C/15 minutos. Depois de resfriado a 50°C, A foi adicionado ao B, e, após homogeneização, distribuído em placas de Petri esterilizadas.

f) meio para Fermentação de Carboidrato (Forbes et al.³, 1998)

- vermelho de fenol (Difco)	16,0g
- D - trealose (Difco)	10,0g
- ágar	15,0g
- água destilada	1000mL
- pH = 7,4	

Após dissolução dos constituintes em banho-maria, o meio foi distribuído em coluna (15-120mL) em tubo de ensaio, autoclavado a 121°C/15 minutos e armazenado em geladeira.

g) meio para Voges Proskauer (VP)

- peptona (Difco)	7,0g
- dextrose (Difco)	5,0g
- K ₂ HPO ₄ (Sigma)	5,0g
- água destilada	1000mL

pH = 7,0

Após dissolução dos constituintes em banho-maria, o meio foi distribuído (3mL) em tubo de ensaio e autoclavado 121°C/15 minutos e armazenado em geladeira.

h) ágar Baird Parker

- triptone (Difco)	10,0g
- extrato de levedura (Difco)	1,0g
- extrato de carne (Difco)	5,0g
- glicina	12,0g
- piruvato de sódio	10,0g
- cloreto de lítio	5,0g
- ágar	20,0g

pH = 7,0

Após aquecimento para dissolução dos ingredientes, o meio foi esterilizado em autoclave 121°C/15minutos. Depois de resfriado a

50°C, adicionou-se ao mesmo 1% de tellurito de potássio (filtrar em membrana millipore de 0,22 μ m) e 5% de emulsão de ovo.

Anexo F – Tabelas com Resultados Parciais Individuais Obtidos

Tabela 8 - Correlação entre o logaritmo das unidades formadoras de colônia de *Candida* e *Staphylococcus* isoladas das cavidade bucal através do enxágüe bucal (continua)

Paciente nº	Log <i>Candida</i>	Log <i>Staphylococcus</i>
2	0.00000	1.92428
4	2.08636	0.69897
5	2.66558	0.30103
6	1.00000	1.66276
7	0.30103	0.95424
11	0.00000	1.60206
12	1.95904	1.69020
13	0.77815	1.23045
14	0.00000	2.68395
17	3.08279	2.67394
18	1.78533	0.69897
19	2.06819	2.71349
20	2.23553	2.47712
23	2.45939	1.89763
24	1.49136	2.82217
25	1.27875	2.20140
29	1.63347	2.14613
31	1.39794	2.71933
32	1.86923	1.38021
33	2.91803	1.97772
35	0.95424	0.47712
36	0.00000	2.15836
37	1.46240	2.02938
39	0.60206	2.50379
40	0.84510	2.55145
42	2.03342	2.43933
43	1.61278	2.41830
44	2.88986	1.39794
45	0.47712	1.84510
46	0.95424	0.47712
47	0.30103	1.38021
48	1.14613	1.07918
49	0.47712	1.68124
50	0.60206	0.47712
53	0.30103	1.99564
54	1.92942	2.60206

Tabela 8 - Correlação entre o logaritmo das unidades formadoras de colônia de *Candida* e *Staphylococcus* isoladas das cavidade bucal através do enxágüe bucal (conclusão)

Paciente nº	Log <i>Candida</i>	Log <i>Staphylococcus</i>
59	1.77085	2.02938
60	1.79934	2.03342
64	0.60206	1.34242
65	0.47712	1.79239
67	1.77085	2.10037

Tabela 9 - Correlação entre o logaritmo das unidades formadoras de colônia de *Candida* e *Staphylococcus* e as respectivas espécies identificadas, isoladas da cavidade bucal através de enxágüe bucal (continua)

Paciente nº	<i>Candida</i> Log/UFC	Espécie	<i>Staphylococcus</i> Log/UFC	Espécie
1	-	-	0,00000	Coagulase-negativo
2	0,00000	<i>C. albicans</i>	1,92428	<i>S. hyicus</i>
3	-	-	1,79239	Coagulase-negativo
4	2,08636	<i>C. albicans</i>	0,69897	<i>S. hyicus</i>
5	2,66558	<i>C. albicans</i>	0,30103	<i>S. aureus</i>
6	1000000	<i>C. albicans</i>	1,66276	<i>S. aureus</i>
7	0,30102	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>	0,95424	<i>S. aureus</i>
8	-	-	1,76342	<i>S. hyicus</i>
9	-	-	-	-
10	-	-	1,07918	<i>S. hyicus</i>
11	0,00000	<i>C. tropicalis</i>	1,60206	<i>S. hyicus</i>
12	1,95904	<i>C. albicans</i>	1,69020	<i>S. hyicus</i>
13	0,77815	<i>Candida</i> spp	1,23045	<i>S. hyicus</i>
14	0,00000	<i>Candida</i> spp	2,68395	<i>S. aureus</i>
15	-	-	0,60205	<i>S. schleiferi</i>
16	-	-	1,11394	Coagulase-negativo
17	3,08279	<i>C. albicans</i> <i>Candida</i> spp.	2,67394	Coagulase-negativo
18	1,78533	<i>C. albicans</i>	0,69897	Coagulase-negativo
19	2,06819	<i>C. albicans</i>	2,71349	<i>S. aureus</i>
20	2,23553	<i>C. albicans</i>	2,47712	<i>S. hyicus</i>
21	-	-	1,07918	Coagulase-negativo
22	-	-	1,25527	Coagulase-negativo
23	2,45939	<i>C. tropicalis</i>	1,89763	Coagulase-negativo
24	1,49136	<i>C. albicans</i>	2,82217	Coagulase-negativo
25	1,27875	<i>C. albicans</i>	2,20140	Coagulase-negativo
26	-	-	2,71516	Coagulase-negativo
27	-	-	2,22530	Coagulase-negativo
28	-	-	2,64738	Coagulase-negativo
29	1,63347	<i>C. albicans</i> <i>Candida</i> spp	2,14613	Coagulase-negativo

Tabela 9 - Correlação entre o logaritmo das unidades formadoras de colônia de *Candida* e *Staphylococcus* e as respectivas espécies identificadas, isoladas da cavidade bucal através de enxágüe bucal (continua)

Paciente nº	<i>Candida</i> Log/UFC	Espécie	<i>Staphylococcus</i> Log/UFC	Espécie
30	-	-	2,72345	Coagulase-negativo
31	1,39794	<i>C.albicans</i>	2,71933	Coagulase-negativo
32	1,86923	<i>C.albicans</i>	1,38021	Coagulase-negativo
33	2,91803	<i>C.albicans</i>	1,97772	<i>S.aureus</i>
34	-	-	2,23804	<i>S. schleiferi</i>
35	0,95424	<i>C.albicans</i>	0,47712	Coagulase-negativo
36	0,00000	<i>C.albicans</i>	2,15836	Coagulase-negativo
37	1,46240	<i>C.albicans</i>	2,02938	Coagulase-negativo
38	-	-	2,06069	Coagulase-negativo
39	0,60206	<i>C.tropicalis</i>	2,50379	Coagulase-negativo
40	0,84510	<i>C.albicans</i>	2,55145	Coagulase-negativo
41	-	-	2,04139	Coagulase-negativo
42	2,03342	<i>C.albicans</i> <i>C.tropicalis</i>	2,43933	<i>S.schleiferi</i>
43	1,61278	<i>C.tropicalis</i>	2,41830	Coagulase-negativo
44	2,88986	<i>C.albicans</i>	1,39794	<i>S.aureus</i>
45	0,47712	<i>C.tropicalis</i>	1,84510	<i>S.aureus</i>
46	0,95424	<i>C.albicans</i>	0,47712	Coagulase-negativo
47	0,30103	<i>C.tropicalis</i>	1,38021	Coagulase-negativo
48	1,14613	<i>C.albicans</i>	1,07918	Coagulase-negativo
49	0,47712	<i>C.tropicalis</i>	1,68124	Coagulase-negativo
50	0,60206	<i>C.albicans</i>	0,47712	Coagulase-negativo
51	-	-	1,41497	<i>S. hyicus</i>
52	-	-	1,80617	Coagulase-negativo
53	0,30103	<i>Candida</i> spp.	1,99564	<i>S.aureus</i>
54	1,92942	<i>C.albicans</i>	2,60206	Coagulase-negativo
55	-	-	0,90308	Coagulase-negativo
56	-	-	1,50514	Coagulase-negativo
57	-	-	1,57978	Coagulase-negativo
58	-	-	2,48995	Coagulase- negativo
59	1,77085	<i>C.tropicalis</i> <i>C.kefyr</i> <i>C.glabrata</i>	2,02938	<i>S. schleiferi</i>
60	1,79934	<i>C.albicans</i>	2,03342	Coagulase-negativo
61	-	-	1,93951	Coagulase-negativo

Tabela 9 - Correlação entre o logaritmo das unidades formadoras de colônia de *Candida* e *Staphylococcus* e as respectivas espécies identificadas, isoladas da cavidade bucal através de enxágüe bucal (conclusão)

Paciente nº	<i>Candida</i> Log/UFC	Espécie	<i>Staphylococcus</i> Log/UFC	Espécie
62	-	-	1,99563	<i>S. hyicus</i>
63	0,47712	<i>C.albicans</i> <i>C.tropicalis</i> <i>C.glabrata</i>		
64	0,60206	<i>C.albicans</i>	1,34242	Coagulase-negativo
65	0,47712	<i>C.albicans</i>	1,79239	Coagulase-negativo
66	-	-	2,02118	
67	1,77085	<i>C.albicans</i>	2,10037	Coagulase-negativo
68	-	-	1,20411	<i>S.hyicus</i>

MARTINS, C.A.P. *The presence of microrganisms of the genus Staphylococci and Candida in the human oral cavity*. 2001. 124f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

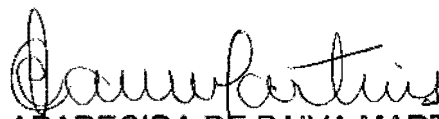
ABSTRACT

The presence of Candida genus yeasts and staphylococci in the human oral cavity is very important because they can act as supplementary microbiota and in certain situations can cause oral or systemic diseases. The aim of this study was to correlate the presence of Candida genus yeasts and species of staphylococci in the human oral cavity. Oral rinsings were collected from 70 people and the cultured in Sabouraud glucose agar with chloramphenicol and Baird-Parker ágar. After the incubation period, the microrganisms were isolated and identified through biochemical tests. The Candida genus yeasts were found in 71,42% of the examined people, and C.albicans were isolated from 92,85% of the oral cavities. Forty-one Staphylococcus negative for coagulase (63%) were found. Among the Staphylococcus samples positive for coagulase nine were S.aureus, 11 S.hyicus and four S.schleiferi subspecies coagulans. There was no correlation between the quantities (cfu) of Candida and staphylococci isolated from the oral rinsings of the examined people.

KEY WORDS: *Staphylococcus; Candida; phospholipase; proteinase; killer factor; oral cavity.*

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho

São José dos Campos, 13 de agosto de 2001.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Clélia Martins', written in a cursive style.

CLÉLIA APARECIDA DE PAIVA MARTINS