UNICESUMAR - CENTRO UNIVERSITÁRIO DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ANÁLISE DA SENSIBILIDADE PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CANDIDÍASE

MARIA ALICE FERREIRA NUNES

MARINGÁ – PR
2017

Maria Alice Ferreira Nunes

ANÁLISE DA SENSIBILIDADE PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CANDIDÍASE

Artigo apresentado ao curso de graduação em Biomedicina da UniCesumar – Centro Universitário de Maringá como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel(a) em Biomedicina, sob a orientação da Prof. Dra Marcela Funaki dos Reis

MARINGÁ – PR

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIA ALICE FERREIRA NUNES

ANÁLISE DA SENSIBILIDADE PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CANDIDÍASE

Artigo apresentado ao curso de graduação em Biomedicina da UniCesumar – Centro Universitário de Maringá como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel(a) em Biomedicina, sob a orientação do Prof. Drª Marcela Funaki dos Reis

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

_____

Nome do professor – (Titulação, nome e Instituição)

_____

Nome do professor - (Titulação, nome e Instituição)

_____

Nome do professor - (Titulação, nome e Instituição)

ANÁLISE DA SENSIBILIDADE PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CANDIDÍASE

Maria Alice Ferreira Nunes, Marcela Funaki dos Reis

RESUMO

Candidíase é uma micose oportunista causada por leveduras do gênero *Candida*, sendo a espécie *Candida albicans* prevalente na mucosa bucal. No entanto, outras leveduras colonizam a mucosa bucal e, neste caso, o diagnóstico convencional pode não ser conclusivo para a verdadeira espécie causadora da candidíase. Assim, neste estudo foi estabelecido o limiar de sensibilidade para diagnóstico molecular de candidíase bucal, baseado em análise por marcador molecular utilizando a reação em cadeia da polimerase – PCR. Para tanto, amostras clínicas foram obtidas por raspagem da mucosa com swab e inoculadas em meio de cultura Sabouraud. Após crescimento, o DNA genômico das colônias de *C. albicans* foi extraído através do método de extração orgânica com fenol clorofórmio. Os marcadores moleculares que identificam *C. albicans* foram amplificados em dois *rounds* em Nested - PCR utilizando os *primers* ITS e CALB e os resultados visualizados em eletroforese em gel de agarose. Foi estabelecido que o limiar de sensibilidade para os *primers* compreende as concentrações em nanogramas de até 10 pg, sendo as concentrações ideais para a visualização no gel de agarose as concentrações entre 1ng a 10 pg. Diante da sensibilidade apresentada pelos primes CALB, são sugeridos estudos posteriores que testem a sensibilidade destes primers em PCR de colônias a partir de amostras clínicas e sem a etapa de extração de DNA.

Palavras-chave: *Candida albicans*; Especificidade; Reação em Cadeia da Polimerase.

ANALYSIS OF SENSITIVITY FOR MOLECULAR DIAGNOSIS OF CANDIDÍASE

ABSTRACT

Candidiasis is an opportunistic mycosis caused by yeasts of the genus *Candida*, the species *Candida albicans* being prevalent in the oral mucosa. However, other yeasts colonize the buccal mucosa and in this case the conventional diagnosis may not be conclusive for the true species causing candidiasis. Thus, the sensitivity threshold for molecular diagnosis of oral candidiasis based on molecular marker analysis using polymerase chain reaction (PCR) was established in this study. For both clinical samples were obtained by scraping the mucosa with swab and inoculated in Sabouraud culture medium. After growth, the genomic DNA of the colonies of *C. albicans*was extracted using the organic extraction method with phenol: chloroform. The molecular markers that identify *C. albicans* were amplified in two rounds in Nested - PCR using the ITS and CALB *primers* and the results visualized in agarose gel electrophoresis. It has been established that the sensitivity threshold for the primers comprises nanogram concentrations up to 10 pg, the optimum concentrations for visualization on the agarose gel being concentrations between 1ng and 10 pg. In view of the sensitivity presented

by the CALB *primers*, it is suggested later studies that test the sensitivity of these primers in PCR of colony from clinical samples and without the step of DNA extraction.

Keywords: *Candida albicans*; Polymerase Chain Reaction; Specificity.

1 INTRODUÇÃO

Candidíase é uma micose oportunista causada por leveduras do gênero *Candida* (MURREY *et al*., 2006). Este gênero constitui cerca de 200 espécies diferentes de leveduras, entre as quais, as mais prevalentes que acometem os seres humanos são *Candida albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. glabrata e C. krusei*, e as menos comuns *C. lusitaniae, C. rugosa, C. pseudotropicalis, C. guillermondii* (PEIXOTO *et al*., 2014).

As espécies de *Candida* são cosmopolitas e colonizam animais e homem, sendo o principal sítio de colonização o trato gastrointestinal, desde a boca até o reto, podendo também ser encontrado na pele, mãos, pés, uretra e vagina (MURREY *et al*., 2006). Desta maneira, todos os seres humanos podem ser portadores de uma ou mais espécies de *Candida.* As espécies de *Candida* vivem como microrganismos comensais benignos, porém podem causar algum dano ao organismo quando a flora comensal rompe a pele ou as barreiras mucosas (ROBBINS *et al*., 2010). Neste caso, quando há uma ruptura da microbiota, ou o sistema imune do hospedeiro está comprometido, a transmissão da candidíase ocorre de forma endógena (BARBEDO, SGARBI, 2010).

A instalação da micose depende do estado imune do paciente e da virulência da levedura, na qual aumenta a capacidade de adesão ao epitélio e secreções de enzimas (NUNES, 2009). Desta maneira, as manifestações clínicas de candidíase podem ser mucocutânea, cutânea e sistêmica, mas depende do local de colonização da levedura (MURREY *et al*., 2006; GOLDMAN *et al*., 2014; PEIXOTO *et al*., 2014).

Desde o nascimento, a cavidade bucal é colonizada pela levedura do gênero *Candida,* fazendo parte da microbiota normal da boca. Entretanto, com o uso de próteses dentárias, tabagismo, alteração da mucosa, troca de epitélio, alterações salivares, hormonais, nutricionais e imunológicas, a levedura pode se tornar patogênica, transformando-se na forma filamentosa, na qual induz o aparecimento de lesões na cavidade oral, sendo mais frequentes em crianças, idosos e pacientes imunodeprimidos (BARBEDO, SGARBI, 2010).

A candidíase bucal pode ser causada por diferentes espécies do gênero *Candida*. Uma das características delas é que são acidogênicas e heterofermentativas na presença do

carboidrato (BARBEDO, SGARBI, 2010). Assim sendo, a aderência da levedura pode ser facilitada pelo baixo pH, má higienização e baixo fluxo salivar, nessas condições é superior a quantidade de leveduras na cavidade bucal (SIQUEIRA *et al*., 2014).

A maioria das *Candida*s forma colônias brancas, lisas, cremosas e convexas, porém algumas espécies de *Candida* podem sofrer alterações no fenótipo, devido a mudanças no ambiente, dificultando a identificação e consequentemente o diagnóstico (MURREY *et al*., 2006). Além do mais, o diagnóstico é tardio, devido ao tempo necessário para realizar a cultura celular e a necessidade para ter um profissional qualificado para realizar a identificação correta, uma vez que exames diretos podem não ser confiáveis devido à natureza dimórfica e a influência ambiental. Desta forma, para que o tratamento se torne eficaz é necessário determinar a espécie, o fármaco de escolha, a dose e o tempo de uso (KOEHLER *et al*., 2016).

Sendo assim, o diagnóstico molecular é capaz de diminuir o tempo para realizar o exame, possui menores chances de ocorrer contaminações e obtém os resultados de forma qualitativa e quantitativa, identificando a cepa da espécie que está acometendo o paciente com candidemia e a proporção da doença, o que torna melhor o tratamento (LUTZ *et al*., 2013). Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi estabelecer o limiar de sensibilidade para diagnóstico molecular de candidíase bucal, baseado em análise por marcador molecular utilizando a reação em cadeia da polimerase – PCR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Local de Coleta de Amostras

As amostras foram coletadas de pacientes que frequentam a clínica de Odontologia da UniCesumar, Centro Universitário Cesumar, Maringá-PR.

Critérios de Inclusão e Exclusão

A pesquisa seguiu os aspectos éticos conforme a resolução 466 (BRASIL, 2012) com projeto aprovado pelo Comitê de Ética do UniCesumar, bem como a Comissão de Ética em Pesquisa – CONEP, via Plataforma Brasil (CAAE 69672117.7.0000.5539).

Como critério de inclusão, foi adotado o uso de prótese dental com ou sem manifestação clínica de *Candida sp.* Os pacientes foram convidados a participarem da pesquisa, através de esclarecimentos prévios sobre a coleta, e como poderiam ser acometidos

por candidíase, depois do aceite por parte do paciente, foi entregue a cada um o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Como critérios de exclusão foram considerados aqueles pacientes que não utilizam prótese dental, não concordaram em participar da pesquisa ou já fizeram tratamento para candidíase.

Coleta das amostras

A amostragem foi realizada no período de setembro de 2017, sendo a mesma efetuada por conveniência, sem distinção de idade, gênero ou etnia.

Para a coleta da amostra foi realizada a raspagem da mucosa bucal do paciente, utilizando dois swabs estéreis e descartáveis. Em seguida, o material coletado foi acondicionado em tubos contendo solução de salina estéril a 2% e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Centro Universitário de Maringá – UniCesumar.

Semeadura das amostras

As amostras foram semeadas assepticamente com swab contendo a amostra de DNA, em placas de Petri com meio Sabouraud dextrose, preparadas segundo instruções do fabricante. Para cada paciente foram utilizadas duas placas com o meio Sabouraud. As placas de Petri semeadas permaneceram incubadas em estufa microbiológica a 37°C ± 1°C, durante 48 a 72 horas, para o crescimento colonial.

Extração de DNA

Para a obtenção de amostras de DNA genômico, a partir das colônias de *Candida sp*, foi utilizado o método de extração orgânica com fenol-clorofórmio modificado a partir de (CRESTANI, 2007). As leveduras foram lisadas com 500 µL de tampão de lise celular (Tris – HCl 50M; NaCl 0,15M; EDTA 10mM; SDS – 2%; pH 8) acrescido de pérolas de vidro e forte agitação em vórtex (AP56, PHOENIX) durante 15 minutos. Em seguida, o lisado foi centrifugado (MiniSpin, Eppendorf) 13.000 rpm por 10 minutos. Transfeiru-se 500 µl do sobrenadante para outro tubo e foi adicionado mais 300 µL de fenol-clorofórmio, seguido de agitação em vórtex por 5 minutos e centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm. Em seguida, foi transferido 400 µL de sobrenadante para um novo tubo e adicionado 800 µL de etanol absoluto gelado, seguido de nova centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm. Todo o sobrenadante foi desprezado e suspendido o DNA com 1.000 µL de álcool 70%, seguido de

centrifugação por 5 minutos. Todo o álcool foi desprezado, seco por evaporação e o DNA ressuspendido em 50 µl de TE (Tris-EDTA, pH 8,0) e tratado 2 µl de Rnase (50 µg/mL, Ludwig) incubados em banho-Maria a 37ºC por 30 minutos.

A qualidade do DNA foi verificada através da eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com 0,4µg/mL de brometo de etídeo. Os microtubos contendo o DNA foram armazenados a -4ºC para análises posteriores.

Quantificação de DNA

Para a quantificação de DNA, foi utilizada a metodologia (KANBE *et al*., 2002) com modificações. Os produtos da extração de DNA foram quantificados por meio do método de eletroforese com gel de agarose de concentração 1,2% e corado com 0,4µg/mL de brometo de etídeo, com auxílio do tampão de eletroforese TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0).

No preparo das amostras, foram utilizados 2 µL de *LoandigDye* (Ludwig) e 5 µL de DNA. Utilizou-se 2 µL de *LoandigDye* e 2 µL para o marcador de peso molecular de 100 pb (Amresco). A estimativa da concentração de DNA (ng) foi dada pela comparação da intensidade das bandas de DNA da amostra contra as bandas formadas pelo padrão de peso molecular.

A corrida eletroforética foi ajustada para 100 V durante 60 minutos e os resultados revelados em transiluminador.

Teste de sensibilidade com diluições

O teste de sensibilidade foi efetuado a partir da quantificação de DNA, a qual foi utilizado as amostras 4 e 5 de pacientes, uma amostra padrão (New Prov 0031) de *Candida albicans* como controle positivo e água ultrapura como controle negativo, sendo realizada uma série de diluições da amostra em água livre de DNA e RNA (Ludwig) a partir de 100 ng até 1 fg de DNA.

Amplificação do marcador molecular de *Candida albicans* por Reação em Cadeia da Polimerase

Para amplificação dos marcadores que identificam C. albicans, foi utilizada a metodologia de Nested-PCR proposta por (DEL NEGRO, 2008) com modificações. Foram utilizados os primers universais ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e os primers espécie-específicos para C. albicans CALB 1(5'-TTTATCAACTTGTCACACCAGA-3') e CALB 2 (5' - ATCCCGCCTTACCACTACCG-3').

Para o primeiro *round* de amplificação foram preparados 50 µL de mastermix com tampão da enzima 1X, 0,1 mM de mix de dNTPs, 0,4 µM de cada primer (ITS1/ITS4), 12,5 µL de DNA, e 2 U/µL da enzima Taq-polimerase e amostra de DNA da concentração desejada. As condições de amplificação foram ajustadas em Termociclador Corporation PCR Sprint para um ciclo de desnaturação inicial a 95ºC por 5 minutos, seguido de trinta ciclos de desnaturação a 95ºC por 45 segundos, anelamento a 50ºC por 45 segundos, extensão a 72ºC por 1 minuto, e extensão final a 72ºC por 10 minutos.

O segundo *round* de amplificação seguiu as mesmas condições de amplificação e de componentes do mastermix do primeiro *round,* porém com a temperatura de anelamento a 55ºC para os *primers* CALB e 2 µL do produto de amplificação do primeiro *round*.

Eletroforese dos produtos de amplificação por PCR

Para a visualização dos resultados da PCR foi utilizada a metodologia de (KANBE *et al*.,2002). O layout do gel de agarose foi elaborado utilizando um marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig). Posteriormente, as amostras dos pacientes em estudo, foram aplicadas nas canaletas do gel, seguindo a ordem de diluições entre 100 ng a 1fg de DNA. Nas últimas canaletas, foi aplicado o controle positivo composto por amostra padrão conhecida de *Candida albicans* (New Prov 0031), e como controle negativo água ultrapura.

A corrida eletroforética foi conduzida por 60 minutos a 100 V, 170 mA e 90W e os resultados foram registrados e tratados com software específico – (ImageJ).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram utilizadas amostras de 10 pacientes, dos quais apenas 7 apresentaram crescimento das leveduras em períodos diferentes (Tabela 1). Este período de crescimento diferenciado pode ser justificado pela baixa colonização da cavidade bucal dos pacientes pesquisados, como é confirmado por MENEZES, (2014) que verificou o crescimento de colônias de *C. albicans* após 72 horas de cultivo.

Tabela 1. Amostragem e período de crescimento das leveduras.

Amostra	Identificação de crescimento de leveduras após 48 horas	Identificação de crescimento de leveduras após 72 horas	Ausência de crescimento de leveduras
1		X	
2	X		
3		X	
4	X		
5		X	
6			X
7	X		
8	X		
9			X
10			X

Após a extração do DNA com as amostras do crescimento das leveduras dos 7 pacientes, foi necessário submeter as amostras a um processo de quantificação de DNA para determinar a quantidade do material genético (Figura 1). Sendo esta etapa fundamental para a eficiência da PCR, pois as concentrações inadequadas de DNA implicam diretamente em falhas de amplificação. De acordo com (COSTA, MOURA, 2001) o DNA em excesso na reação pode resultar na falha completa da reação, devido à alta concentração de impureza agregada, ou perfis eletroforéticos com arraste e bandas pouco definidas. Em contrapartida, a baixa concentração de DNA resultará em amplificação errada ou não amplificação de certos segmentos com perfis de eletroforese não reproduzíveis.

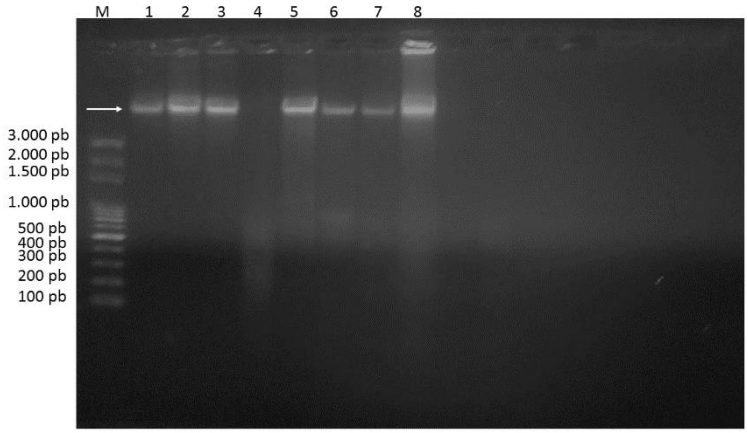

Figura 1. Quantificação de DNA: Eletroforese em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo. M**:** Marcador de peso molecular de 100 pb (Amresco®), 1-8: DNA genômico extraído a partir dos pacientes pesquisados, 4: controle negativo.

Para avaliar a eficiência do exame molecular foi utilizado o teste de sensibilidade através de uma série de diluições (100 ng-1ft) para determinar a quantidade de DNA que o exame é capaz de positivar através da reação da Nested-PCR (Figura 2). No primeiro *round* foi utilizado os *primers* universais ITS1 e ITS4 comumente empregados na identificação de fungos, principalmente do gênero *Candida* (NASCIMENTO, 2013).

As amplificações das regiões ITS (Espaçador Interno Transcrito) do DNA permite uma variação na análise de discriminação intra e interespecífica em fungos devido ao polimorfismo e à conservação desta região. Para leveduras, a variação intraespecífica é utilizada como DNA-barcoding e pode ser melhor revelada por RFLP ou Nested PCR (ARAÚJO, 2006; BENEDETTI, 2014; MATILDE, 2014).

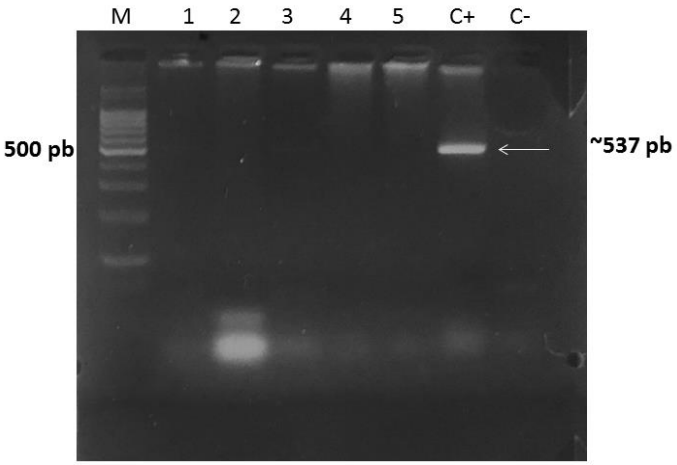

Figura 2. Produtos da amplificação por PCR dos *primers* ITS1/ITS 4. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo. M**:** Marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig), 1-5: Amostras dos pacientes testados com a diluição de 100 ng de DNA, C+: controle positivo, C-: controle negativo.

Neste estudo optou-se pela Nested - PCR na qual utiliza os *primer* espécie-específicos CALB1/2 que se ligam dentro do produto de amplificação dos *primers* ITS1/4, sendo o segundo, o *amplicon*, gerado de tamanho inferior (272 pb). No entanto, este marcador molecular aumenta a sensibilidade e especificidade do teste, sendo estes dois fatores importantes no diagnóstico molecular.

Com a utilização deste marcador verificou-se que as amostras 4 e 5 amplificaram o *amplicom* esperado, confirmando a suspeita a candidíase, pela espécie de *Candida albicans*, porém sem manifestação clínica dos pacientes (Figura 3).

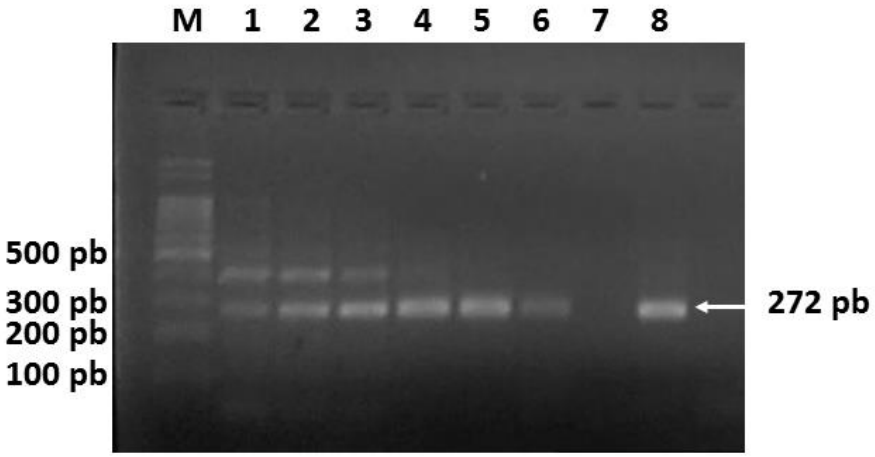

Figura 3. Reação de Nested - PCR com *primers* espécie-específico CALB1/2. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo. M: marcador de peso molecular de 100 pb (LudwigBiotec), 1: 100ng DNA, 2: 10ng DNA, 3: 1ng DNA, 4: 100pg DNA, 5: 10pg DNA, 6: 1pg DNA, 7: controle negativo, 8: controle positivo.

Com relação à avaliação do limiar de sensibilidade do exame molecular foi estabelecido que 1 pg é o limite de detecção da técnica e as concentrações ideais para visualização no gel de agarose podem ser consideradas as concentrações que variam entre 100 ng a 1 pg. No estudo realizado por (LUTZ *et al*., 2013) utilizando um par de *primers* que gera um amplicons de 684 pb, o limiar de detecção foi situado em 100 pg, ou seja, inferior ao limiar deste estudo utilizando os *primer* CALB para *C. albicans*. Resultados semelhantes foram apresentados por (TAIRA *et al*., 2014) utilizando os *primers* CALB que observaram sensibilidade no limiar entre 1,5 ng e 15 pg, e estes resultados podem ser considerados

satisfatórios uma vez que o genoma de *Candida* ssp corresponde a aproximadamente 37 fg de DNA.

Os testes de diagnóstico molecular têm sido desenvolvidos, analisados e padronizados para estabelecerem uma identificação mais rápida e segura de espécies de leveduras devido à imprecisão e demora dos testes fenotípicos tradicionais (ALVES, CAMARGO e GOULART, 2010).

Os métodos de diagnóstico molecular baseados em ensaios de PCR trazem a vantagem de serem testes rápidos, de alta especificidade e sensibilidade devido aos *primers* utilizados na reação, e quando se trata de infecções causadas por fungos que apresentam carga patogênica baixa, como é o caso da candidíase, é fundamental a realização de ensaios que possuam eficiência na sensibilidade (HSU *et al*., 2003; KOEHLER *et al*., 2016). Nesse sentido, os *primers* CALB utilizados neste estudo garantiram a sensibilidade necessária para a identificação de *C. albicans* de maneira segura e confiável. Assim, são sugeridos estudos posteriores que testem a sensibilidade destes *primers* em PCR de colônias, ou seja, diretamente a partir da amostra clínica e sem etapa de extração de DNA.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo foi estabelecido o limiar de sensibilidade para diagnóstico molecular de candidíase bucal, baseado em análise por marcador molecular utilizando a reação em cadeia da polimerase – PCR. Foi apresentado que o limiar de sensibilidade para os *primers* CALB em Nested – PCR compreende as concentrações em 100 nanogramas até 1 picograma, sendo consideradas as concentrações ideais para visualização no gel de agarose concentrações que variam entre 100ng a 1pg. Diante da sensibilidade apresentada pelos primes CALB sugere-se estudos posteriores que testem a sensibilidade destes primers em PCR de colônia a partir de amostras clínicas e sem a etapa de extração de DNA.

REFERÊNCIAS

ALVES, I.A.; CAMARGO, F.P.; GOULART, L.S. **Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de Candida sp.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.43, n. 5, p., 575-579, 2010. Acesso em: 15/10/2017. Disponível em: http://<www.scielo.br/pdf/rsbmt/v43n5/v43n5a21.pdf>

ARAÚJO, Maria A.S. **Caracterização molecular de espécies de Candida isoladas de portadores de AIDS e de portadores de Câncer atendidos em hospitais-escola de Maceió-Alagoas, Brasil.** 115f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2006. Acesso em 13/10/2017. Disponível em: http://<repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/662/arquivo4601_1.pdf?sequence=1>

BARBEDO, Leonardo S; SGARBI, Diana B.G. **Candidíase.** Jornal Brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis, v.22, n.1, p.22-38,2010. Acesso em: 03/05/2017. Disponível em: http:/</www.dst.uff.br/revista22-1-2010/4-%20Candidiase.pdf>

BENEDETTI, Volmir P. **Isolados de *Candida* provenientes de pacientes diabéticos e transplantados renais: Análise filogenética, avaliação da resistência ao fluconazol e polimorfismo do gene ERG11.** 102f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014. Acesso em 13/10/2017. Disponível em: http:<//acervodigital.ufpr.br/handle/1884/43551>

BRASIL. Ministério da saúde. Resolução **Nº466.** Conselho nacional de saúde e comissão nacional de ética em pesquisa, p.1-12, 2012. Acesso em: 18/07/2017.Disponível em:< http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>

COSTA, Maria R; MOURA, Elisa F. **Manual de Extração de DNA.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. Acesso em 13/10/2017. Disponível em: https:<//ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/63491/1/Oriental-Doc89.pdf>

CRESTANI, J. **Isolamento e caracterização de leveduras de uma mamadeira e a sua correlação com um caso clínico de criptococose.** 128f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007. Acesso em: 19/04/2017. Disponível em:https://<www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/10956/000600849>

DEL NEGRO, Gilda Maria B. **Identificação de cinco espécies de Candida pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e por hemoculturas em pacientes pediátricos com risco de**

candidemia. 2008. 95f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São Paulo, São Paulo, 2008. Acesso em: 13/04/2017. Disponível em: http://<www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5141/tde-09062009-144701/>

GOLDMAN, Lee; SCHAFER, Andrew I.; FREITAS, Angela; FESTA NETO, Cyro; CASTRO, Fábio Fernandes Morato. **Cecil Medicina**: vol 2, 24. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

HSU, M.C.; CHEN, K.W.; LO, H.J.; CHEN, Y.C.; LIAO, M.H.; LIN, Y.H.; LI, S.Y. **Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR.** Journal of Medical Microbiology, n. 12, v. 52, p. 1071-1076, 2003. Acesso em: 14/10/2017. Disponível em: http://<www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/52/12/JMM5212.1071.pdf?expires=1508173177&id=id&accname=guest&checksum=A8A751AE73DC197A97670F84D23FFF47>

KANBE, T.; HORII, T.; ARISHIMA, T.; OZEKI, M.; KIKUCHI, A. **PCR-based identification of pathogenic Candida species using primer mixes specific to Candida DNA topoisomerase II genes.** Yeast, v. 29, 973-989, 2002. Acesso em: 03/05/2017. Disponível em: http://<onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.892/abstract;jsessionid=0060529BEC45CDB931CA10E56CD04946.f04t01>

KOEHLER Alessandra; DALLEMOLE Danieli R.; RIÇA Lucas B; CORBELLINI Valeriano A.; RIEGER Alexandre. **Identificação de três espécies de Candida por PCR em tempo real.** Revista Jovens Pesquisadores, Santa Cruz do Sul, v. 6, n. 1, p. 58-73, 2016. Acesso em: 03/05/2017. Disponível em: https://<online.unisc.br/seer/index.php/jovenspesquisadores/article/view/7341>

LUTZ Bruna S.; SILVA Gabriela K.; CORBELLINI Valeriano A; RENNER Jane D. P.; POSSUELO Lia G.; VALIM Andréia R. M. **Padronização das técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real para diagnóstico de Candida albicans.** Revista Jovens Pesquisadores, Santa Cruz do Sul, v. 3, n. 1, p. 51-66, 2013. Acesso em: 03/05/2017. Disponível em: https://online.unisc.br/seer/index.php/jovenspesquisadores/article/view/3580>

MATILDE, Filipa A.V. **Candida glabrata um patogénio emergente?** 80f. Dissertação (Mestrado) Instituto Superior de Ciências da Saúde Egaz Moniz. Alamada, Portugal,2014. Acesso em: 12/10/2017. Disponível em: https:<//comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/13041/1/Matilde%2C%20Filipa%20Alexandra%20Veiga.pdf>

MENEZES, Ralciane P. **Avaliação da frequência, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras do gênero Candida isoladas da cavidade bucal de pacientes portadores do HIV.** 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Uberlândia Faculdade de Medicina. Urbelândia, 2014. Acesso em 12/10/2017. Disponível em: https://<repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/12798/1/AvaliacaoFrequenciaAtividade.pdf>

MURRAY, Patrick R; ROSENTHAL, Ken S; PFALLER, Michael A**. Microbiologia médica**.5.ed.Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

NASCIMENTO, Ariane C.M.O.B. **Identificação molecular e caracterização fenotípica e genotípica da produção de biofilme em isolados de Candida spp do Hospital das Clínicas de Botucatu, UNESP.** 151f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2013. Acesso em: 13/10/2017. Disponível em: https://<repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/108424/000736352.pdf?sequence=1>

NUNES, Maína O. **Epidemiologia de candidemias e perfil de susceptibilidade das leveduras do gênero Candida em hospital universitário de Mato Grosso do Sul.** 105 f. Dissertação (Mestrado). Curso Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMG, Campo Grande, 2009. Acesso em: 04/05/2017. Disponível em: https://<sistemas.ufms.br/sigpos/portal/trabalhos/download/112>

OLIVEIRA, Márcia C.S. **Fundamentos teórico - práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase.** 43p.São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. Acesso em: 03/05/2017. Disponível em: https://<www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>

PEIXOTO, Juliana Vieira; ROCHA, Mayara Gomes. **Candidíase – Uma revisão de literatura.** Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research, v.8, n.2, p.75-82, set./nov,2014. Acesso em: 03/05/2017. Disponível em: https://<www.mastereditora.com.br/periodico/20141001_074435.pdf>

ROBBINS, Stanley L; COTRAN, Ramzi S; KUMAR, Vinay. **Patologia: Bases patológicas das doenças.** vol.1,2, 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

SIQUEIRA, Jonathan S S; SILVA, Arley J; FERREIRA, Maria F; AGOSTINI, Michelle; TORRES Sandra R. **Candidíase oral em pacientes internados em UTI.** Revista brasileira odontologia, Rio de Janeiro, v.71, n.2, p.176-179,2014. Acesso em: 03/05/2017. Disponível em: http://<revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72722014000200009>