

## DIFERENTES MÉTODOS FENOTÍPICOS PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE CANDIDA

Different phenotypic methods for isolation and identification of Candida species

Denise Madalena Palomari **SPOLIDORIO\***, Marcelo Fabiano Gomes **BORIOLLO\*\***, Carlos **ESTRELA\*\*\***, Luís Carlos **SPOLIDORIO\***

\* Professores Adjunto do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP – Brasil

\*\* Professor Doutor Universidade José do Rosário Vellano –Alfenas – MG

\*\*\* Professor Titular da Universidade Federal de Goiás – UFG

### Endereço para correspondência:

Rua Humaitá, 1680

CEP 14801-903 – Araraquara – SP

dmps@foar.unesp.br

Fone: (16) 3301-6402

Fax (16) 3301-6488

### RELEVÂNCIA CLÍNICA

Métodos fenotípicos para identificação de *Candida* spp. permitem discriminar rotineiramente isolados orais em laboratórios de microbiologia. Um dos problemas que interferem na realização de identificação das espécies do gênero *Candida* em estudos epidemiológicos mais amplos é a dificuldade da rápida identificação, a partir de meios de triagem de baixo custo. A *C. albicans* é um agente responsável pela candidíase e está também associada a doenças imunossupressoras. Outras espécies não-*albicans* como *C. dubliniensis* inicialmente associada com candidíase da orofaringe de pacientes infectados pelo vírus HIV, onde ainda é mais prevalente, tem sido reconhecida como causa de infecção em pacientes com câncer, com fibrose cística e pacientes com diversas patologias e diferentes graus de imunocomprometimento. Assim, estudou-se os principais métodos fenotípicos e sistemas comerciais para identificação de espécies de *Candida*.

### RESUMO

*C. albicans* é o mais frequente agente responsável pela candidíase e está também associada a doenças imunossupressoras como, por exemplo, diabetes. Entretanto, outras espécies não-*albicans* como *C. dubliniensis* inicialmente associada com candidíase da orofaringe de pacientes infectados pelo vírus HIV, onde ainda é mais prevalente, tem sido reconhecida como causa de infecção em pacientes com câncer, com fibrose cística e pacientes com diversas patologias e diferentes graus de imunocomprometimento. Utilizando-se métodos fenotípicos para identificação de *Candida* spp. é possível discriminar rotineiramente isolados orais em laboratórios de microbiologia. Um dos problemas que interferem na realização de identificação das espécies do gênero *Candida* em estudos epidemiológicos mais amplos é a dificuldade da rápida identificação, a partir de meios de triagem de baixo custo. Dessa forma, alguns métodos fenotípicos são apresentados com o objetivo de contribuir na busca de testes alternativos que possam com segurança, serem aplicados às rotinas de laboratórios.

**Palavras-chave:** Métodos fenotípicos, *Candida* spp., identificação

**SUMMARY**

*C. albicans* is the frequent agent for the oral candidosis and it is also associated to immunosuppressive diseases as, for example, diabetes. However, other non-*albicans* species such as *C. dubliniensis* initially associated with candidosis in orofaringe patients infected by the virus HIV, where is still more prevalent, it has been recognized as infection cause in patients with cancer, cystic fibrosis and patients with several pathologies. Phenotypics methods for *Candida* spp. are easy-to-use procedures for routine discrimination of oral isolates in the clinical microbiology laboratory. One of the problems that interfere in the identification accomplishment of the species of *Candida* in more wide epidemic studies is the difficulty of the fast identification, starting from screen methods of low cost. In that way, some phenotypics methods are presented with the objective of contributing in the search of alternative tests to be applied as routine in laboratories.

Key-words: Phenotypic methods, *Candida* spp., identification

**INTRODUÇÃO**

A classificação e taxonomia de fungos com relevante importância médica e odontológica é uma progressiva área de pesquisa. A identificação e classificação inicial dos fungos foram baseadas primariamente na estrutura e características de reprodução. Uma nova proposta de classificação<sup>1</sup> baseou-se principalmente no tecido e sítio do corpo onde ocorreu a invasão. Os fungos causam amplo espectro de doenças, originando pequenas infecções de pele e mucosas até o envolvimento sistêmico de órgãos internos.

A importância das infecções por fungos, particularmente o gênero *Candida*, têm estimulado estudos objetivando a compreensão da patogênese, genética, epidemiologia e bioquímica das doenças e principalmente a interdisciplinaridade dos conteúdos envolvendo esses microrganismos.

Dentro do gênero *Candida*, algumas espécies são de maior importância médica e odontológica, sendo a *C. albicans* a mais frequentemente isolada, acreditando-se também ser a mais virulenta para o ser humano<sup>2-4</sup>. As demais espécies de *Candida* encontradas nas infecções humanas são *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. guilliermondii*. Essas espécies, exceto *C. albicans*, estão presentes em pequeno número na microbiota bucal de pacientes não imunocomprometidos, sendo que a presença destas não é necessariamente indicativa da doença<sup>5</sup>. Dentre essas, *C. dubliniensis* foi primariamente associada com candidíase oral<sup>6</sup> em pacientes infectados por HIV<sup>7,8</sup> e em pacientes diabéticos<sup>9</sup>.

A ocorrência de *Candida* spp. na cavidade bucal, estabelece-se sob forma comensal e constitui parte da microbiota bucal normal. As razões para o estabelecimento de infecções são fatores predisponentes, tais como: queda de imunidade

do hospedeiro, desordens endócrinas, lesões em mucosa, higiene oral deficiente, tratamento prolongado com antibióticos e corticosteróides<sup>10,11,12</sup>. *Candida* spp. encontradas em pacientes sadios comportam-se como oportunistas. A presença de *Candida* e a não existência de patologia associada à ela, têm sido pesquisado. Allen (1992)<sup>13</sup> considera que, para muitos pacientes, o próprio sistema imune e a competição com as demais bactérias bucais mantêm o fungo sob controle, e qualquer alteração neste equilíbrio resultaria em candidíase. *Candida* spp. pode se proliferar e produzir candidíase clínica quando houver comprometimento imunológico, causado por vários fatores como leucemia, uso excessivo de corticosteróide, diabetes mellitus ou infecção por HIV.

A frequência por infecções severas entre pacientes imunocomprometidos ou hospitalizados encorajam a otimização de métodos de identificação, permitindo dessa forma, maior conhecimento deste patógeno e a administração efetiva de terapias antifúngicas.

Muitas características fenotípicas das leveduras são frequentemente utilizadas em laboratório para a identificação destes organismos ao nível de espécies e subespécies. O perfil bioquímico e enzimático, fermentativo e metabólico dos microrganismos são bastante estudados e aplicados para diferentes finalidades em diferentes áreas de pesquisa<sup>14-18</sup>.

Os métodos fenotípicos comumente empregados em laboratórios para caracterização de leveduras tem como base principal análise do perfil morfológico e bioquímico destes organismos<sup>19,20</sup>. A observação de estruturas microscópicas, os testes de avaliação da atividade enzimática e da capacidade de assimilação e fermentação de substratos,

compõem um conjunto de métodos, com as quais pode-se identificar uma espécie, definir o comportamento da mesma em diferentes condições e assim definir as diversas características de uma levedura<sup>21</sup>.

Dessa forma, os métodos de identificação fenotípicos são efetivos para a rotina de identificação de isolados de espécies de *Candida* em laboratórios<sup>2</sup> e a escolha de um deles é determinada pelo nível de identificação requerida, número total de amostras examinadas e recursos disponíveis no laboratório<sup>22</sup>. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi apresentar os principais métodos fenotípicos e sistemas comerciais para identificação de espécies de *Candida*.

## MÉTODOS FENOTÍPICOS

### Crescimento em Ágar

Na literatura há ampla variedade de métodos utilizados para a detecção de *Candida* spp. Cada método apresenta vantagens e desvantagens, sendo a escolha da técnica de amostragem baseada principalmente na natureza da lesão a ser investigada<sup>22</sup>.

O meio de cultura mais utilizado para isolamento de *Candida*, é o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (SDA)<sup>23</sup> suplementado com clo-ranfenicol<sup>24</sup> e as colônias da maioria das espécies, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. stellatoidea*, *C. dubliniensis* e *C. guilliermondii* apresentam coloração branca ou branco-amarelada, forma convexa, aparência lisa e brilhante, úmidas e cremosas, com odor característico<sup>22</sup>. A diferenciação entre as espécies neste meio de cultura raramente é possível, dessa maneira, é recomendado que seja utilizado, juntamente com este, um outro meio diferencial, que pode incluir o ágar Pagano-Levin<sup>25</sup> ou meios cromogênicos comercialmente disponíveis<sup>26</sup>.

O meio agar Pagano-Levin (PL) possui em sua composição solução de TTC (2,3,5-cloreto de tetrazólio) a 1% e neomicina para isolar e diferenciar *Candida* e foi descrito por Pagano et al. (1958)<sup>27</sup>. *Candida* spp. reduz o meio para produzir colônias com várias colorações e a neomicina é adicionada ao meio para inibir o crescimento de bactérias. *C. albicans* apresenta reduzida pigmentação em agar PL.

Outro método diferencial para espécies de *Candida* é o método albicans ID (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e Fluoroplate (Merck, Darmstadt, Alemanha) que incluem plaqueamento da amostra clínica sobre o meio sólido<sup>28</sup>. Estes meios contêm respectivamente um substrato cromogêni-

co e fluorogênico que é hidrolizado por enzimas específicas que permite a identificação macroscópica de *Candida* spp. baseado na coloração ou fluorescência das colônias<sup>28-33</sup>.

O método albicans ID inclui substrato cromogênico que sob ação da hexosaminidase produzida por *C. albicans* resulta em colônias azuladas.

Os meios cromogênicos comercialmente disponíveis podem ser utilizados para diferenciação das espécies de leveduras. Dentre eles, o meio CHROMagar® *Candida* (CHROMagar, Paris, França) ocorre com base no contraste da cor das colônias, produzidas por reações de enzimas espécie-específica com substrato cromogênico<sup>22</sup>. O uso do meio CHROMagar® *Candida* é vantajoso pois facilita a detecção de espécies de leveduras de diferentes amostras em uma única placa. Este meio diferencial tem sido avaliado em vários estudos quanto à sua utilidade na identificação de leveduras, sendo eficaz na identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* pela morfologia e cor da reação, podendo apresentar colônias características, verde claro, azul escuro e rosa, respectivamente<sup>34,35</sup>. Isolados de *C. dubliniensis* apresentam colônias características verde escuro quando cultivadas neste meio<sup>6,36</sup>.

Beighton et al. (1995)<sup>34</sup> avaliando amostras coletadas da cavidade bucal, identificaram 450 colônias de coloração verde utilizando CHROMagar *Candida*. As mesmas amostras também foram testadas para atividade  $\square$ -N-acetilgalactosaminidase (enzima produzida pela *C. albicans*) e todas foram positivas, confirmando que o CHROMagar *Candida* é preciso na identificação de *C. albicans*. Entretanto, o CHROMagar *Candida* não é um substituto para os outros testes bioquímicos.

O método de diferenciação *Candida* ID (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) baseia-se na utilização de meio cromogênico diferencial para identificação direta de *C. albicans*, que produzem colônias verde-azuladas em contraste com colônias rosas produzidas por *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. kefyr*<sup>33</sup>.

Após 48 horas de incubação, aparece colônia verde escuras, que pode ser indicativo da presença de *C. dubliniensis*, mas este não deve ser um critério único de identificação dessa espécie.

### Testes de Assimilação de Carboidratos

O perfil de assimilação de carboidratos para *Candida* spp. pode ser obtido por observação da zona de crescimento ao redor de discos impregnados com vários açúcares como galactose, glicose, sacarose, maltose, lactose, xilose, trealose entre outros, sobre meio sólido.

Vários testes comerciais de identificação dependem de procedimentos de adaptações da assimilação de carboidratos e foram desenvolvidos para identificação de *Candida* spp.<sup>30,37</sup>.

O sistema API 20C (BioMérieux) foi considerado um método eficaz para identificação de leveduras, após 72 h de incubação<sup>38-40</sup>. Entretanto, o sistema API 20C foi substituído pelo API 20C AUX e API 32C, que incluem assimilação de carboidratos específicos para *C. dubliniensis*<sup>40,41</sup>.

O sistema de identificação Vitek Yeast Biochemical Card (YBC) (BioMérieux) e o Vitek 2 ID-YST são os sistemas mais utilizados em laboratórios que processam grandes números de amostras<sup>22</sup>. A identificação correta utilizando-se esse sistema é similar a outros sistemas comerciais e sua capacidade de identificação pode ser aumentada se as características morfológicas forem avaliadas conjuntamente<sup>39,42,43</sup>.

O sistema RapID yeast Plus (Innovative Diagnostic Systems, Norcross, GA, USA) é um micrométodo qualitativo que usa substrato convencional e cromogênico para identificação de leveduras<sup>44</sup>. Este método é efetivo e após 4 h é possível a identificação de espécies de *Candida*<sup>38,39,45</sup>.

### Testes de Produção de Tubo Germinativo e Clamidósporos

A associação das características morfológicas e bioquímicas pode ser utilizada para identificação das espécies de *Candida*<sup>20</sup>. A formação de tubo germinativo é um fenômeno que ocorre em algumas espécies do gênero *Candida* e reflete a capacidade da cepa de filantar em determinadas condições.

O teste de produção do tubo germinativo é rápido, simples, econômico e padrão para identificar *C. albicans* (95-97%), envolvendo a indução de crescimento de hifas (tubos germinativos) de leveduras cultivadas em soro por 2-4 horas a 37°C<sup>14</sup>.

Para a realização da produção de clamidósporos, utiliza-se meio Agar Corn Meal (Agar fubá com Tween 80) para identificação das estruturas características de clamidósporo, hifas e pseudohifas comuns à espécie *C. albicans*<sup>6</sup> ou meio Agar caseína<sup>46</sup>.

Similarmente, *C. albicans* e *C. dubliniensis* são capazes de produzir clamidósporos, embora *C. albicans* frequentemente desenvolve arranjos de clamidósporos em pares ou múltiplos aderidos lateralmente às pseudo-hifas<sup>47</sup>.

### Temperatura de crescimento - Prova de Termotolerância

A maioria das leveduras cresce bem em temperaturas entre 30 e 37°C, quando cultivadas em meios de cultura artificiais. Entre as espécies do gênero *Candida*, as temperaturas de incubação que permitem crescimento satisfatório podem variar entre 20°C e 38°C<sup>23</sup>. A capacidade de crescimento em temperaturas elevadas é característica de algumas espécies, sendo uma das provas utilizadas para diferenciação entre *C. dubliniensis* e *C. albicans*, as quais compartilham diversas características morfológicas e fisiológicas, o que dificulta a identificação diferencial entre ambas<sup>6</sup>.

*C. dubliniensis* usualmente é encontrada em associação com outras espécies de *Candida*, especialmente *albicans*<sup>48</sup>, podendo também ser encontrada na microbiota bucal de pacientes clinicamente saudáveis<sup>49</sup>. A relação fenotípica e genotípica existente entre *C. dubliniensis* e *C. albicans* identificou incorretamente muitos isolados de *C. dubliniensis* como *C. albicans*. Dessa maneira a prova de termotolerância utilizando temperatura de crescimento (42°C a 45°C por 48 horas) associada com testes de assimilação é um método eficaz para diferenciar isolados de espécies de *Candida*<sup>41,50</sup>. Foi demonstrado que *C. dubliniensis* é sensível a elevadas temperaturas e não é capaz de crescer quando incubada entre 42°C a 45°C<sup>51</sup>. Esta tem sido, portanto, uma prova útil para identificação presuntiva desta espécie, embora seja um teste que requer provas complementares, devido à existência de algumas cepas de *C. albicans* que podem apresentar comportamento semelhante.

### Meio Sabouraud Hipertônico

Para a identificação presuntiva de *C. dubliniensis*, Alves et al. (2002)<sup>52</sup> relataram a utilização do teste baseado na incapacidade dessa espécie crescer em caldo Sabouraud suplementado com 6.5% de cloreto de sódio e incubados por 96 horas. As amostras que não crescem sob esta condição são consideradas *C. dubliniensis*.

### Teste de Identificação em Microplaca

O método GP2 microplate (Biolog – Hayward, CA, USA) é um método desenvolvido para identificação e caracterização de microrganismos em placas de microtitulação para uma grande variedade de bactérias e leveduras, incluindo o gênero *Candida*. Este sistema determina a habilidade dos microrganismos em usar ou oxidar componentes originados do carbono<sup>53</sup> e é baseado na redução do tetrazólio durante o processo de metabolismo (respiração).



O Biolog GP2 MicroPlate executa 95 testes simultaneamente e dá um padrão de reação característico chamado "impressão digital metabólica." Os padrões de impressão digital metabólicos são comparados e identificados usando o MicroLog™ database software.

### Instrumentos básicos de proporção

Espectrometria de pirólise de massa envolve a degradação térmica de material complexo, como bactérias ou fungos, para produzir fragmentos menores, voláteis chamados pirolisados.

A espectrometria de massa pode também ser utilizada para separar os componentes pirolisados baseado em sua proporção de massa e carga que pode ser utilizado como uma impressão química do material analisado. Esta técnica mostrou ser capaz de identificar as espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea*<sup>54</sup>.

A análise de ácido graxo celular por cromatografia de gás-líquido (GLC) foi descrito como um método para discriminar *Candida*<sup>55</sup>. Sherlock Microbial Identification System (MIS; MIDI, Inc. Newark, DE, USA)<sup>56</sup> foi capaz de distinguir *C. albicans* e *C. dubliniensis* utilizando GLC.

### Microscopia confocal

Um passo importante na trajetória da microscopia e identificação de organismos foi a introdução da microscopia digital de alta resolução, que inclui o microscópio confocal por varredura laser que, associada ao emprego de compostos químicos denominados fluoróforos, levou a grandes avanços na pesquisa de organismos vivos. Essa combinação de princípios da óptica e da físico-química tornou finalmente possível "olhar de perto" variados tipos de células vivas e medir fenômenos biológicos em tempo e espaço reais. Assim, ampliou-se rapidamente, em áreas diferentes da biologia, como biofísica, bioquímica, biologia celular, microbiologia, fisiologia, farmacologia e outras, o conhecimento de elementos e organismos fundamentais.

O microscópio confocal de fluorescência por varredura laser, referido apenas como confocal, utiliza a fluorescência para a aquisição das imagens. A fluorescência é um tipo de luminescência (emissão de luz) em que um corpo absorve luz e após um curto intervalo de tempo re-emite essa luz. Esse é o princípio da microscopia de fluorescência, na qual compostos químicos chamados fluoróforos são usados para produzir a fluorescência do material em estudo. O uso dos fluoróforos em

biologia, por exemplo, acontece quando se quer localizar uma área específica da amostra (como uma proteína, por exemplo) ou para responder a um estímulo específico. A técnica de microscopia de fluorescência consiste justamente em captar este fóton que é emitido e com ele gerar uma imagem.

O sistema conhecido como microscopia confocal utiliza uma fonte de laser para promover a excitação dos fluoróforos. Através de um conjunto de lentes o microscópio é capaz de focar um cone de luz laser em uma profundidade predeterminada da amostra a ser estudada. Mudando-se o ponto focal (mantida a profundidade) é possível iluminar todo o plano em estudo, ponto a ponto.

Dessa maneira, Lamfon et al. (2003)<sup>57</sup> investigaram a habilidade de *Candida* formar biofilme sobre esmalte, dentina e em várias superfícies rugosas e as imagens utilizadas através de microscopia confocal revelaram a estrutura do biofilme maduro. Malic et al. (2007)<sup>58</sup> examinando invasão do epitélio oral por *Candida*, através de microscopia confocal, observou diferentes superfícies de colonização bem como morfologia, extensão e padrão de penetração no tecido. Dessa maneira, esta técnica tem sido uma ferramenta importante de identificação do gênero *Candida* em tecidos e superfícies de materiais.

### Espectroscopia Raman

A técnica de espectroscopia Raman comporta-se como uma ferramenta para análise de materiais biológicos e consiste em um processo que ocorre quando uma amostra é iluminada por uma fonte de luz monocromática, como um feixe de laser. Resumidamente, a energia dos fótons incidentes é transferida para as moléculas da amostra, excitando-as a modos vibracionais elevados. Fótons espalhados possuem uma frequência mais baixa do que os fótons incidentes devido à energia de transferência<sup>59</sup>. Assim, os fótons incidentes em uma amostra transferem energia de modo vibracional molecular. Nesse processo, a absorção simultânea do fóton incidente é acompanhada pela emissão do fóton Raman com um desvio no comprimento de onda correspondente a diferença no nível de energia vibracional presente na molécula<sup>60</sup>.

A principal vantagem do emprego da espectroscopia Raman é o fato desta técnica permitir que o procedimento de análise seja realizado em tempo real, proporcionando resultados mais precisos com baixo custo, sem que seja necessária a extração de tecido, so de corantes ou marcadores e outros agentes de contraste<sup>61</sup>.

A identificação rápida de microrganismos patogênicos representa um assunto de grande interesse para microbiologistas e médicos, já que a maioria dos sistemas disponíveis para a identificação microbiana baseia-se em provas bioquímicas, morfológicas e fisiológicas e tais procedimentos são demorados.

Técnicas espectroscópicas tem sido aplicadas para a identificação microbiana, tais como a espectroscopia de fluorescência<sup>62</sup>. Neste contexto, métodos baseados em espectroscopia Raman e espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) têm sido consideradas como procedimentos de análise adequados para aplicação de rotina em laboratórios<sup>63-66</sup>. Técnicas de espectroscopia vibracional requerem uma manipulação mínima da amostra, não envolvem consumo de reagentes e são adequadas a automação, pois podem ser utilizadas por pessoas não especializadas. Além disso, um inóculo muito pequeno é suficiente e o tempo gasto na identificação pode ser significativamente reduzido em comparação com as metodologias convencionais. Dentro de seis a oito horas após a inoculação em meio sólido, a maioria dos patógenos forma microcolônias que podem ser identificadas por espectroscopia Raman<sup>65,67</sup>.

De Gussem et al. (2007)<sup>68</sup>, demonstraram que a espectroscopia Raman representa uma ferramenta acessível para diversos profissionais apesar de não substituir as provas clássicas de identificação. Além disso, a identificação de leveduras também tem sido realizada empregando técnicas de espectroscopia vibracional. Maquelin et al. (2002)<sup>67</sup> desenvolveram um método para a identificação de espécies de *Candida* por micro-espectroscopia Raman Confocal. De forma semelhante, Ibelling et al. (2005)<sup>69</sup> empregaram a micro-espectroscopia Raman para identificar *Candida* spp. em pacientes com peritonite e Rösch et al. (2005)<sup>66</sup> estudaram a variação intracelular e a identificação de uma única célula de levedura utilizando esta tecnologia. Entretanto, não há na literatura relatos mais detalhados sobre a identificação de *Candida* utilizando-se esse método com ênfase à amostras isoladas da cavidade bucal.

Dessa forma, a identificação da espécie como rotina de laboratório é essencial para o entendimento da patogênese de doenças bucais e a um maior conhecimento sobre a forma de contaminação e reservatórios de infecção e reinfecção em diversos sítios da cavidade bucal.

## CONCLUSÕES

Todos os métodos anteriormente descritos

são baseados em características fenotípicas de cada espécie e podem estar sujeitos à variação na expressão dessas, induzindo identificação incorreta. A utilização de apenas um teste não é altamente efetivo para identificação de espécies de *Candida*, devendo serem utilizados métodos fenotípicos combinados para melhor identificação do gênero.

## REFERÊNCIAS

1. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Review. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(2): 332-70.
2. Hannula J. Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal yeast species and stability of colonization in young children. Oral Microbiol Immunol. 1999;14(3): 176-182.
3. Hube B. Infection-associated genes of *Candida albicans*. Fut Microbiol. 2006; 1: 209-18.
4. McCullough M, Jaber M, Barrett AW et al. Oral Yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasia. Oral Oncol. 2002; 38: 391-393.
5. Samaranayake LP, Mac Farlane T W. Oral candidosis. London: Wright, 1990.
6. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. J Clin Microbiol. 1998; 36(2): 329-334.
7. Gugnani HC, Becker K, Fegeler W et al. Oropharyngeal carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in India. Mycos. 2003; 46(8): 299-306.
8. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. FEMS Yeast Res. 2004; 4: 369-376.
9. Gonçalves RH, Miranda ET, Zaia JE et al. Species diversity of yeast in oral colonization of insulin-treated diabetes mellitus patients. Mycopathol. 2006; 162(2): 83-9.
10. Raj PA, Rajkumar L, Dentino AR. Novel molecules for intra-oral delivery of antimicrobials to prevent and treat oral infectious diseases. Biochem J. 2007; 8.

11. Samaranayake LP, Cheung LK, Saramanayake YH. Candidiasis and other fungal diseases of the mouth. *Dermatol Ther.* 2002; 15(3): 251-269.
12. Vitkov L, Weitgasser R, Lugstein A et al. Glycaemic disorders in denture stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 1999; 28(9): 406-409.
13. Allen CM. Diagnosing e managing oral candidosis. *J Am Dent Assoc.* 1992; 123(1):77-78.
14. De Carvalho FG, Silva DS, Spolidorio DMP et al. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries *Arch Oral Biol.* 2006; 51(11): 1024-8.
15. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(1): 122-43.
16. Pinto TM, Neves AC, Leão MV, Jorge AO. Vinegar as an antimicrobial agent for control of *Candida* spp. in complete denture wearers. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16(6): 385-90.
17. Suga M, Isobe M, Hatakeyama T. Cryopreservation of competent intact yeast cells for efficient electroporation. *Yeast.* 2000; 16: 889-96.
18. Takagi H, Iwamoto F, Nakamor, S. Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from praline-analogue-resistant mutants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997; 47: 405-11.
19. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol.* 2001; 39: 9-33.
20. Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing yeast isolates. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48(1): 27-36.
21. Jones JM Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Microbiol Rev.* 1990; 3: 32-45.
22. Williams DW, Lewis MAO. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis.* 2000; 6: 3-11.
23. Odds FC, Bernaerts R CHROMagar *Candida*: a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(8): 1923-1929.
24. Liguori G, Di Onofrio V, Lucariello A et al. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(1): 76-8.
25. Silva JO, Franceschini SA, Lavrador MAS et al. Performance of Selective and Differential Media in the Primary Isolation of Yeasts from Different Biological Samples. *Mycopathol.* 2004; 157(1): 29-36.
26. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *C. glabrata*. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(1): 58-61.
27. Pagano J, Levin JD, Trejo W. Diagnostic medium for differentiation of species of *Candida*. *Antibiotics Annu.* 1958; 1957-1958: 137-143.
28. Contreras I, San-Milán R, Agustín-Barrasa A et al. Utility of Albicans ID plate for rapid identification of *C. albicans* in clinical samples. Rapid identification of *C. albicans*. *Micopathol.* 1996; 136: 17-20.
29. Anson JJ, Allen KD. Evaluation of CHROMagar *Candida* medium for the isolation and direct identification of yeast species from the female genital tract. *Br J Biomed Sci.* 1997; 54(4): 237-9.
30. Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR et al. Rapid identification of *C. dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J Clin Microbiol.* 1999; 7(11): 3533-9.
31. Rousselle P, Freydiere AM, Couillerot PJ et al. Rapid Identification of *Candida albicans* by Using Albicans ID and Fluoroplate Agar Plates. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(12): 3034-36.

32. Velegraki A, Logotheti M. Presumptive identification of an emerging yeast pathogen: *Candida dubliniensis* (sp. nov.) reduces 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998; 20(3): 239-41. *Clin Microbiol.* 2003; 41: 1259-1262.
33. Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B et al. Performance of *Candida* ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to *CHROMagar Candida*. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(10): 3793-5.
34. Bighton D, Ludford R, Clark D T et al. Use of *CHROMagar Candida* medium for isolation of yeast from dental samples. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(11): 3025-3027.
35. Willinger B, Manafi M. Evaluation of *CHROMagar Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. *Mycoses.* 1999; 42: 61-5.
36. Tintelnot K, Haase G, Seibold M et al. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1599-608.
37. Xu J, Millar BC, Moore JE et al. Comparison of *API20C* with molecular identification of *Candida* spp. isolated infections. *J Clin Pathol.* 2002; 55(10):774-7.
38. Espinel-Ingroff A, Stockman L, Roberts G et al. Comparison of *RapID yeast plus* system with *API 20C* system for identification of common, new, and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(4): 883-6.
39. Liguori G, Di Onofrio V, Lucariello A et al. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(1): 76-8.
40. Zaremba ML, Daniluk T, Rozkiewicz D et al. Incidence rate of *Candida* species in the oral cavity of middle-aged and elderly subjects. *Adv Med Sci.* 2006; 51: 233-6.
41. Sancak B, Rex JH, Paetznick V et al. Evaluation of a method for identification of *Candida dubliniensis* bloodstream isolates. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(1): 489-91.
42. Graf B, Adam T, Zill E et al. Evaluation of the *VITEK 2* system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1782-1785.
43. Valenza G, Strasen J, Schäfer F et al. Evaluation of new colorimetric *vitek 2* yeast identification card by use of different source media. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(11): 3784-7.
44. Kitch TT, Jacobs MR, McGinnis MR. Ability of *RapID Yeast Plus* System to identify 304 clinically significant yeasts within 5 hours. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:1069-1071.
45. Palmer, G.E. Autophagy in *C. albicans*. *Methods Enzymol.* 2008; 451: 311-22.
46. Mosca CO, Moragues MD, Llovo J et al. *Casein Agar*: a useful medium for differentiating *C. dubliniensis* from *C. albicans*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(1): 107-11.
47. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE et al. *Candidiasis: the emergence of a novel species, Candida dubliniensis*. *AIDS.* 1997; 11(5): 557-67.
48. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2004; 4: 369-376.
49. Willis AM et al. Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Oral Pathol Med.* 2000; 9: 86-90.
50. Anane S, Kallel K, Kaouech E et al. *Candida dubliniensis*: a novel emerging species. *Ann Biol Clin.* 2007; 65(1):13-9.
51. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I et al. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 2093-2095.
52. Alves S H, Milan EP, Sant'Ana PL et al. Hypertonic sabourad broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2002; 43(1): 85-86.



53. Szymanska J. Bacterial decontamination of duwl biofilm using oxygenal 6. *Ann Agric Environ Med.* 2006; 13: 163-167.
54. Timmins EM, Howell SA, Alsberg BK et al. Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(2): 367-74.
55. Gunasekaran M, Hughes WT Gas-liquid chromatography: a rapid method for identification of different species of *Candida*. *Mycol.* 1980; 72(3): 505-11.
56. Peltroche-Llacsahuanga H, Schmidt S, Seibold M et al. Differentiation between *C. dubliniensis* and *C. albicans* by fatty acid methyl ester analysis using gas-liquid chromatography. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1): 3696-3704.
57. Lamfon H, Porter SR, MccCullough M, Pratten J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111(6): 465-71.
58. Malic S, Hill K E, Ralphs JR, et al. Characterization of *Candida albicans* infection of an in vitro oral epithelial model using confocal laser scanning microscopy. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(3): 188-194.
59. Guimarães AE, Pacheco MTT, Silveira L et al. Near infrared Raman Spectroscopy (NIRS): A technique for doping control. *Spectrosc.* 2006; 20: 185-194.
60. Yu C, Gestl E, Eckert K, Allara D, Irudayaraj J. Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy. *Cancer Detect Prevention.* 2006; 30: 515-522.
61. Shen A, Wang ZLH, ANG I et al. Study on the in vitro and in vivo activation of rat hepatic stellate cells by Raman spectroscopy. *J Biomedical Optics.* 2007; 12.
62. Giana HE, Silveira JR, Zângaro RA. Rapid identification of bacterial species by fluorescence spectroscopy and classification through principal components analysis. *J. Fluoresc.* 2003; 13: 489-493.
63. Choo-Smith LP, Van Vreewijk T, Bruining HA et al. Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopies. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 1461-1469.
64. Harz M, Rösch P, Peschke KD et al. Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus *Staphylococcus* and dependence on their cultivation conditions. *Analyt.* 2005; 130: 1543- 1550.
65. Maquelin K, Kirchner C, Choo-Smith LP et al. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 324-329.
66. Rösch P, Harz M, Schmitt M et al. Chemotaxonomic identification of single bacteria by Micro-Raman spectroscopy: Application to clean-room relevant biological contamination. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 1626-1637.
67. Maquelin K, Kirchner C, Choo-Smith LP et al. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J Microbiol Methods.* 2002; 51: 255-271.
68. De Gussem K, Vandenabeele P, Verbeken A et al. Chemotaxonomical identification of spores of macrofungi: possibilities of Raman spectroscopy, *Analyt Bioanal Chem.* 2007; 387: 2823-2832.
69. Ibeling MS, Maquelin K, Endtz HP et al. Rapid Identification of *Candida* spp. in peritonitis patients by Raman spectroscopy. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11: 353-358.