



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Gismar Monteiro Castro Rodrigues

**COMPARAÇÃO DA MICROBIOTA ORAL DE
CANDIDA SP. ENTRE PACIENTES
SOROPOSITIVOS PARA O HIV/DOENTES
COM AIDS E NÃO PORTADORES DO VÍRUS
DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA**

**São José do Rio Preto
2007**

Gismar Monteiro Castro Rodrigues

COMPARAÇÃO DA MICROBIOTA ORAL DE
CANDIDA SP. ENTRE SOROPOSITIVOS
PARA O HIV/DOENTES COM AIDS E NÃO
PORTADORES DO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andréa Regina Baptista Rossit

São José do Rio Preto
2007

Rodrigues, Gismar Monteiro Castro
Comparação da microbiota oral de *Candida* sp. entre soropositivos para o HIV/doentes com AIDS e não portadores do vírus da imunodeficiência humana / Gismar Monteiro Castro Rodrigues. São José do Rio Preto, 2007
123 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andréa Regina Baptista Rossit

1. HIV; 2. microbiota oral; 3. *Candida* sp.; 4. drogas antifúngicas

Dedico...

ao meu amado e doce esposo, ***Fabiano Z. B. D. Rodrigues***, que sempre acreditou em mim e

ao meu amado filho, ***Juan M. B. Rodrigues***, que soube superar os momentos de minha ausência que a pesquisa e o estudo me exigiram,
a vocês ***dois*** que são o melhor de Deus em minha vida, a minha porção da benção, a minha família, que eu tanto amo, prezo e estimo, ***muito obrigada***, por serem parte de mim!!!!

*“O Senhor te porá à frente e não na cauda; estarás sempre no alto,
jamais embaixo, contanto que obedechas às ordens do Senhor, teu
Deus”.*

(Deuteronômio, 28,13)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cavidade oral com Candidíase pseudomembranosa aguda.....	11
Figura 2: Cavidade oral com Candidíase pseudomembranosa crônica	11
Figura 3: Cavidade oral com candidíase crônica atrófica	12
Figura 4: Cavidade oral com candidíase crônica hiperplásica.....	12
Figura 5: Distribuição dos pacientes soropositivos para HIV/doentes com AIDS segundo a idade e o sexo	35
Figura 6: Distribuição percentual do grupo soropositivo para o HIV/doentes com AIDS de acordo com a manifestação atual e/ou pregressa de candidíase orofaríngea (COF) e/ou de candidíase esofágica.....	36
Figura 7: Porcentagens de distribuição dos pacientes soropositivos para do HIV/doentes com AIDS por comorbidades apresentadas nos últimos 12 meses anteriores à inclusão neste estudo.....	37
Figura 8: Caracterização percentual de pacientes e indivíduos do grupo controle, segundo o uso de prótese dentária e qualidade da higiene oral (HO) como sendo satisfatória (satisf.) ou insatisfatória (insatisf.).....	38
Figura 9: Padrões de RFLP dos produtos de PCR do DNA codificador do RNA ribossômico (DNAr) 18S e 5,8S e região espaçadora transcrita interna 1 (ITS1) de <i>Candida</i> sp. 1: Marcador de peso molecular “100 bp DNA Ladder” (Gibco-BRL); 2 e 3: <i>Candida albicans</i> (CA) com perfil fenotípico de <i>C. dubliniensis</i> ; 3 e 4: CA (controle positivo) e 5: <i>C. dubliniensis</i> (CD; controle positivo). CA = 3 bandas com 141, 184 e 261 pares de bases (pb) e CD = 2 bandas com 325 pb e 265 pb (seta vermelha). Os produtos do RFLP foram visualizados sob iluminação UV após eletroforese em gel de agarose 25 corado com brometo de etídeo	40
Figura 10: Colonização/infecção por cepas de <i>Candida</i> sp. em números absolutos nos pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS, internos e não internos ...	42
Figura 11: Número absoluto de <i>C. albicans</i> isolada em colonização /infecção mista nos grupos paciente e controle. CA: <i>C. albicans</i> , CNA: <i>Candida</i> “não albicans”.....	46
Figura 12: Distribuição em números absolutos dos pacientes soropositivos para HIV/doentes com AIDS que fazem ou não uso de prótese dentária (PD SIM; PD NÃO) em relação à colonização única e mista por <i>Candida</i> sp. ($p < 0,05$). C. mista: colonização mista, C. única: colonização única.....	47
Figura 13: Distribuição em números absolutos dos indivíduos saudáveis que fazem ou não uso de prótese dentária (PD SIM; PD NÃO) em relação à colonização única e mista por <i>Candida</i> sp ($p < 0,01$). Onde: C. mista (colonização mista), C. única: colonização única.....	47

- Figura 14 :** Perfil de sensibilidade das cepas de *C. albicans* (n=38) isoladas a partir da mucosa oral de indivíduos soropositivos para o HIV e/ou doentes com AIDS, frente os antifúngicos: cetoconazol (CET), anfotericina B (ANF B); itraconazol (ITRAC) e fluconazol (FLUC), em números absolutos..... 49
- Figura 15 A, B, C e D:** Perfil de sensibilidade das espécies de *Candida* sp. isoladas a partir da mucosa oral de pacientes, frente às drogas: fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B. CA: *C. albicans*, CT: *C. tropicalis*, CF: *C. famata*, CI: *C. inconspicua*, CGUI: *C. guilliermondii*, CK: *C. krusei*..... 51
- Figura 16:** Perfil de sensibilidade de *Candida* sp. (n=29), isolada a partir da mucosa oral de indivíduos saudáveis frente aos antifúngicos: fluconazol (FLUC), cetoconazol (CETO), itraconazol (ITRA) e anfotericina B (ANFO B)..... 52
- Figura 17 A, B, C e D:** Perfil de sensibilidade das espécies de *Candida* sp. isoladas a partir da mucosa oral de indivíduos imunocompetentes frente aos antifúngicos: fluconazol, itraconazol, anfotericina B e cetoconazol . CA: *C. albicans*, CT: *C. tropicalis*, CF: *C. famata*, CGL: *C. glabrata*, CP: *C. parapsilosis*..... 53

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1:** Concentração inibitória mínima dos antifúngicos fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B para inibir, respectivamente, o crescimento de 50% (CIM₅₀) e 90% (CIM₉₀) das cepas de *Candida* “não albicans” isoladas a partir da mucosa oral de pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS.....57
- Quadro 2:** Concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B necessária para inibir o crescimento de 50% (CIM₅₀) e 90% (CIM₉₀) das cepas de *Candida* sp. isoladas a partir da mucosa oral de indivíduos saudáveis.60
- Tabela 1:** Características sócio-demográficas e clínico-epidemiológicas dos portadores do HIV-1/doentes com AIDS e respectivos controles.....39
- Tabela 2:** Distribuição percentual das cepas de *Candida* sp. isoladas (n= 46) a partir da mucosa de indivíduos soropositivos para o HIV-1 segundo perfil de sensibilidade aos antifúngicos: cetoconazol, anfotericina B, itraconazol, fluconazol.48
- Tabela 3:** Distribuição das cepas de *Candida* “não albicans” isoladas (n= 8) a partir da mucosa de indivíduos soropositivos para o HIV-1 segundo perfil de sensibilidade aos antifúngicos: cetoconazol, anfotericina B, itraconazol, fluconazol.49
- Tabela 4:** Susceptibilidade de *C. albicans*, expressa por meio da CIM, isolada a partir da mucosa oral de soropositivos para o HIV/doentes com AIDS, frente à ação das seguintes drogas: fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B. ...56
- Tabela 5:** Susceptibilidade das cepas de *C. albicans*, expressa através da concentração inibitória mínima (CIM), isoladas a partir da mucosa oral do grupo controle frente às drogas: fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B, após microdiluição em caldo.....59
- Tabela 6:** Susceptibilidade de *Candida* “não albicans”, isoladas a partir da mucosa oral do grupo controle, frente aos medicamentos: fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B, após microdiluição em caldo.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
>	Maior do que
<	Menor do que
°C	graus centígrados
=	Igual a
µg	Micrograma
AIDS/SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana adquirida
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CDC	Centro para o Controle de Enfermidades
Cim	Centro de Investigação de Microrganismos
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM ₅₀	Concentração inibitória mínima para 50% das cepas
CIM ₉₀	Concentração inibitória mínima para 90% das cepas
Células T	Células que possuem receptores celulares tipo T
Células-	
T CD ₄	Tipo de linfócitos que apresentam receptores celulares do tipo T em sua superfície (células brancas do sangue).
COF	Candidíase orofaríngea
Col.	Colaboradores
DNA	Ácido dextrorribonucleico
DVO	Dimensão vertical de oclusão
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
HAART	Terapia anti retroviral de alto impacto

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IgA	Imunoglobulina A
IP	Inibidor de proteases
LAPEMI	Laboratório de Pesquisas Micológicas
Água	
Milli-Q	Água Millipore
mL	Microlito
mL	Mililitro
mm ³	Milímetro cúbico
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
NCCLS	“National Committee for Clinical Laboratory Standards”
°C	Graus Celsius
PCR	Reação de polimerização em Cadeia: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RAPD	Amplificação Randômica do Ácido Dextrorribonucleico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i>
RNA	Ácido ribonucléico
SAP	Aspartil proteinase
Saps	Aspárticoproteases
sp.	Espécie
s ²	Desvio padrão
(U/mm ³)	Unidade por milímetro cúbico
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Raio ultravioleta
\bar{x}	Média aritmética

RESUMO

Introdução: *Candida albicans* é colonizadora da cavidade bucal humana sendo que em pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV)/doentes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), assume perfil oportunista causando, dentre outras manifestações, a candidíase orofaríngea. Nesses indivíduos, são também isoladas as espécies “não albicans”, cuja resposta aos antifúngicos pode variar. **Objetivo:** Avaliar *Candida* sp. isolada a partir da microbiota oral de pacientes soropositivos para o HIV-1/doentes de AIDS e do respectivo grupo controle e descrever seu perfil de sensibilidade aos antifúngicos. **Metodologia:** As amostras obtidas a partir da mucosa oral de 52 pacientes e respectivos controles foram submetidas às análises micro-morfológicas das cepas. Para a pesquisa molecular de *C. dubliniensis* foi utilizada a reação em cadeia de polimerase. O perfil de sensibilidade antifúngica foi avaliado por difusão em disco e por microdiluição, frente à anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e fluconazol... **Resultados:** O índice de colonização/infecção por *Candida* sp. foi maior no grupo HIV/AIDS comparado ao grupo controle ($p < 0,05$), sendo *C. albicans* a espécie mais isolada. A frequência de espécies “não albicans” foi similar em ambos os grupos, sem detecção de *C. dubliniensis*. O índice de colonização (única e mista) foi superior entre os pacientes HIV/AIDS usuários de próteses em relação aos não usuários ($P < 0,05$). As cepas de *C. albicans* isoladas do grupo paciente em relação às isoladas do grupo controle apresentaram maior concentração inibitória mínima (CIM) frente ao fluconazol ($P < 0,01$), menor percentual de sensibilidade dependente da dose (SDD) frente ao cetoconazol ($P < 0,1$) e maior SDD para o itraconazol ($P < 0,06$). Já *Candida* “não albicans”, isolada a partir de pessoas saudáveis, mostrou porcentagens maiores de

SDD frente às mesmas drogas. Nenhuma levedura mostrou resistência às drogas avaliadas sendo unânime também a sensibilidade à anfotericina B. **Conclusões:** O grupo HIV/AIDS é mais colonizado por *Candida* sp. que os soronegativos para esse vírus, sem mudanças na proporção *Candida albicans* x “não albicans”, sendo que as cepas obtidas a partir de ambos grupos apresentam perfil de sensibilidade equivalente aos antifúngicos testados. *C. dubliniensis* não coloniza/infecta a mucosa oral dos portadores do HIV/doentes com AIDS ou de controles saudáveis da região Noroeste paulista. Portadores do HIV/doentes com AIDS que fazem uso de prótese dentária têm maiores chances de colonização/infecção da mucosa oral por tais leveduras, necessitando, portanto, de maior atenção à saúde bucal.

Palavras chave: *Candida* sp., HIV, microbiota oral, drogas antifúngicas.

ABSTRACT

Introduction: *Candida albicans* is as a human oral cavity colonizer. However, for the human immunodeficiency virus (HIV) serum-positive individuals and/or acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients, it assumes opportunistic profile causing, amongst other clinical manifestations, oropharyngeal candidiasis. In the population, it is also isolated a group of species named *Candida* “non-*albicans*”, whose response in the presence of antifungal drugs can diverge. **Objective:** To study *Candida* sp. oral colonization in HIV-1 carriers/AIDS patients and their respective group, and describe its antifungal susceptibility profile. **Methodology:** Oral cavity samples, collected from 52 patients and respective controls were submitted micromorphological analysis of the strains. The antifungal susceptibility profile was evaluated by disc diffusion and by broth microdilution, for the following drugs: anfotericin-B, ketoconazole, itraconazole and fluconazole. **Results:** *Candida* sp. colonization/infection index was higher in the HIV/AIDS patients compared to their controls ($p < 0.05$), and *C. albicans* was the most isolated species. *Candida* “non-*albicans*” frequency was similar for both studied groups, including *C. dubliniensis* absence. Single and mixed species colonization/infection rates were superior among HIV/AIDS dental prosthesis users in relation to those without such apparatus ($P < 0.05$). the strains of the *C. albicans* isolated from the group patient regarding the isolated in the control group, showed higher the fluconazole minimum inhibitory concentration (CIM) ($P < 0,01$), smaller percentages of dose-dependent susceptibility (SDD) to ketoconazole ($P < 0,1$) and greater ones for itraconazole ($P < 0,06$). Higher percentages of SDDs to the same drugs were provided by *Candida* “non-*albicans*” isolated from healthy individuals. None of the isolated strains displayed resistant

phenotype to fluconazole whereas they were all sensitive to anfotericin-B.

Conclusions: The HIV/AIDS group, compared to the HIV serum-negative individuals, is more often colonized by *Candida* sp., without changes in the albicans x “non-albicans” ratio, and also with equivalent antifungal susceptibility profiles. *C. dubliniensis* does not colonize/infects the oral cavities of HIV infected subjects/AIDS patients, or their healthy controls, from São Paulo State Northwest region. HIV carriers/AIDS personnel who make use of dental prosthesis have higher *Candida* sp. oral cavity colonization/infection rates, needing, therefore, closest attention to their oral health.

Key-words: *Candida* sp., HIV, oral microflora, antifungal drugs.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE QUADROS E TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Espécies de Candida de interesse médico	4
1.1.1. A microbiota oral	7
1.1.2. Candidíase oral X AIDS	8
1.2. Interação de Candida sp. com o hospedeiro humano.....	13
1.3. Fatores predisponentes para a ocorrência da candidíase orofaríngea	16
1.4. A síndrome da Imunodeficiência humana adquirida e a candidíase orofaríngea	16
1.5 Terapêutica por Antifúngicos e Resistência Microbiana	18
1.6. Objetivo.....	20
1.6.1. Objetivo Geral	20
1.6.2. Objetivos Específicos	21
2. CASUÍSTICA E METODOLOGIA	23
2.1. Casuística	23
2.2. Elaboração do estudo	24
2.3. Coleta das amostras	24
2.4. Isolamento e identificação das leveduras	25
2.4.1. Isolamento e identificação fenotípica	25
2.4.2. Triagem molecular de Candida dubliniensis	27
2.5. Armazenamento das cepas	29

2.6. Testes de susceptibilidade aos antifúngicos.....	30
2.6.1. Método de difusão em disco.....	30
2.6.2. Microdiluição.....	30
2.7. Análises estatísticas.....	32
3. RESULTADOS.....	34
3.1. População estudada.....	34
3.1.1. Grupo paciente.....	34
3.1.2. Grupo controle.....	37
3.1.3. Comparação entre os grupos estudados.....	38
3.2. Isolamento de <i>Candida sp.</i>	39
3.2.1. Grupo Paciente.....	39
3.2.2. Grupo controle.....	44
3.2.3. Comparação entre os grupos estudados.....	45
3.3. Perfil de sensibilidade antifúngica de <i>Candida sp.</i>	48
3.3.1. Disco difusão.....	48
3.3.1.1. Pacientes.....	48
3.3.1.2. Grupo controle.....	52
4. DISCUSSÃO.....	66
5. CONCLUSÕES.....	86
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
Apêndice 1.....	116
TERMO DE PARTICIPAÇÃO E LIVRE CONSENTIMENTO.....	116
Apêndice 2.....	117
FICHA EPIDEMIOLÓGICA.....	117
Apêndice 3.....	119
Apêndice 4.....	120
Critérios para definição da sensibilidade aos antifúngicos testados por meio do antifungigrama por disco difusão.....	120
Apêndice 5.....	121
Critérios de susceptibilidade aos antifúngicos: fluconazol e itraconazol para o teste de Microdiluição.....	121

Apêndice 6.	122
Apêndice 7.	123
Aprovação trabalho 22/2007 - Revista Panamericana de Infectologia	123
Apêndice 8.	124

1. INTRODUÇÃO

Candida sp. é uma levedura pertencente ao Reino Fungi; Divisão Eumicota; Filo Deuteromicota; Classe Blastomices; Ordem Criptococales; Família Criptococacea, Gênero *Candida*. É arredondada e se apresenta predominantemente em forma unicelular. As espécies de interesse médico caracterizam-se por sua capacidade de assimilação de certos carboidratos (todas as espécies assimilam e fermentam a glicose), por produzir ureases, por sua ação fermentativa e por não utilizarem nitratos. Crescem bem em meios de cultura aeróbios e não crescem em anaerobiose estrita, muito embora sejam capazes de produzir colônias em altas concentrações de dióxido de carbono. Suas espécies não requerem meios especiais, pH estrito (entre 2,5 a 7,5 permite seu desenvolvimento) ou temperatura rígida, variações entre 20 graus centígrados (°C) a 38°C são satisfatórias à maioria dos membros desse gênero, sendo 37°C a temperatura ideal para o crescimento de *Candida albicans* (*C. albicans*) e *C. tropicalis*.⁽¹⁾ Dentre seus principais representantes, apenas *C. krusei* é capaz de crescer em meios sem vitaminas sendo que, a grande maioria necessita de biotina para crescer além de outras vitaminas como: tiamina, pantotenato, vitamina B12, ácido nicotínico e ácido paraaminobenzóico.⁽²⁾

Quanto à morfologia, *Candida* sp. depende do microambiente de crescimento, e pode se apresentar sob as formas de hifas (estruturas tubulares), pseudo-hifas ou micélios ou ainda em uma combinação de todas essas formas.⁽²⁾ A produção de grandes corpos terminais e de paredes grossas, chamados clamidósporos, também é um fator relevante na determinação da espécie já que raramente outras espécies de significado clínico, que não *C. albicans*, são capazes de formá-los.^(1, 2, 3) A

temperatura inferior a 33°C favorece a morfologia da célula leveduriforme simples. A temperatura elevada e pH geralmente neutro, por sua vez, favorecem o crescimento de hifas e a conversão das formas celulares em micélios, via produção do tubo germinativo, exclusivo das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Esse fenômeno é empregado para a distinção inicial, no chamado teste de formação do tubo germinativo quando as leveduras são desafiadas a produzi-lo em soro humano a 37°C, por um período de 1 a 3 horas. ⁽²⁾

A parede celular é muito importante no estudo das espécies de *Candida*, pois é nessa que estão localizados os principais fatores antigênicos além de ser o local em que ocorre a adesão ao hospedeiro possibilitando a colonização. Além dessas características, nesse envoltório rígido localizam-se os principais fatores de virulência da célula fúngica. Essa também constitui uma referência para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos direcionados às estruturas dos fungos, tais como os glucanos e a quitina, que não estão presentes nas células humanas. ⁽⁴⁾ A parede celular fúngica mostra-se formada por cinco camadas diferentes: manoproteína, beta-glucano/quitina, beta-glucano, manoproteína e estrato fibrilar. Na *C. albicans*, exteriormente, o extrato fibrilar forma uma capa protetora relevante quanto à virulência, uma vez que favorece a adesão e a resistência à fagocitose. ⁽⁵⁾

Um aspecto da biologia de *Candida* sp. que tem gerado interesse é a capacidade que essa levedura tem em exibir várias formas de colônia em crescimento *in vitro*. ⁽⁶⁾ Por exemplo, uma cepa formadora de colônias lisas pode formar colônias rugosas quando cultivadas em agar. Esta capacidade de conversão de colônias lisas a rugosas pode potencializar a invasão e a proliferação em

diferentes localizações e ambientes, pois alterações morfológicas implicam em modificações na superfície antigênica e favorecem a adesão a mucosas. ⁽⁶⁾

1.1. Espécies de *Candida* de interesse médico

O gênero *Candida* possui cerca de 200 espécies, dentre essas a *Candida albicans* destaca-se por ser a principal promotora da candidíase. Atualmente, existe um aumento da incidência de infecções causadas por outras espécies de *Candida*, como por exemplo, *C. glabrata*, *C. krusei* e a mais recentemente descrita *C. dubliniensis*. Essas leveduras são também agentes etiológicos de micoses oportunistas em organismos imunodeprimidos. ⁽⁷⁾ As espécies desse gênero de maior importância para a clínica médica humana são:

- a- *C. albicans*: componente da flora comensal da mucosa oral, vaginal e trato gastrointestinal. Principal agente causador de infecção fúngica oportunista. O espectro das manifestações clínicas desencadeadas por essa espécie vai desde infecções de menor gravidade, como a queratomicose, a onicomiose ou as vaginites, até as mais severas como a infecção pulmonar, a enterite, a esofagite, a endocardite, a meningite, o abscesso cerebral, a artrite, a pielonefrite, a septicemia, entre outras. Dois sorotipos de *C. albicans* foram isolados, o A e o B, sendo o A o responsável por candidíase na maioria dos pacientes. Entretanto, em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência humana adquirida (AIDS), uma maior variabilidade é notada e tanto o sorotipo A quanto o B têm sido isolados a partir de focos de infecção por *C. albicans*;

⁽⁷⁾

- b- *C. tropicalis*: é a segunda espécie mais frequentemente produtora de candidíase; ⁽⁸⁾
- c- *C. glabrata* – essa espécie vem emergindo ocupando o terceiro lugar de causadora de candidíases nos tratos: oral, esofageal, vaginal e urinário, principalmente nos indivíduos imunocomprometidos. ^(9,10)
- d- *C. krusei*: grande causadora de infecções oportunistas em pacientes neutropênicos e crianças com diarreia. Tem sido motivo de destaque devido à resistência intrínseca ao fluconazol; ⁽⁷⁾
- e- *C. catenulata*: é uma espécie que raramente responsável por doença no ser humano, porém quando isolada, está associada às onicomicoses; ⁽²⁾
- f- *C. ciferrii*: dificilmente isolada a partir de onicomicoses; ⁽²⁾
- g- *C. dubliniensis*: patógeno emergente fenotipicamente semelhante à *C. albicans*. Desde a sua descrição, diferentes estudos epidemiológicos foram conduzidos na tentativa de estabelecer sua frequência como agente colonizador e infeccioso em diferentes populações, sítios corporais e espécimes clínicos ^(10, 11, 12)
- h- *C. guilliermondii*: tem sido identificada como agente causador de endocardites. Também é a causa de infecções em pacientes imunocomprometidos e submetidos à cirurgia. Seu isolamento em sítios cutâneos infectados preocupa, uma vez que apresenta resistência intrínseca à anfotericina B; ^(2, 7)
- i- *C. kefyr* (anteriormente denominada *C. pseudotropicalis*): infecções oportunistas do pulmão e onicomicoses; ⁽²⁾
- j- *C. lusitaniae*: agente da candidíase em portadores de imunodeficiência tem sido isolada em hemocultura e a partir do trato gastrointestinal. Também exibe

- resistência intrínseca à anfotericina B; ⁽⁷⁾
- k- *C. parapsilosis*: relacionada aos processos infecciosos advindos de práticas como: aplicação de drogas intravenosas e o uso de cateteres intravasculares, vigência da nutrição parenteral, emprego de soluções para irrigação oftálmica, dentre outras; ⁽¹³⁾
 - l- *C. rugosa*: espécie raramente patológica, mas que já foi isolada em quadros de fungemia em pacientes com cateteres vasculares e em indivíduos imunocomprometidos; ⁽²⁾

Em decorrência de sua semelhança fenotípica com *C. albicans*, *C. dubliniensis* foi devidamente reconhecida como uma espécie do gênero *Candida* apenas em meados de 1995 em Dublin, na Irlanda ¹⁴ sendo que foi associada a princípio, a episódios de candidíase orofaríngea em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana adquirida / doentes com AIDS. Trata-se, portanto, de uma levedura oportunista fenotipicamente muito semelhante à *C. albicans*. Principalmente para portadores do HIV/doentes com AIDS há uma forte tendência dessa espécie em acarretar candidíases recorrentes.

Embora o meio CHROMagar Candida® seja considerado adequado para identificação presuntiva das espécies de *Candida* inclusive diante de culturas mistas e capaz de distinguir espécies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, e *C. parapsilosis* ⁶⁹, as espécies *C. dubliniensis* e *C. albicans* apresentam nesse meio, similaridade de cores, ou seja, enquanto *C. dubliniensis* desenvolve coloração aproximadamente verde escuro e *C. albicans* exibem um tom com tendência ao verde claro ¹². Outro teste fenotípico de identificação de *C. albicans* que, também é sugestivo de *C. dubliniensis*, é o teste do tubo germinativo o qual é positivo para ambas as espécies

^{8,14}. Embora de caráter iminentemente presuntivo, outras técnicas fenotípicas são empregadas tais como: assimilação e fermentação de carboidratos (enquanto *C. albicans* é capaz de assimilar D-xilose, α -metil-D-glucopiranoside e DL- lactato, *C. dubliniensis* não o faz), o uso de kits comerciais para identificação tais como o API ID 32 AUX (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, França)¹⁶ a incapacidade de *C. dubliniensis* crescer em meio Sabouraud hipertônico dentre outras ^{14, 68}.

Por sua vez, a identificação de *C. dubliniensis* fundamentada apenas nos aspectos fenotípicos não é suficiente para diferenciar esta espécie de *C. albicans*¹⁰. Recentemente, novas técnicas fundamentadas na biologia molecular e na sorologia têm sido empregadas para identificação tanto do gênero *Candida* sp. quanto de suas diferentes espécies. Por sua vez, a metodologia molecular baseia-se nas características genotípicas desta espécie. São utilizadas as técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) e a amplificação randômica do DNA (RAPD) ^{10, 12, 14}.

Esses avanços têm sido úteis na identificação de espécies emergentes e na compreensão dos mecanismos de resistência aos fármacos. ⁽¹⁰⁾ No entanto, predomina na rotina diagnóstica a identificação fenotípica clássica por meio da investigação macroscópica da colônia em ágar cromogênico, da pesquisa micromorfológica em ágar fubá Tween 80 e da obtenção do perfil bioquímico ^(14, 15, 16)

1.1.1. A microbiota oral

A cavidade oral aloja uma grande variedade de microrganismos que são repetidamente introduzidos e removidos deste sistema sem comprometer a saúde do indivíduo. Por sua vez a compatibilidade de permanência dessa população microbiana decorre do desenvolvimento de um processo de adaptação e

readaptação contínuas fundamentados em um controle exercido pelo sistema imunológico, o que garante a condição saprófita desses germes. ^(17, 18)

São diversos os mecanismos de proteção que atuam intraoralmente. O epitélio faz uma barreira física e a renovação epitelial contribui para a defesa. Já a mucosa oral é lubrificada pela saliva sendo que essa possui função diluente, enxaguatória, além de conter fatores antimicrobianos tais como: lisozima, lactoferrin e lactoperoxidase, os quais constituem uma barreira de proteção contra patógenos. Em adição, há o sistema imunológico local com função protetora da mucosa, o imune secretor, que pode ser estimulado independentemente da defesa sistêmica. ⁽¹⁸⁾

Na microbiota da cavidade bucal as leveduras do gênero *Candida* predominam sobre os demais fungos colonizando, em intensidade crescente, a mucosa jugal, o palato e a língua. Calcula-se que em 60% ou mais dos indivíduos oralmente saudáveis, é possível isolar *Candida* sendo que a espécie *C. albicans* é responsável por aproximadamente 95% do total de isolados. Entretanto, nos últimos anos, é cada vez mais comum a presença das espécies “não albicans” como colonizantes da mucosa oral, especialmente após a pandemia da Aids. ^(17, 19). A infecção acontece quando a virulência do fungo supera a resistência do hospedeiro, caracterizando um desequilíbrio entre agente e hospedeiro, e o fungo deixa a sua condição de saprófita e passa a exercer a ação parasitária. ⁽¹⁾

1.1.2. Candidíase oral X AIDS

As descrições de lesões bucais remontam à época de Hipócrates e Galeno. Langenbeck, em 1839, foi um dos primeiros a efetuar a documentação formal de

fungos em lesões bucais humanas. No entanto, foi Berg quem estabeleceu, em 1841, a etiologia fúngica da afecção bucal por meio de experimentos *in vivo* e, dois anos depois, Robin denominou o microrganismo isolado *Oidium albicans*. Desde então, diversos nomes têm sido empregados sendo os principais *Monilia albicans* e *Candida albicans*.⁽²¹⁾ Já o primeiro caso documentado de infecção sistêmica por *C. albicans* ocorreu somente em 1940.⁽²²⁾

A candidíase pode ser definida como uma infecção micótica causada por espécies do gênero *Candida*. Na cavidade oral, é desencadeada pelo desequilíbrio da microbiota bucal o que favorece a ação patogênica por parte de microrganismos que a integram. Entre esses agentes, *C. albicans* é isolada em porcentagens que variam entre 30 a 60% e, em menor número, são também detectadas *C. tropicalis* e *pseudotropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. glabrata*, *C. guilliermondi*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*.^(23, 24)

Vários fatores são citados como responsáveis pela ocorrência da candidíase orofaríngea tais como: crescimento do hospedeiro, perda de dentes, restaurações, aparelhos (ortodônticos e protéticos), mudanças de hábitos alimentares, hábitos tabagista e etilista, qualidade da higiene oral, doenças sistêmicas, alterações hormonais, certas fármacos locais e sistêmicos, como antibióticos, imunodepressão, radiação e quimioterapia e a presença de outras infecções.^(24, 25)

Uma vez iniciado o quadro infeccioso, a candidíase oral pode se apresentar nas seguintes formas clínicas:

- a- Candidíase aguda pseudomembranosa: caracteriza-se por placas brancas e cremosas localizadas em qualquer área da mucosa oral (**Figura 1**). É observada com maior frequência em crianças, idosos, diabéticos e imunodeprimidos;^(26, 27)

- b- Candidíase aguda atrófica – apresenta uma área de ulceração rasa e extensa (**Figura 2**) sem a presença de membrana aparente, conferindo sensação de queimadura e muita dor; ⁽²⁸⁾
- c- Candidíase crônica atrófica – também chamada queilite angular por candidíase, caracteriza-se por eritema crônico, geralmente no palato e na comissura labial (**Figura 3**) em consequência da perda da dimensão vertical de oclusão, da idade avançada ou pela deficiência de complexo B; ⁽²⁸⁾
- d- Candidíase crônica hiperplásica ou leucoplásica, por apresentar placas brancas que não se destacam, semelhantes a leucoplasia (**Figura 4**), observada geralmente em pacientes usuários do tabaco. Tem sido associada com a redução local da imunoglobulina A (IgA) salivar. ^(28, 29)

Dentre os sintomas referidos pelos portadores da candidíase incluem-se: xerostomia, ardência bucal, disfagia e queimações. Daí deduz-se a morbidade significativa visto que a candidíase culmina em alimentação deficiente, perda de peso e diminuição da qualidade de vida dos indivíduos acometidos. ⁽³⁰⁾ O portador do vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) é cliente em potencial dos consultórios dentários, já que é na boca que normalmente surgem as primeiras manifestações relacionadas à imunodeficiência gerada pós-infecção por esse vírus.



Figura 1: Cavidade oral mostrando as placas brancas, características da candidíase pseudomembranosa aguda.



Figura 2: Cavidade oral de um indivíduo portador da candidíase pseudomembranosa crônica. A seta aponta para a lesão ulcerativa típica dessa condição.



Figura 3: Aspecto do palato superior afetado pela candidíase crônica atrófica.



Figura 4: Placa branca no centro da língua em cavidade oral de paciente acometido pela candidíase crônica hiperplásica.

A microbiota oral de indivíduos imunocompetentes é diferente daquela dos portadores do HIV e/ou pacientes com AIDS no que tange à população fúngica uma vez que apresentam um aumento quantitativo e qualitativo substancial das espécies que a compõe. ⁽³¹⁾

O aumento da incidência de candidíase oral por diferentes leveduras do gênero *Candida* sp. ^(11, 23, 32, 33) é conseqüência, principalmente, do uso difundido de antibioticoterapia de largo espectro de ação e do desenvolvimento de maior suporte de vida para os pacientes imunocomprometidos, o que os transforma em alvo das infecções oportunistas. ^(23, 25, 31, 34, 35) Ademais, há uma tendência crescente em isolar cepas de *Candida* “não - albicans”, como a *C. dubliniensis*, em especial nos pacientes infectados pelo HIV/doentes com AIDS. ^(11, 22, 36-39)

Conhecimentos sobre a infecção pelo HIV tornaram-se exigências importantes para os profissionais responsáveis pelos cuidados com a saúde oral. ⁽⁵³⁾ A susceptibilidade às infecções oportunistas nesses indivíduos depende do grau da imunossupressão determinada pelo vírus. De modo geral, as infecções oportunistas começam a aparecer quando a contagem de linfócitos TCD4+ está abaixo de 300 células para cada milímetro (mm³) de sangue. ⁽⁴⁰⁾

Nos pacientes infectados pelo HIV as lesões por *Candida* apresentam uma maior gravidade e uma resistência ao tratamento convencional. As lesões bucais são muito mais extensas e podem disseminar-se para o esôfago. Por sua vez, a presença de candidíase esofágica confere prognóstico ruim. ^(2, 31)

1.2. Interação de *Candida* sp. com o hospedeiro humano

A capacidade do gênero *Candida* em produzir enfermidades depende mais das condições imunológicas do hospedeiro do que propriamente de fatores de virulência dos fungos, o que os caracterizam como oportunistas. ⁽²⁾ Daí a necessária associação entre os fatores inerentes ao hospedeiro e aqueles específicos do patógeno para estabelecimento da infecção. ^(9, 22, 41, 42) Algumas das particularidades

fúngicas, em especial para os representantes patogênicos ao homem do gênero *Candida*, e dos elementos de resposta imune já foram descritos, entre eles:

Adesão

A adesão às mucosas é um passo necessário para a colonização que antecede a infecção, tanto local quanto disseminada. Diversos pesquisadores já observaram que quanto maior a capacidade de adesão maior a virulência da espécie. ^(32, 43)

São vários os mecanismos e fatores que determinam a adesão da *Candida* sp às diferentes superfícies. As glicoproteínas, estruturas presentes na superfície da parede fúngica, em especial as classificadas como manoproteínas, têm um papel importante nesse processo. Já os receptores presentes nas células do hospedeiro, que favorecem a adesão da célula fúngica são: a fibronectina de superfície celular e a fibrina. Outros fatores que também contribuem para a ligação tecidual da levedura são: a hidrofobia da superfície celular do fungo, o pH, a temperatura, o fenótipo da célula do hospedeiro, a presença de diabetes, a utilização de medicações tais como contraceptivos orais, dentre outras. ⁽⁴⁴⁾

Sabe-se que *C. albicans* é hidrófila quando cresce a 37°C, mas pode rapidamente tornar-se hidrófoba dependendo das condições do meio como, por exemplo, a exposição de sua superfície a proteínas hidrófobas. Por sua vez, os neutrófilos polimorfonucleares são capazes de destruir as leveduras hidrófobas dessa espécie, mas não as hidrófilas. Logo, as condições de hidrofilia são mais favoráveis para o processo de adesão da *Candida* sp. às mucosas. ⁽⁴⁵⁾

Invasão

O segundo passo na patogenia de *Candida* sp. após a adesão, é a invasão do epitélio. As hifas e tubos germinativos penetram na membrana das células epiteliais, provavelmente com o auxílio de enzimas secretoras. Essas enzimas podem ser de dois tipos: proteinases, que hidrolisam as unidades peptídicas e fosfolipases, que hidrolisam os fosfoglicerídeos. Uma vez nas células epiteliais, os microrganismos continuam os processos de germinação e crescimento. ⁽⁴³⁾

Defesa

As células T e a imunidade de mediação celular constituem os principais mecanismos de defesa contra as infecções das mucosas por *C. albicans* ⁽¹⁾ enquanto os linfócitos são as células de proteção contra as candidemias e as candidoses sistêmicas. A diminuição acentuada das células T, nomeadamente do tipo TCD4⁺, contribui decididamente para a localização superficial, nas mucosas, das infecções por *C. albicans*. ⁽³⁴⁾ Como resultado à invasão do patógeno às células epiteliais do hospedeiro há uma resposta inflamatória, isto considerando o indivíduo imunocompetente. Por outro lado, com o sistema imunológico debilitado, este processo inicial de invasão tecidual pode passar despercebido devido à ausência de uma reação inflamatória local. ⁽²⁾

Modulação da defesa

A influência de produtos e/ou estruturas fúngicas em defesas do hospedeiro é

um fator importante a ser considerado na patogênese das infecções por *Candida* sp. A função dos neutrófilos pode ser alterada por substâncias liberadas por hifas e pseudo-hifas. Uma diminuição da quimiotaxia e da capacidade de fagocitose das hifas de *Candida* sp. por parte dos neutrófilos já foi relatada e essa ação inibitória pode estar relacionada com a presença de proteínas de baixo peso molecular, localizadas na parede celular das leveduras. ⁽³⁴⁾ Já os glicanos, também situados na parede celular, prejudicam a capacidade de ligação dos neutrófilos. ⁽³⁵⁾ Há ainda uma falta de reatividade das células T aos antígenos de *C. albicans*, característica de pacientes com candidíase mucocutânea crônica. ^(32, 47)

1.3. Fatores predisponentes para a ocorrência da candidíase orofaríngea

A candidíase é uma patologia que ocorre mediante redução das defesas do indivíduo acometido. Geralmente, os fatores que favorecem o desenvolvimento da infecção associam-se à dieta, iatrogenia e ao trauma mecânico ⁴¹. Assim, próteses adaptadas inadequadamente e a má higiene oral propiciam maiores chances para a penetração e posterior colonização das leveduras do gênero *Candida*. As próteses dentárias podem induzir ao decréscimo do pH do meio e propiciam condições anaeróbias em decorrência da diminuição do fluxo de oxigênio e também de saliva na região que favorece o desenvolvimento das leveduras ^{41,44,45}.

1.4. A síndrome da imunodeficiência humana adquirida e a candidíase orofaríngea

Em 1981, o Centro para o Controle de Enfermidades (CDC), de Atlanta emitiu um boletim chamando a atenção sobre uma síndrome até então desconhecida que

acometia um grupo de jovens, brancos, homossexuais, residentes em Nova York, Los Angeles e São Francisco. Em março do mesmo ano, Gottlieb e colaboradores, publicaram um trabalho no qual descrevem uma série de casos de pneumonia pelo fungo *Pneumocystis carinii* além da candidíase de mucosa que acometiam uma população em especial: os homossexuais. A partir deste momento, reconheceu-se a síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA/AIDS) como sendo uma nova entidade nosológica. ⁽⁴⁸⁾

Desde então a AIDS avançou e tornou-se uma pandemia mundial (redundante). Somente em 2005, havia em todo o mundo 38,6 milhões de pessoas infectadas com o HIV, dos quais 2,8 milhões foram a óbito pela doença. Aproximadamente 11.000 novos casos de AIDS aconteceram por dia no ano de 2005 sendo que mais de 95% das notificações ocorreram a partir de países de baixa e média renda financeira. ⁽⁴⁹⁾

Diversos estudos evidenciam que a AIDS está associada às múltiplas infecções oportunistas, entre as quais as fúngicas. ^(9, 43, 48, 50-52) As candidoses orais, esofágicas, brônquicas e pulmonares foram precocemente reconhecidas como importantes marcadores universais de infecção pelo HIV. Nessas afecções, *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada, todavia a emergência de espécies “não-albicans” tem sido referida por diferentes autores. ^(9, 42, 43, 50-53) Diante dessa realidade é fundamental conhecer a microbiota oral, tanto de indivíduos sãos quanto imunocomprometidos, bem como a biologia e a patogenia das espécies de *Candida* isoladas, a fim de aperfeiçoar o diagnóstico e a terapia das infecções decorrentes.

1.5 Terapêutica por Antifúngicos e Resistência Microbiana

São quatro as classes de fármacos disponíveis na terapêutica de infecções fúngicas: os derivados poliênicos, derivados pirimidínicos, o grupo dos azóis e as equinocandinas. Os poliênicos e os azólicos são medicações que atuam na membrana celular fúngica, os derivados pirimidínicos impedem a síntese do ácido dextrorribonucleico (DNA) e do ácido ribonucleico (RNA) no núcleo da célula fúngica e as equinocandinas, por sua vez, atuam especificamente na parede celular, impedindo a formação da mesma. As equinocandinas têm ação fungicida enquanto os azólicos e os pirimidínicos apresentam efeito fungistático. ^(54, 55)

A anfotericina B é o principal representante do grupo dos poliênicos. Tem um amplo espectro de atividade (leveduras, fungos micelares, oportunistas e fungos patogênicos) e devido a sua alta eficácia é classificada como padrão ouro no tratamento de micoses profundas. Entretanto, seu uso é limitado devido à alta toxicidade. Logo, há grande interesse no desenvolvimento de formulações que mantenham a sua atividade com melhor tolerância. ^(56, 57) Já os medicamentos azólicos, especialmente o fluconazol e o itraconazol, possuem boa biodisponibilidade e baixa frequência de efeitos adversos. Porém, esses medicamentos possuem certa limitação de uso devido à ineficácia contra fungos filamentosos e algumas espécies de *Candida* que apresentam resistência intrínseca aos mesmos. ^(35, 57-59)

Nos pacientes com a doença AIDS manifesta, apesar do sucesso na terapêutica, há o risco de ocorrer falha quando o uso desse antifúngico estende-se por longos períodos. ^(58, 60-63) De fato, Morschhäuser et al. ⁽⁶³⁾, observaram na análise de isolados de *C. albicans*, obtidos a partir de pacientes com infecções recorrentes,

que a resistência ao fluconazol ocorre nas mesmas cepas que antes eram suscetíveis a essa droga. Ademais, diferentes estudos foi verificado que as cepas de *C. albicans* são substituídas por outras espécies, com diferentes perfis de sensibilidade, ao longo da exposição do paciente à droga. ⁽⁵⁷⁻⁶²⁾

A falha terapêutica aos medicamentos antifúngicos depende tanto de fatores inerentes ao hospedeiro quanto da droga utilizada, além das características peculiares da resposta da espécie e/ou cepa em questão ao fármaco utilizado. ⁽⁵⁷⁾ Tal ocorrência pode ser verificada na prática clínica ou ainda *in vitro*. A resistência de verificação clínica pode ser resultado do baixo nível de medicamento no tecido e na corrente sangüínea, em virtude tanto da interação medicamentosa quanto pela deficiência imunológica. Já a resistência *in vitro* geralmente é secundária, ou seja, cepas susceptíveis tornam-se resistentes devido a um contato anterior com a medicação antifúngica. ^(35, 57, 58, 64)

O conhecimento dos mecanismos moleculares de resistência microbiana aos distintos grupos de antifúngicos é essencial à construção de estratégias adequadas de planejamento do esquema terapêutico e também ao desenvolvimento de novos medicamentos. ^(57, 62-65)

Os episódios recorrentes de candidíase orofaríngea associados ao tratamento prévio com antifúngicos são importantes fatores de risco para o aparecimento de resistência secundária aos azólicos, principalmente em relação ao fluconazol. ⁽⁶⁵⁾ Acrescida à questão da resistência adquirida está a possibilidade de infecção por espécies cuja resistência à droga utilizada é intrínseca, como é o caso de *C. glabrata* e *C. krusei*, intrinsecamente resistentes ao fluconazol, e de *C. lusitanae* e *C. guilliermondii*, que são naturalmente menos sensíveis à anfotericina B. ⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾

Além disso, foi observada uma tendência de substituição das cepas de *C. albicans* por espécies “não albicans” em pacientes soropositivos para o HIV, principalmente entre aqueles que são submetidos a longos períodos de tratamento com drogas antifúngicas. Nesse tópico, chama a atenção a observação de que *C. dubliniensis* tende a substituir *C. albicans* em pacientes com AIDS e candidíase orofaríngea que foram previamente tratados com fluconazol. ⁽³⁵⁾

Alguns pesquisadores defendem a idéia de que a resistência de *Candida* sp. aos medicamentos do grupo dos azóis deva-se a uma pressão seletiva ocasionada pelo uso dessas drogas na profilaxia ou no tratamento da candidíase e da candidemia. Por isso, diante das evidências que sugerem falhas terapêuticas, há a necessidade de mensurar a sensibilidade das cepas isoladas a partir do foco de infecção frente às drogas antifúngicas disponíveis. ⁽⁶⁵⁾

Por fim, uma vez que o isolamento dos agentes leveduriformes do gênero *Candida* sp. tem fornecido resultados que mostram importante mudança qualitativa nas espécies que compõe a microbiota oral e considerando-se o distinto perfil de sensibilidade antifúngica das mesmas, a identificação da espécie deve ser considerada antes mesmo do início da terapia empírica. ^(8, 23, 32, 46)

1.6. Objetivo

1.6.1. Objetivo Geral

Considerando o acima exposto o presente estudo teve por objetivo avaliar *Candida* sp. isolada a partir da microbiota oral de pacientes soropositivos para o HIV-1 e em doentes de AIDS além do respectivo grupo controle.

1.6.2. Objetivos Específicos

Constituem objetivos específicos deste trabalho:

- a) Determinar e comparar a taxa de colonização / infecção por diferentes espécies do gênero *Candida* sp nas populações pesquisadas.
- b) efetuar a triagem molecular de *Candida dubliniensis* entre as cepas fenotipicamente tipadas como *C. albicans*;
- c) comparar, entre os grupos estudados, o perfil de sensibilidade antifúngica de *Candida* sp. isoladas frente às drogas: fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B;
- d) identificar os possíveis fatores de risco associados à colonização/infecção por essas leveduras.

2. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

2. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

2.1. Casística

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (**Apêndice 1**), foi efetuada a raspagem da mucosa oral de 52 pacientes portadores do HIV, com a doença AIDS manifesta ou não, atendidos no ambulatório de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs) ou internados no Setor de Doenças Infecto-Parasitárias do Hospital de Base de São José do Rio Preto, utilizando-se um swab estéril e água estéril de transporte. As amostras foram imediatamente encaminhadas ao Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) para processamento. Os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos a partir dos prontuários e durante a entrevista, sendo em seguida anotados em ficha apropriada (**Apêndice 2**) e posteriormente registrados em base de dados.

Paralelamente à coleta realizada no grupo de pacientes, foram coletadas amostras a partir do mesmo número de indivíduos saudáveis, recrutados entre alunos e funcionários da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), pareados por etnia, idade e sexo, para constituir o grupo controle.

O projeto foi elaborado de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10 de outubro de 1996) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da FAMERP, conforme protocolo nº 5386/2002 (**Apêndice 3**).

2.2. Elaboração do estudo

De março de 2005 a junho de 2006, foram abordados os indivíduos soropositivos para o HIV, atendidos e/ou internados no Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São José do Rio Preto, SP. Para cada um dos 52 pacientes abordados, foi preenchida a ficha epidemiológica compreendendo dados demográficos, epidemiológicos e clínicos, obtidos em entrevista e/ou a partir do prontuário de cada um.

Para o quesito etnia, considerou-se a avaliação visual da cor da pele além da cor e tipo dos cabelos bem como a ascendência até duas gerações anteriores.

O abuso de bebida alcoólica foi verificado nos doze meses que antecederam a entrevista. Considerou-se a ingestão igual ou superior a 30 gramas/álcool/dia como consumo abusivo, valor esse correspondente a duas garrafas de cerveja, a três copos de vinho ou a duas doses de bebida destilada ou aguardente.⁽⁶⁷⁾

A análise microbiológica foi realizada no laboratório de pesquisa Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São José do Rio Preto, SP e no Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

2.3. Coleta das amostras

A coleta de material da cavidade oral dos pacientes foi realizada durante a visita ao setor de internação ou durante as consultas ambulatoriais. As amostras foram coletadas utilizando-se um swab estéril embebido em água estéril destilada. Foi efetuada a raspagem de toda a superfície da cavidade oral, incluindo as

mucosas, palato e língua. Após esse procedimento, os swabs foram acondicionados em tubos estéreis próprios para o transporte e encaminhados ao Centro de Investigação de Microrganismos (CIM).

2.4. Isolamento e identificação das leveduras

2.4.1. Isolamento e identificação fenotípica

O material obtido foi semeado a partir do próprio swab em placa de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrosado® (Biobrás). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30° C por até 72 horas, sendo verificado o crescimento a cada 24 horas. ⁽¹⁴⁾ Quando observada a produção de colônias, as mesmas foram selecionadas quando apresentavam características macromorfológicas correspondentes àquelas dos fungos leveduriformes, a saber: colônias globosas, ovaladas ou oval-alongadas, de cor branco a amarelada e com ou sem bordas em franja. ⁽⁶⁸⁾

Com os objetivos de realizar a identificação presuntiva assim como de investigar a possibilidade de colonização e/ou infecção mista, os isolados obtidos foram ressuspensos em tubo com água destilada estéril e semeados novamente em meio CHROMagar Candida® (CHROMagar Candida Microbiology, Biomerieux Paris, França), com posterior incubação a 30° C, por até cinco dias. A formação das colônias foi acompanhada a partir de 48 horas de incubação, seguida de diferenciação segundo cores e tonalidades distintas para direcionamento da posterior identificação particular. ⁽⁶⁹⁾

2.4.1.1. Prova do Tubo Germinativo

Com a finalidade de realizar a triagem fenotípica entre as leveduras das espécies *Candida albicans* e *C. dubliniensis* das demais do mesmo gênero, as cepas obtidas foram inoculadas em tubo contendo 0,5 ml de soro humano, submetido a incubação em banho maria a 37° C, por até três horas..Em seguida, uma gota da suspensão de leveduras foi visualizada em microscópio óptico (1000X) para verificar se houve ou não formação do tubo germinativo. ⁽¹⁵⁾

2.4.1.2. Prova do Microcultivo

Dada a propriedade de filamentação dos fungos após semeadura em meio contendo Tween-80, com a formação de pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras, além de outras estruturas particulares a cada espécie, foi realizada a prova do microcultivo como recurso adicional para identificação das leveduras obtidas. O meio utilizado foi o agar Corn Meal CM 103® (Oxoid) acrescido de Tween 80 P.S. ® (Vetec). Com auxílio de uma agulha de níquel-cromo, tocou-se na colônia e a partir daí realizou-se três estrias em paralelo, que foram cobertas com lamínula estéril. Após 48 a 72 horas de incubação à 25° C, os aspectos micromorfológicos foram observados por meio da microscopia óptica (100X e 400X). ⁽⁷⁰⁾

2.4.1.3. Avaliação do Perfil Bioquímico

As leveduras cuja identificação não pode ser finalizada com os métodos supra-

citados, foram submetidas à análise do perfil bioquímico de assimilação e fermentação de carboidratos pelo kit comercial denominado API ID32C AUX (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), segundo instruções do fabricante. ⁽¹⁶⁾ O resultado final foi expresso em porcentagens para cada uma das espécies isoladas após inserção dos resultados obtidos em “software” API ID32C AUX, desenvolvido pela mesma empresa.

2.4.2. Triagem molecular de *Candida dubliniensis*

A fim de investigar a presença de *C. dubliniensis* dentre as leveduras fenotipicamente tipadas como *C. albicans*, foi efetuada a triagem molecular em todos os isolados pertencentes à segunda espécie e que apresentaram clamidósporos em *triplets* após o microcultivo e/ou perfil bioquímico sugestivo após identificação pelo kit API ID32C AUX (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France).

Para tanto, o protocolo de fenol-clorofórmio precedido pela adição de pérolas de vidro (Glass Beads, Sigma) foi realizado para extração do DNA genômico. O mesmo é realizado a partir da inoculação de colônias de fungos em meio ágar sabouraud por até 3 dias a 30°C. Após esse período, as colônias obtidas são transferidas para um eppendorf de 2ml, contendo 500µl de TENTS. São adicionados 200 µl de pérolas de vidro (previamente separadas e autoclavadas), 500µl de fenol e 500µl de clorofórmio respectivamente. A mistura é então agitada no vortex por 2 minutos e centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos. A seguir remove-se a fase superior com pipeta automática para um novo eppendorf (2ml) previamente identificado e adiciona-se 500µl etanol 100% (Merck) gelado. Então precipita-se o DNA a -20°C por uma hora (ou overnight) e faz-se a centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos.

Decorrido o tempo, o sobrenadante é descartado por inversão. O pellet é ressuspenso batendo de leve no tubo, em 500µl TE com RNase na concentração de 50µg/ml. Incuba-se a 37°C por 30 minutos em banho-maria e a seguir, adiciona-se 500µl de fenol, 500µl de clorofórmio respectivamente e centrifuga-se a 13.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa é transferida com pipeta automática, para novo eppendorf de 1,5ml previamente identificado. Para a precipitação adiciona-se 20µl de NaCl (5M), 500µl etanol 100% (Merck) gelado e submete-se a - 20°C por uma hora (ou overnight). Após esse tempo, centrifuga-se a 13.000 rpm por 15 minutos. A seguir descarta-se o sobrenadante por inversão. No tubo adiciona-se 500µl de etanol 70% (Merck) gelado e então centrifuga-se a 13.000 rpm por 15 minutos. Novamente o sobrenadante é descartado por inversão.

Para a eluição, o DNA é ressuspenso em 40µl de TENTS (batendo de leve no tubo). O armazenamento é feito no próprio tubo a - 20°C.

⁽⁸³⁾ Após, para distinguir *C. albicans* de *C. dubliniensis* baseando-se na diferença das seqüências gênicas espaçadoras transcritas internas 1 (ITS1) e 2 (ITS2) e do DNAr 5,8S fúngico, foi realizada a PCR-RFLP (PCR-polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição), segundo previamente publicado ⁽⁷¹⁾, com modificações. Resumidamente, em tubo “eppendorf” atingindo volume final de 50 µl foram adicionados: tampão de PCR 1X (Tris-HCl 10mM, KCl 50 mM, pH 8,3; Invitrogen), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 200 nM de cada *primer*, 50 µM de solução de dNTPs, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 5 µl de DNA genômico e água millipore (Milli-Q) destilada, esterilizada. Todos os experimentos incluíram o DNA de *C. tropicalis* como controle externo e negativo da restrição enzimática e DNA de *C. dubliniensis*, como controle positivo. Adicionalmente, foi acrescentado um tubo contendo somente o *mix* de reação para verificação de possível contaminação

dos reagentes. Os produtos da PCR foram visualizados em transiluminador com raios ultravioletas (UV) em gel de agarose 2% (GIBCO-BRL) corado com brometo de etídeo (GIBCO-BRL), após eletroforese em voltagem constante de 110 V por 40 minutos.

Os produtos da PCR foram então submetidos à incubação conjunta com a enzima de restrição *MwoI* (New England Biolabs, Canada) por 2 horas a 60 °C e, após, visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo sob iluminação UV.

2.5. Armazenamento das cepas

Todas as cepas obtidas a partir da raspagem da mucosa oral de pacientes soropositivos para o HIV e/ou doentes com AIDS e demais indivíduos do grupo controle, foram armazenadas em tubos de ensaio de 125 x 10 mm, com tampa de rosca, contendo aproximadamente cinco ml de Agar Sabouraud Dextrosado® (Biobrás) e incubadas em estufa bacteriológica a 30°C. A cada dois meses essas cepas foram repicadas em câmara de fluxo laminar, com o objetivo de manutenção da micoteca formada. Com a mesma finalidade, o congelamento das mesmas foi também realizado através do repique e inoculação em tubos de criopreservação com capacidade de 1,5 ml, contendo meio específico para o congelamento de fungos. Cada cepa foi congelada em triplicata, sendo que após dois meses em freezer a -20°C, dois tubos foram transferidos para o freezer a -70°C do CIM-FAMERP.

2.6. Testes de susceptibilidade aos antifúngicos

Os métodos de disco difusão e microdiluição foram empregados para a obtenção do perfil de sensibilidade aos antifúngicos das cepas de *Candida* sp. isoladas durante este estudo.

2.6.1. Método de difusão em disco

Para realização da técnica em disco difusão (M44-P, NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards), foi preparada de cada isolado fúngico uma suspensão em solução salina (0,85%) com turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland. Após, realizou-se a semeadura em agar Muller Hinton (Difco) acrescido de azul de metileno (Synth) e dextrose (Chemeco), seguida da adição dos discos (Cecon®) contendo as seguintes drogas: fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a uma temperatura de 35°C por até 72 horas, sendo que a cada 24 horas efetuou-se a medida do halo de inibição. ⁽⁷²⁾ Os critérios de resistência, sensibilidade intermediária e sensibilidade foram estabelecidos segundo o protocolo padronizado, descrito pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards; **Apêndice 4**).

2.6.2. Microdiluição

Todas as leveduras obtidas durante o estudo foram avaliadas quanto ao perfil de sensibilidade frente às drogas: fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B,

pela metodologia de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do documento M27-A2 do NCCLS sendo que foram utilizados como cepas padrões: *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 ⁽⁷²⁾. Tais experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

A partir de um cultivo de 24 a 48 horas da levedura a ser testada, foi preparada uma suspensão inicial cuja turbidez foi medida em espectrofotômetro, à 530 nm, com transmitância ajustada para 90%, equivalendo a uma suspensão com 1×10^6 células/ml. A seguir, para obtenção do inóculo final contendo $0,5 \times 10^2$ células/mL, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI – 1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, EUA) suplementado com L-glutamina e 20g/L de glicose, tamponado com solução de 0,165M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), em pH 7,0, a partir da suspensão inicial.

Os antifúngicos, por sua vez, foram diluídos a concentrações pré determinadas ⁽⁶³⁾ de acordo com os seguintes intervalos: anfotericina B (Bristol-Myers Squibb): de 0,03 µg/mL a 16 µg/mL; cetoconazol (Neo-Quimica): de 0,03 µg/mL a 16 µg/mL; itraconazol (Jansen Pharmaceutica): de 0,03 µg/mL a 16 µg/mL e fluconazol (Pfizer): de 0,125 µg/mL a 64 µg/mL. As dez concentrações de cada antifúngico foram diluídas a 1:5 em RPMI-1640 e alíquotas de 100 µL de cada uma dessas concentrações foram dispensadas sequencialmente, cada droga em uma placa de microtitulação de 96 poços (Corning Inc. Costar), preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. A seguir, foram adicionados 100 µL do inóculo final a cada poço das placas de microtitulação contendo as dez diferentes concentrações dos antifúngicos, chegando-se às concentrações finais desejadas.

Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 35° C, por 48 horas. A menor concentração capaz de induzir a inibição em torno de 80% do crescimento da levedura testada, em relação ao poço controle, foi identificada com a CIM para os respectivos antifúngicos testados. Com base em grande acervo de dados do fabricante de fluconazol, foram estabelecidos pontos de corte para a interpretação dos resultados com *Candida* sp. e fluconazol e também para o itraconazol (Apêndice 5).

2.7. Análises estatísticas

Todas as informações pesquisadas em entrevista e por meio da consulta de prontuários, assim como aquelas resultantes da análise microbiológica, foram armazenadas em planilha de dados Microsoft Excel (versão 2003). As análises estatísticas foram realizadas no programa EPIINFO 6 (CDC, Atlanta).

Para obter a independência entre as proporções foi utilizado o teste do Qui-quadrado e o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5%.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. População estudada

3.1.1. Grupo paciente

Um total de 52 indivíduos soropositivos para o HIV/doentes com AIDS foi abordado para compor o grupo “paciente” desta pesquisa. A média de idade nesse grupo foi de 42,71 anos com desvio padrão (s^2) igual a 10,37 variando de 22 a 73 anos com maior concentração de pessoas entre 40 a 50 anos de idade, para ambos os sexos (**Figura 5**). Aproximadamente 61 por cento (%) pertencem ao sexo masculino e 39% ao sexo feminino e, com relação ao grupamento étnico, 21% dos pacientes foi classificado como negróide e 79% como caucasóide. Quanto ao local de residência, a grande maioria (92%) residia na cidade e/ou região de São José do Rio Preto, SP. Pouco mais da metade deles foi abordada durante o período de internação enquanto que a outra em ambulatório sendo que, para os primeiros, o tempo de hospitalização variou de um a 14 dias com média (\bar{X}) igual a 6,7 dias. Já o tempo médio de diagnóstico positivo para o HIV-1 foi de 6,72 anos, variando de um mês a vinte anos. A pesquisa do “status” imunológico forneceu contagem de células TCD4⁺ variando de 2 unidades por milímetro cúbico (U/mm³) de sangue a 1130 U/mm³ (\bar{X} =232,44 e s^2 =270 U/mm³), enquanto que a média da carga viral foi de 56260,8 cópias do HIV-1/mm³.

Sobre os cuidados com a higiene oral, aproximadamente 42% dos pacientes declarou ter uma má qualidade na execução da profilaxia dentária e metade deles

era usuário de prótese dentária. Em relação ao uso de substâncias ilícitas, sete indivíduos confessaram consumir drogas injetáveis. Já o hábito de ingerir bebidas

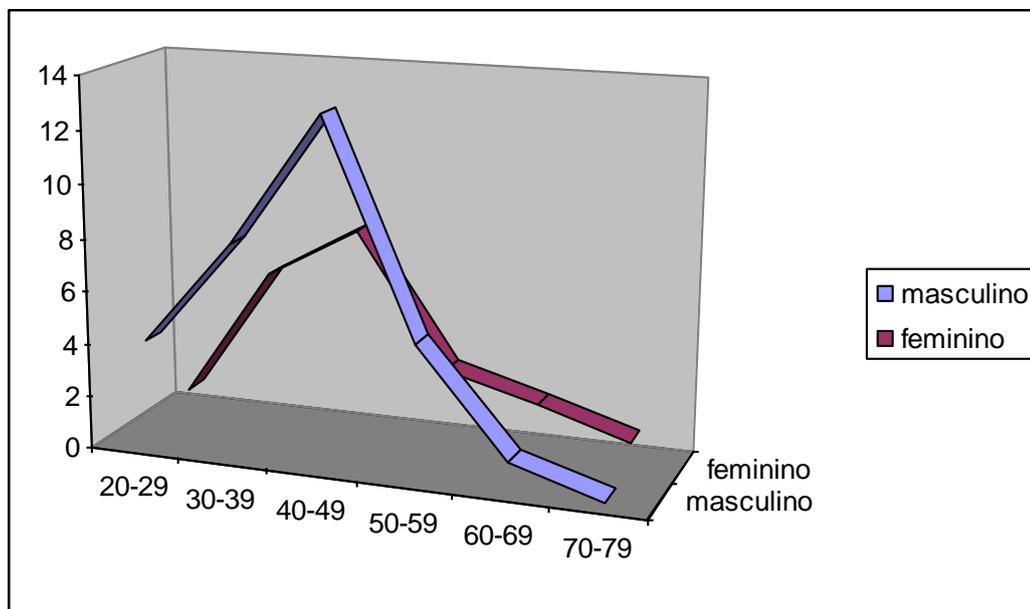


Figura 5: Distribuição dos pacientes soropositivos para HIV/doentes com AIDS segundo a idade e o sexo.

alcoólicas de modo abusivo (30gramas/álcool/dia) foi verificado em torno de 29% dos pacientes.

Sobre o histórico clínico médico-hospitalar, nenhum dos indivíduos do grupo “paciente” necessitou de quaisquer tipo de transplante. Porém, em relação à transfusão de sangue, dez deles (19,23%) foram submetidos a esse procedimento, pelo menos uma vez. Um total de 27 pacientes necessitou internação nos últimos doze meses, sendo que 11 desses passaram pela unidade de terapia intensiva (UTI) pelo menos uma vez no curso da doença, com média de permanência na mesma de aproximadamente 15 dias ($\bar{X} = 14,71$ dias).

A candidíase orofaríngea (COF) foi verificada em oito pacientes no momento da coleta. Do mesmo modo, a minoria deles referiu história pregressa de infecção por esse patógeno: sete informaram pelo menos um episódio, três tiveram

candidíase esofágica, enquanto 34 deles afirmaram nunca terem tido ou ainda que não se lembravam (**Figura 6**).

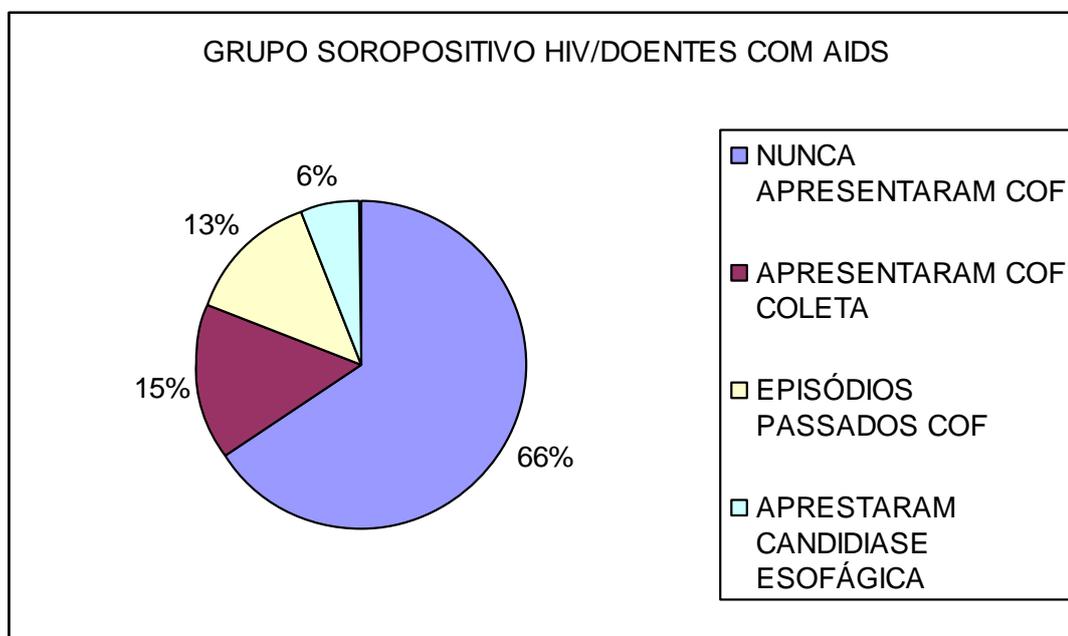


Figura 6: Distribuição percentual do grupo soropositivo para o HIV/doentes com AIDS de acordo com a manifestação atual e/ou pregressa de candidíase orofaríngea (COF) e/ou de candidíase esofágica.

Cerca de 90% dos indivíduos soropositivos para o HIV/doentes de AIDS foi acometido nos doze meses antecedentes ao estudo por diversas comorbidades, entre elas a Candidíase orofaríngea, hipertensão arterial, hepatite C, herpes zóster, neurotoxoplasmose, neoplasias, citomegalovirus, hepatite B, herpes simples, candidíase esofágica e a neutropenia foram as mais frequentes (**Figura 7**).

No que se refere à terapia antimicrobiana, observou-se que cerca de 60% dos pacientes foi previamente submetido à terapia antibacteriana, 18 deles à antifúngica, sendo a classe dos azóis a mais prescrita (33%). Para aproximadamente 27% dos indivíduos foi administrada uma associação entre azóis e não azóis. Já em relação à

terapia antiretroviral, mais da metade (67,3%) utilizava esses fármacos dos quais 46% pertencia à classe dos inibidores de proteases (IPs).

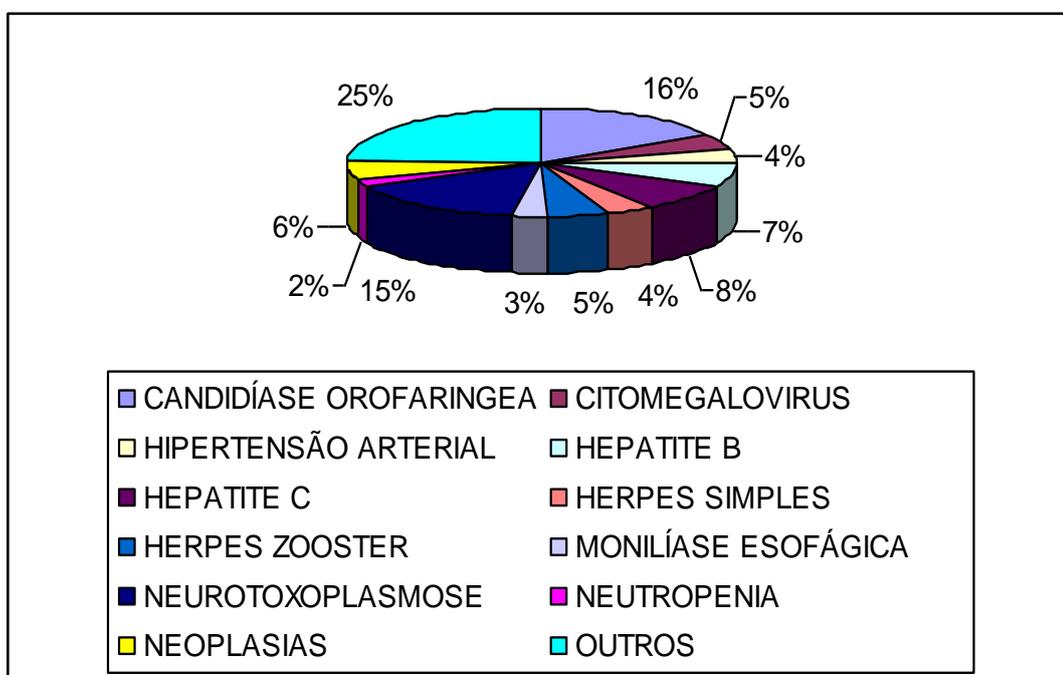


Figura 7: Porcentagens de distribuição dos pacientes soropositivos para do HIV/doentes com AIDS por comorbidades apresentadas nos últimos 12 meses anteriores à inclusão neste estudo.

3.1.2. Grupo controle

A média de idade do grupo controle foi de 42,71 anos ($\bar{X}=42,71$) com desvio padrão de 10,47 anos ($s^2=10,47$). Quanto ao gênero, a maioria (em torno de 61%) pertence ao sexo masculino e a faixa etária mais prevalente foi a de 40 a 50 anos de idade, sendo que aproximadamente 81% dos indivíduos foi classificado como caucasóide e os demais como negróides. Todos residiam em São José do Rio Preto.

Cerca de 19% dos entrevistados fazia uso de prótese dentária e 81% realizava, de modo adequado, sua higiene oral. Quatro indivíduos referiram hábito elitista mas nenhum deles declarou ser usuário de drogas injetáveis. Apenas um deles é

portador de diabetes mellitus tipo II. Aproximadamente 7% do grupo necessitou internação em UTI com tempo médio de permanência de oito dias. Nenhum componente desse grupo apresentou sinais clínicos de CO no momento da coleta e também não houve relato de história anterior de episódios dessa infecção.

3.1.3. Comparação entre os grupos estudados

O maior índice no uso de prótese dentária foi verificado no grupo HIV/AIDS que também realizava higiene bucal de modo insatisfatório (Qui-quadrado, $P = 0,019$

Figura 8).

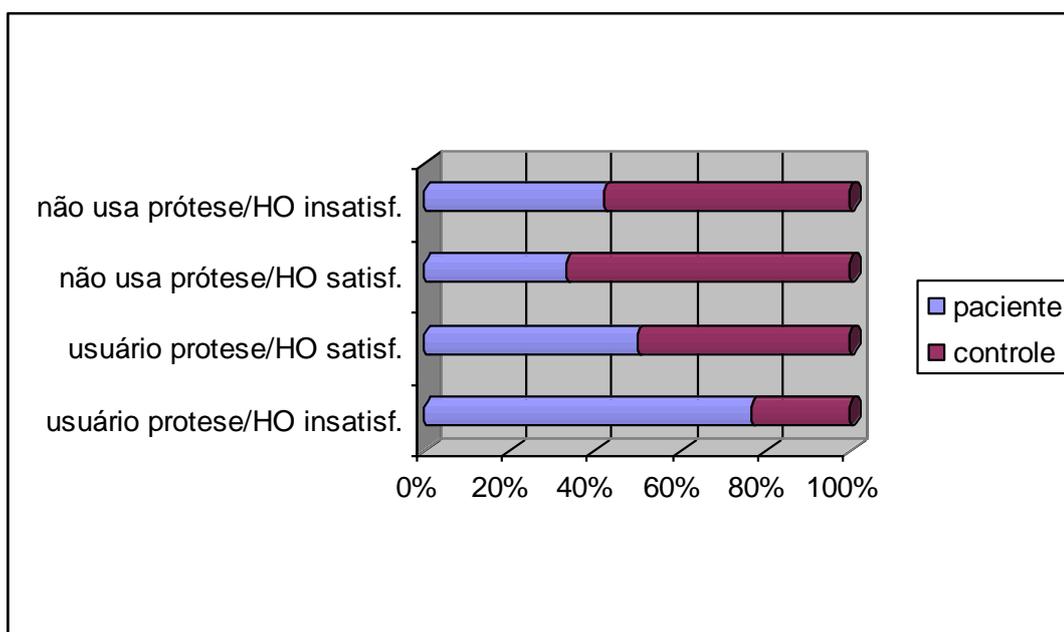


Figura 8: Caracterização percentual de pacientes e indivíduos do grupo controle, segundo o uso de prótese dentária e qualidade da higiene oral (HO) como sendo satisfatória (satisf.) ou insatisfatória (insatisf.).

Além disso, o mesmo grupo apresentou maior frequência de etilistas (Qui-quadrado, $P = 0,011$), o que ocorreu também em relação ao uso de terapia

antimicrobiana (cerca de 63% em pacientes versus 2% grupo controle) e antiretrovirais (84,5% em pacientes versus zero grupo controle (**Tabela 1**))

Tabela 1. Características sócio-demográficas e clínico-epidemiológicas dos portadores do HIV-1/doentes com AIDS e respectivos controles.

Variável	Pacientes		Grupo Controle		P
	(n= 52)	%	(n= 52)	%	
Higiene Oral					
Satisfatória	30	57,6	42	80,7	0,019*
Insatisfatória	22	42,4	10	19,3	
Prótese Dentária					
Sim	26	50	10	19,2	0,002*
Não	26	50	42	80,8	
Uso de Drogas Injetáveis					
Sim	7	13,5	0	0	0,006**
Não	45	86,5	52	100	
Etilista					
Sim	15	28,8	4	7,6	0,011*
Não	37	71,2	48	92,3	
Candidíase Orofaríngea					
Sim	8	15,4	0	0	0,005**
Não	44	84,6	52	100	
Internação (prévia ou atual)					
Sim	27	51,9	4	7,7	<0,001*
Não	25	48,1	48	92,3	
Terapia Antimicrobiana ⁺					
Sim	33	63,5	1	1,9	<0,001*
Não	19	36,5	51	98,1	
Uso da HAART					
Sim	35	67,3	0	0	<0,001*
Não	17	32,7	52	100	

⁺Antibacterianos e/ou Antifúngicos

*Qui-quadrado

**Teste Exato de Fischer

3.2. Isolamento de *Candida* sp.

3.2.1. Grupo Paciente

O índice de colonização/infecção por *Candida* sp. entre os pacientes foi de aproximadamente 77% (n=40). Das 46 cepas isoladas, 36 (78,3%) foram identificadas como *C. albicans* e 10 (21,7%) como *Candida* “não albicans” as quais

foram assim tipadas: duas cepas de *C. krusei*, duas de *C. inconspícua*, duas de *C. tropicalis*, duas de *C. dubliniensis* e, finalmente, uma como *C. guilhermondii* e uma como *C. famata*. No entanto, as duas cepas com perfil fenotípico sugestivo de *C. dubliniensis* (clamidósporos em triplets e/ou perfil bioquímico em API 20IDAUX) pertencem à espécie *C. albicans*, conforme determinado pela metodologia molecular de PCR-RFLP (**FIGURA 9**).

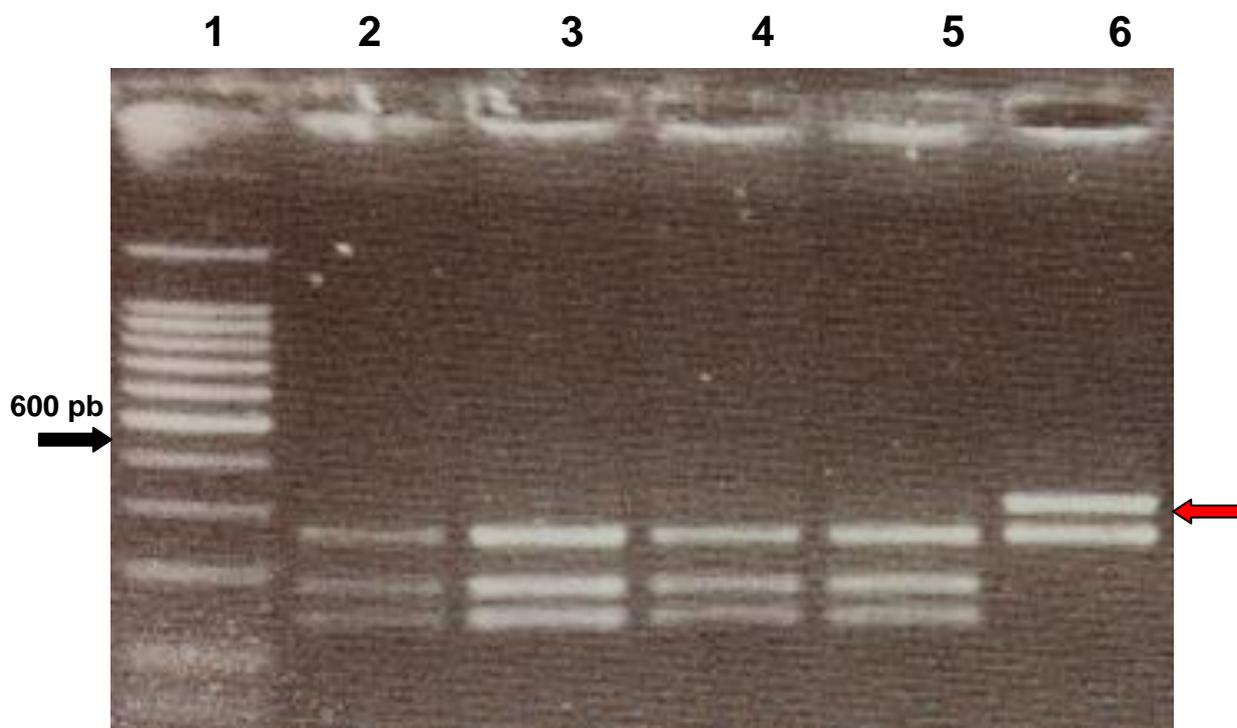


FIGURA 9: Padrões de RFLP dos produtos de PCR do DNA codificador do RNA ribossômico (DNAr) 18S e 5,8S e região espaçadora transcrita interna 1 (ITS1) de *Candida* sp. 1: Marcador de peso molecular “100 bp DNA Ladder” (Gibco-BRL); 2 e 3: *Candida albicans* (CA) com perfil fenotípico de *C. dubliniensis*; 3 e 4: CA (controle positivo) e 5: *C. dubliniensis* (CD; controle positivo). CA = 3 bandas com 141, 184 e 261 pares de bases (pb) e CD = 2 bandas com 325 pb e 265 pb (seta vermelha). Os produtos do RFLP foram visualizados sob iluminação UV após eletroforese em gel de agarose 25 corado com brometo de etídeo.

As duplas colonizações foram verificadas em aproximadamente 17% desses pacientes que estiveram colonizados e/ou infectados por *Candida* sp. tendo sido observadas as seguintes associações: *C. krusei* + *C. dubliniensis* (cerca de 14%), *C.*

albicans + *C. dubliniensis* (cerca de 14%), *C. albicans* + *C. krusei* (cerca de 14%), *C. albicans* + *C. guilhermondii* (cerca de 14%), *C. albicans* + *C. famata* (cerca de 14%) e, por fim, *C. albicans* + *C. inconspicua* (cerca de 30%).

Foi possível constatar que os pacientes internos estiveram mais colonizados/infectados em relação aos não internos ($p < 0,002$), (**Figura 10**) sendo que, dentre os hospitalizados, cerca de 81% (22) era portador de *Candida* sp. Dentre esses, cerca de 23% apresentou candidíase oral no momento da coleta. Por sua vez, a partir da mucosa oral dos pacientes internados não acometidos pela candidíase oral no momento da coleta ($n=17$), foram isoladas cepas colonizantes de *C. albicans* em quinze deles e, em um outro, *C. tropicalis*, ao passo que para um paciente foram obtidos isolados de *Candida* “não albicans” em colonização mista (*C. albicans* + *C. guilhermondii*).

Já nos portadores do HIV/doentes com AIDS não internos (25), 72% estava colonizado (16) ou infectado (2) por *Candida* sp. Nesses últimos, foram isoladas *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente, ao passo que naqueles oralmente saudáveis, foram obtidas as seguintes espécies: *C. albicans* em doze deles, *C. tropicalis* em um paciente e duplas colonizações por *Candida* sp. em três outros (*C. albicans* + *C. famata*, *C. albicans* + *C. krusei*, e *C. albicans* + *C. inconspicua*).

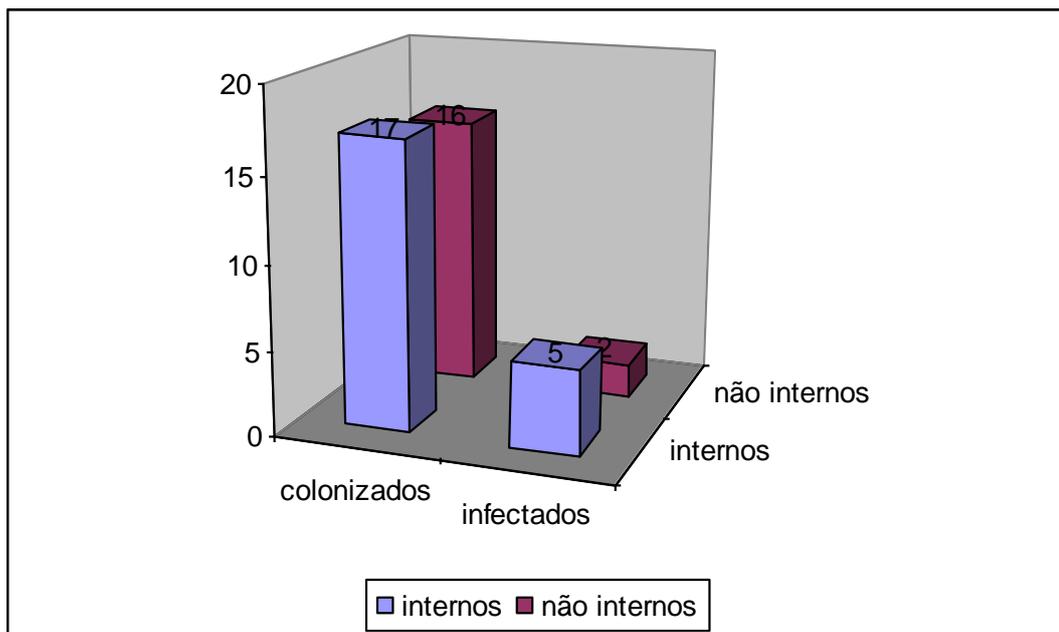


Figura 10: Colonização/infecção por cepas de *Candida* sp. em números absolutos nos pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS, internos e não internos.

3.2.1.1. *Candida* sp. versus características clínico epidemiológicas

Dos pacientes que estavam colonizados/infectados somente por *C. albicans*, aproximadamente 63% era interno, 19% apresentava manifestações clínicas de candidíase orofaríngea, 63% era usuário de prótese dentária, 60% realizava a higiene oral de modo satisfatório, 22% era usuário de drogas injetáveis, 22% possuía hábito etilista, 84% fazia uso de fármacos antiretrovirais, 56% estava sob tratamento com antibióticos e 44% com antifúngicos. Dentre os que consumiam bebidas alcoólicas abusivamente (15), sete estavam colonizados e dois infectados por *Candida* sp.

Somente dois indivíduos soropositivos para o HIV/doentes com AIDS estiveram colonizados por uma única espécie de *Candida*, a *C. tropicalis*. Esses dois componentes do grupo paciente não eram internos, ambos do sexo masculino, um era usuário de prótese dentária e o outro ingeria bebida alcoólica de modo abusivo.

No entanto, os dois não realizavam a higienização da cavidade bucal adequadamente (insatisfatória), não eram usuários de drogas injetáveis, não apresentavam história pregressa de infecção orofaríngea por *Candida* sp., faziam uso de terapia antiretroviral e, por fim, estavam em vigência de antibioticoterapia.

Trinta e cinco indivíduos do grupo paciente (aproximadamente 67%) faziam terapia antiretroviral, sendo, que desses, vinte e oito foram colonizados por *C. albicans* (cerca de 80%) e quatro (cerca de 9%) por “não albicans”. Dos 23 pacientes submetidos à antifungoterapia, vinte e dois (aproximadamente 96%) foram colonizados por *C. albicans* e um apresentou colonização por associação de duas espécies desse gênero (*C. albicans* e *C. inconspicua*). No total, dos 19 pacientes que foram submetidos a tratamentos por antiretrovirais e antifúngicos simultaneamente, (cerca de 95%) dezoito deles foram colonizados por cepas de *Candida* sp., sendo que apenas um deles (cerca de 5%) foi colonizado por espécie “não albicans” (*C. inconspicua*).

Dos indivíduos soropositivos para o HIV/doentes com AIDS que apresentaram dupla colonização por *Candida* sp., metade é do sexo masculino, metade era usuária de prótese dentária, cerca de 33% estava interno, 33% realizava a higienização oral de modo inadequado, 67% consumia bebidas alcoólicas de modo abusivo, 33% manifestava candidíase oral no momento da coleta, 67% foi submetido à antibioticoterapia, 33% à antifungoterapia e 67% estava medicado com drogas antiretrovirais.

As cepas de *C. inconspicua* foram isoladas a partir de dois pacientes sendo um interno e o outro não, ambos não portadores de prótese dentária, consumidores de bebidas alcoólicas abusivamente e sob tratamento com antibioticoterapia. No entanto, não faziam uso de medicações antifúngicas. A cepa de *C. famata* foi isolada

a partir da mucosa oral de um homem soropositivo, atendido em ambulatório, usuário de prótese dentária, que havia referido boa higienização oral e uso abusivo de bebida alcoólica e, ainda, que estava sob uso de antiretrovirais. *C. guilliermondii* foi isolada a partir da raspagem ambulatorial da mucosa de um indivíduo do sexo masculino que não utilizava próteses orais e realizava a higienização bucal de modo adequado (bom), não utilizava drogas injetáveis ou bebidas alcoólicas e estava em antibioticoterapia.

Os dois indivíduos soropositivos para o HIV/doentes com AIDS colonizados por *C. krusei* eram usuários de prótese dentária e realizavam a higienização oral de modo razoável a bom, não referiram hábito etilista, não utilizavam drogas ilícitas e um deles estava em terapia antiretroviral.

3.2.2. Grupo controle

A partir da mucosa oral dos indivíduos do grupo controle foi possível o isolamento de 29 cepas de *Candida* sp., caracterizando um índice de isolamento de 50%. As cepas isoladas foram assim tipadas: 23 (79,31%) como *C. albicans*, três (10,34%) como *C. glabrata*; uma (3,5%) como *C. tropicalis*; uma (3,5%) como *C. parapsilosis* e uma (3,5%) como *C. famata*. Nenhuma apresentou perfil fenotípico sugestivo de *C. dubliniensis* (clamidósporos em *triplets* e/ou perfil bioquímico em kit API ID32C AUX).

Em 12% dos indivíduos colonizados foram isoladas, concomitantemente, duas espécies de *Candida* sp., ocorrendo as seguintes associações: *C. albicans* + *C. glabrata* em dois deles e *C. glabrata* + *C. parapsilosis* em um outro.

3.2.2.1. *Candida* sp. versus características clínico epidemiológicas

Dentre os indivíduos saudáveis portadores de colonização simples por *C. albicans*, cerca de 20% usava prótese dentária, 39% realizava a higienização oral de modo razoável a bom, 4% referiu hábito etilista, enquanto a mesma porcentagem relatou internação prévia em UTI. Contudo, nenhum deles mencionou tratamento anterior com antibióticos e/ou antifúngicos.

Duas pessoas estavam colonizadas unicamente por *Candida* “não albicans” (uma por *C. tropicalis* e a outra por *C. famata*), uma delas portadora de prótese dentária e a outra de diabetes tipo II, ambas com higienização oral considerada ruim. Não utilizavam drogas injetáveis e/ou bebidas alcoólicas e não faziam uso de antibioticoterapia ou antifungoterapia na ocasião da coleta.

Dos três indivíduos que apresentaram colonização mista por *Candida* sp., nenhum fazia uso de próteses orais, no entanto, os seguintes fatores foram referidos: etilismo, internação em UTI e transfusão sanguínea em período anterior à pesquisa.

3.2.3. Comparação entre os grupos estudados

O índice de colonização/infecção por *Candida* sp. foi maior no grupo HIV/AIDS comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Para ambos os grupos a espécie mais isolada foi *C. albicans* (em torno de 79% para ambos os grupos). A frequência de colonização mista por *Candida* sp. na mucosa oral foi por volta de 21% para os dois grupos, sendo que a espécie *C. albicans* esteve presente em aproximadamente 86% das associações (*C. albicans* + *C. “não albicans”*) dos pacientes duplamente

colonizados/infectados e em aproximadamente 67% dos indivíduos do grupo controle com colonização mista (**Figura 11**).

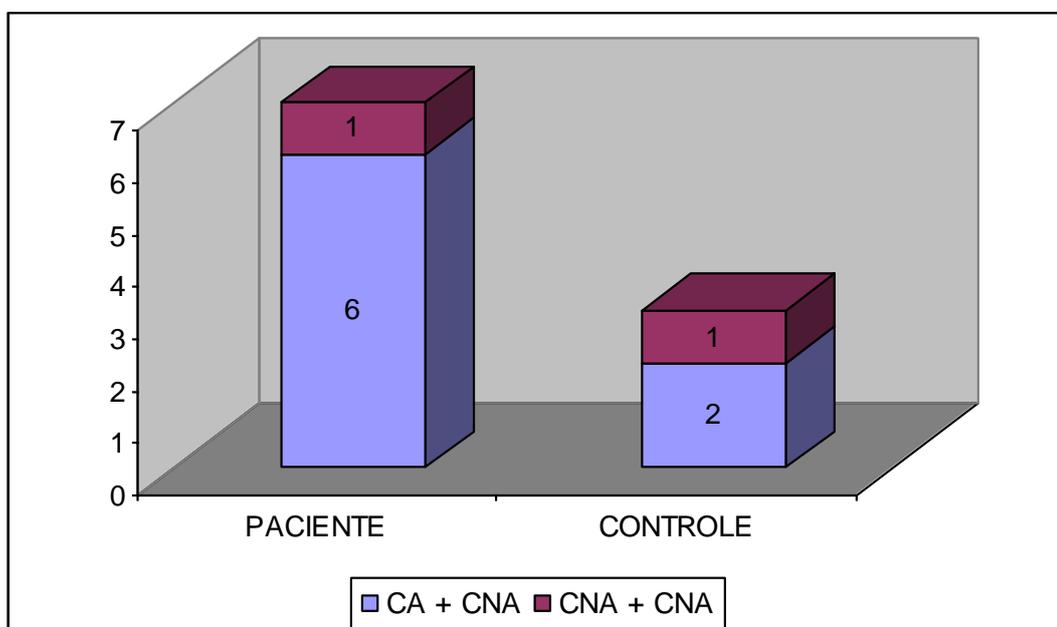


Figura 11 : Número absoluto de *C. albicans* isolada em colonização /infecção mista nos grupos paciente e controle. CA: *C. albicans*, CNA: Candida “não albicans”

Verificou-se ainda maior diversidade de espécies “não albicans” no grupo paciente em relação ao grupo controle ($p < 0,005$), sendo que no primeiro grupo foram isoladas: *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. famata* enquanto que nas pessoas saudáveis: *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

O índice de colonização (única e mista) foi superior entre os usuários de próteses em relação aos não usuários no grupo de pacientes ($p < 0,05$). Já no grupo controle o inverso foi observado ($p < 0,01$, **Figuras 12 e 13**).

A ocorrência de manifestações clínicas da candidíase orofaríngea no momento da coleta foi superior para os pacientes internos em relação àqueles em atendimento ambulatorial ($p < 0,0002$). Já o isolamento de Candida “não albicans” foi superior no

grupo de portadores do HIV não internados em relação aos pacientes com AIDS que estavam internos, sendo $p < 0,05$.

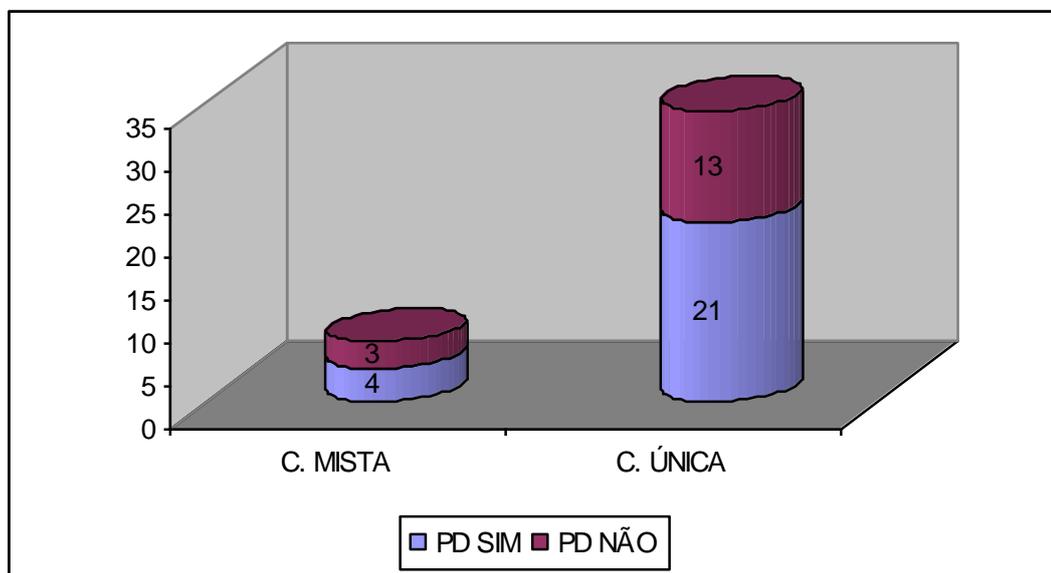


Figura 12: Distribuição em números absolutos dos pacientes soropositivos para HIV/doentes com AIDS que fazem ou não uso de prótese dentária (PD SIM; PD NÃO) em relação à colonização única e mista por *Candida* sp. ($p < 0,05$). C. mista: colonização mista, C. única: colonização única.

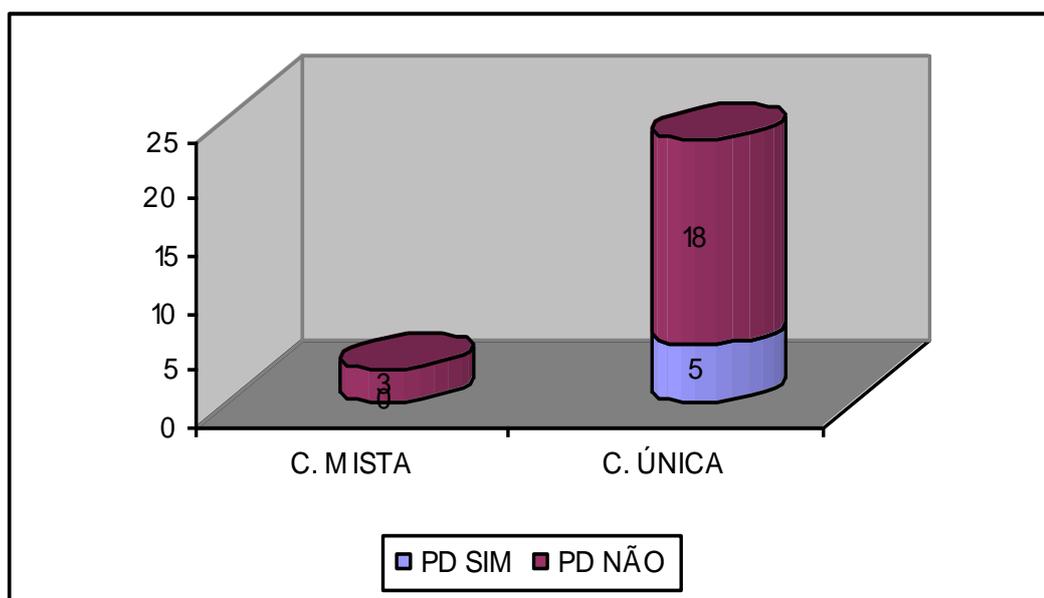


Figura 13: Distribuição em números absolutos dos indivíduos saudáveis que fazem ou não uso de prótese dentária (PD SIM; PD NÃO) em relação à colonização única e mista por *Candida* sp ($p < 0,01$). Onde: C. mista (colonização mista), C. única: colonização única.

3.3. Perfil de sensibilidade antifúngica de *Candida* sp.

3.3.1. Disco difusão

Através da metodologia de disco difusão avaliou-se o perfil de sensibilidade antifúngica das cepas de *Candida* sp. isoladas a partir da mucosa oral de soropositivos para o HIV/doentes com AIDS e respectivos controles saudáveis frente às drogas: fluconazol, cetoconazol, anfotericina B e itraconazol.

3.3.1.1. Pacientes

No grupo paciente foram avaliadas 46 cepas de *Candida* sp. por meio do teste de difusão em disco. Todas as cepas foram sensíveis à anfotericina B e aproximadamente 13% resistentes ao fluconazol (**Tabela 2**).

Tabela 2: Distribuição percentual das cepas de *Candida* sp. isoladas (n= 46) a partir da mucosa de indivíduos soropositivos para o HIV-1 segundo perfil de sensibilidade aos antifúngicos: cetoconazol, anfotericina B, itraconazol, fluconazol.

Antifúngicos	Sensível	Intermediária	Resistente
Cetoconazol	97,82	2,18	-
Itraconazol	58,69	32,6	-
Fluconazol	80,40	6,52	12,77
Anfotericina B	100	-	-

Dentre as cepas de *C. albicans* isoladas (n=38), cerca de 8% mostrou halo de inibição compatível com resistência ao fluconazol e 32% delas apresentou perfil de sensibilidade intermediário ao itraconazol. Um único isolado dessa espécie exibiu sensibilidade intermediária ao cetoconazol (**Figura 14**).

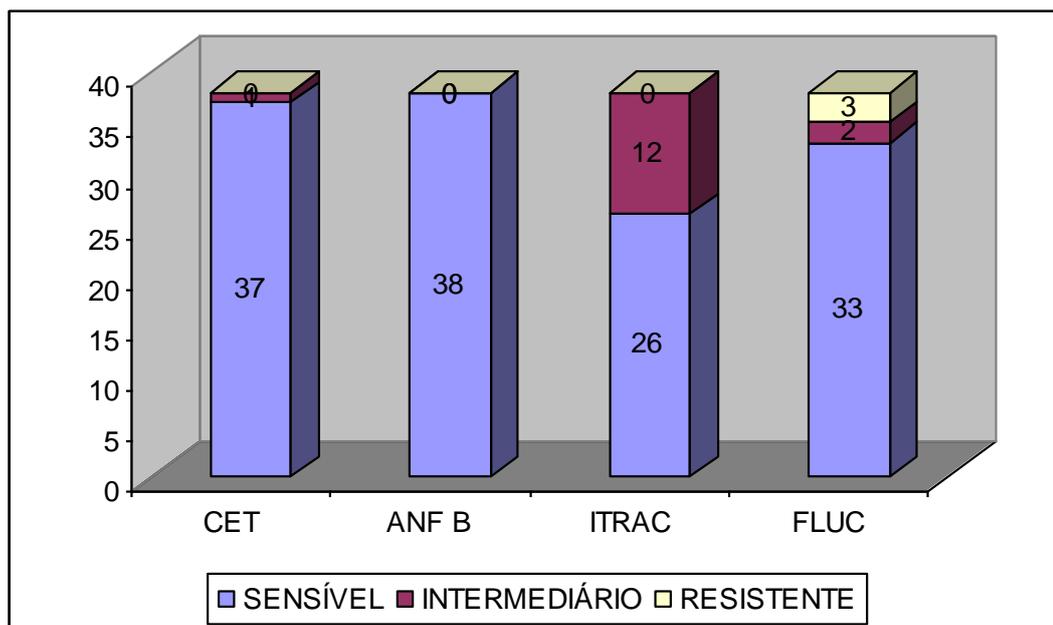


Figura 14: Perfil de sensibilidade das cepas de *C. albicans* (n=38) isoladas a partir da mucosa oral de indivíduos soropositivos para o HIV e/ou doentes com AIDS, frente os antifúngicos: cetoconazol (CET), anfotericina B (ANF B); itraconazol (ITRAC) e fluconazol (FLUC), em números absolutos.

Dentre as cepas “não albicans” isoladas (n= 8), aproximadamente 37% exibiu resposta resistente ao fluconazol e 87% sensibilidade dose dependente (intermediária) ao itraconazol (**Tabela 3**). Todas as espécies “não albicans” obtidas a partir da mucosa oral dos indivíduos soropositivos para o HIV/doentes com AIDS foram sensíveis aos antifúngicos cetoconazol e anfotericina B.

Tabela 3: Distribuição das cepas de *Candida* “não albicans” isoladas (n= 8) a partir da mucosa de indivíduos soropositivos para o HIV-1 segundo perfil de sensibilidade aos antifúngicos: cetoconazol, anfotericina B, itraconazol, fluconazol.

Antifúngicos	Sensível	Intermediária	Resistente
Cetoconazol	100	-	-
Itraconazol	12,5	87,5	-
Fluconazol	50	12,5	37,5
Anfotericina B	100	-	-

As duas cepas de *C. krusei* foram resistentes ao fluconazol e apresentaram

sensibilidade intermediária ao itraconazol. Quanto à resposta antifúngica das cepas de *C. inconspícua*, todas mostraram sensibilidade dose dependente ao itraconazol enquanto que, para o fluconazol, metade foi resistente e a outra metade, sensível dependente da dose. *C. tropicalis* e *C. famata* foram sensíveis ao fluconazol e exibiram sensibilidade intermediária ao itraconazol. Por fim, *C. guillermondii* foi sensível perante todos os antifúngicos testados (**Figura 15 A, B, C e D**). Interessantemente, foi verificado que as cepas que apresentaram sensibilidade intermediária frente ao itraconazol foram isoladas a partir da mucosa oral de dezoito pacientes dos quais, 95% estavam em vigência de antifungoterapia. Dos pacientes cujas cepas isoladas (duas *C. albicans* e uma *C. inconspícua* – três pessoas) tiveram esse mesmo fenótipo (sensibilidade intermediária) frente ao fluconazol, 33% estava sob antifungoterapia e todos em vigência de antibioticoterapia. Dentre as cepas resistentes ao fluconazol (50% *C. albicans* e 50% “não albicans”), 67% colonizava pacientes em vigência de terapia com antifúngicos e antibióticos.

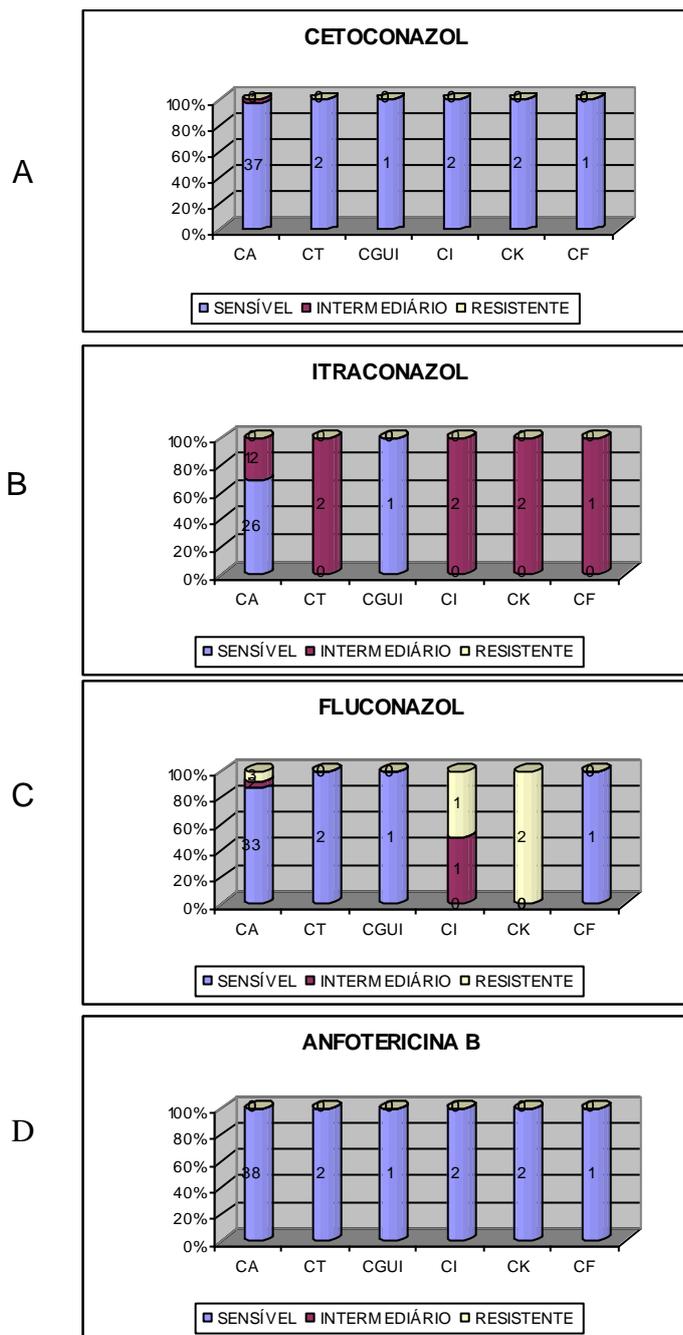


Figura 15 A, B, C e D: Perfil de sensibilidade das espécies de *Candida* sp. isoladas a partir da mucosa oral de pacientes, frente às drogas: fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B. CA: *C. albicans*, CT: *C. tropicalis*, CF: *C. famata*, CI: *C. inconspicua*, CGUI: *C. guilliermondii*, CK: *C. krusei*.

3.3.1.2. Grupo controle

A difusão em disco foi efetuada para as 29 cepas de *Candida* sp obtidas a partir da mucosa oral de indivíduos saudáveis. Todas as cepas foram sensíveis à anfotericina B e aproximadamente 13% delas resistente ao fluconazol (**Figura 16**).

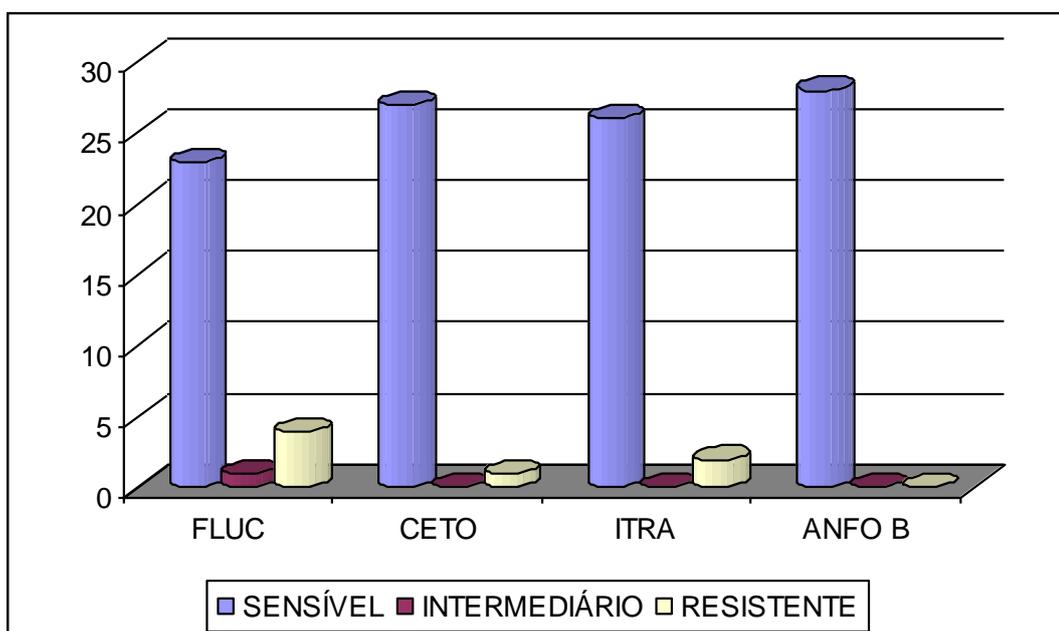


Figura 16: Perfil de sensibilidade de *Candida* sp. (n=29), isolada a partir da mucosa oral de indivíduos saudáveis frente aos antifúngicos: fluconazol (FLUC), cetoconazol (CETO), itraconazol (ITRA) e anfotericina B (ANFO B).

Quanto ao perfil de sensibilidade de *C. albicans* (n=23), cerca de 10% exibiu resistência ao fluconazol, 4% ao cetoconazol e 4% ao itraconazol. Uma única cepa mostrou sensibilidade intermediária ao fluconazol (**Figura 17 A, B, C e D**).

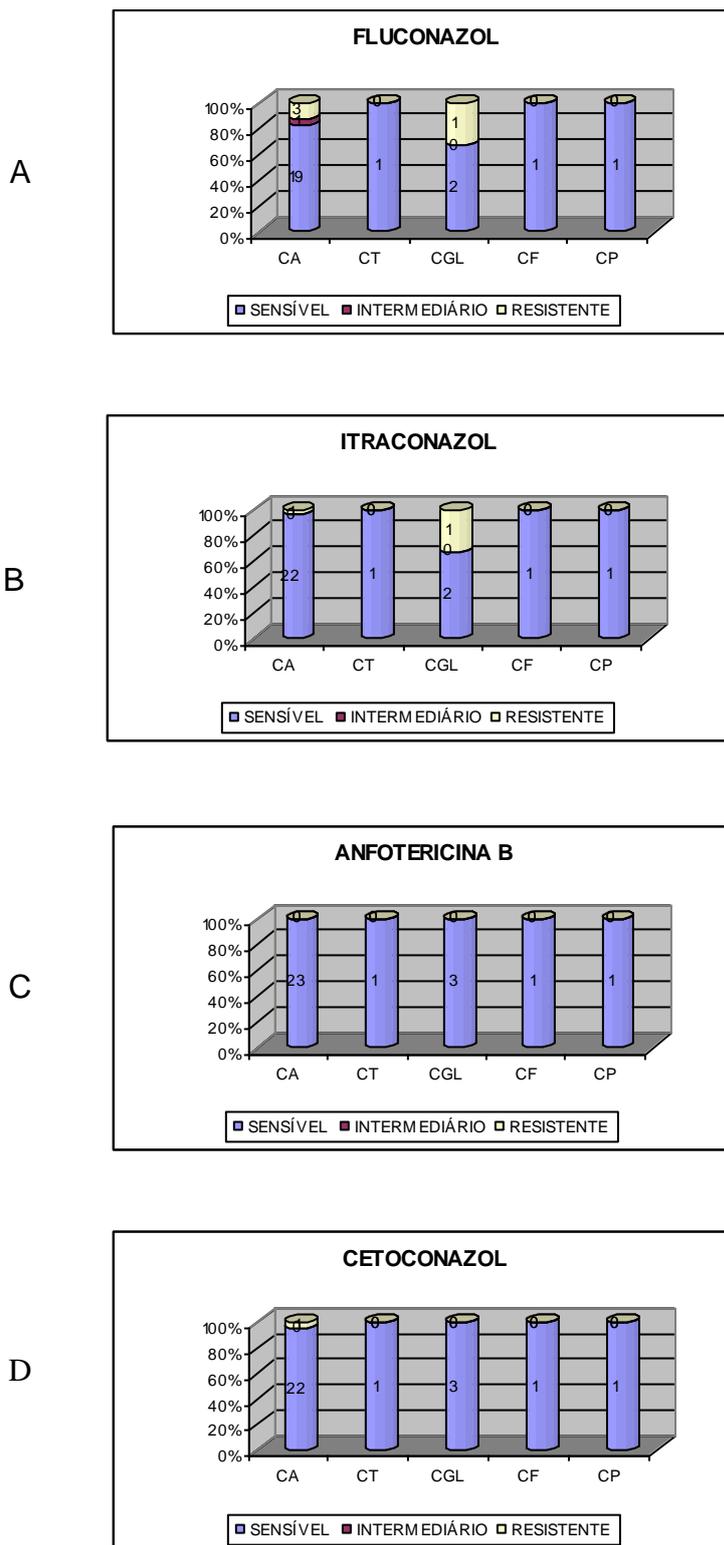


Figura 17 A, B, C e D: Perfil de sensibilidade das espécies de *Candida* sp. isoladas a partir da mucosa oral de indivíduos imunocompetentes frente aos antifúngicos: fluconazol, itraconazol, anfotericina B e cetoconazol . CA: *C. albicans*, CT: *C. tropicalis*, CF: *C. famata*, CGL: *C. glabrata*, CP: *C. parapsilosis*.

Conforme apresentado na Figura 16, 33% dos isolados de *C. glabrata* forneceram halo compatível com resultado resistente para os antifúngicos fluconazol e itraconazol. Por outro lado, esses mesmos isolados foram sensíveis ao cetoconazol. Já *C. tropicalis*, *C. famata* e *C. parapsilosis* foram sensíveis a todas os fármacos testados.

3.3.1.3. Comparação dos perfis de sensibilidade antifúngica obtidos por difusão em disco entre os grupos estudados

O percentual de resistência ao fluconazol das cepas de *Candida* sp. isoladas a partir da mucosa oral foi semelhante para ambos os grupos ($p=1,0$, Teste Exato de Fisher).

Por sua vez, a frequência do fenótipo sensível dependente da dose de *Candida* sp. frente ao itraconazol foi superior no grupo de soropositivos para o HIV/doentes com AIDS em relação ao grupo controle ($p=0,00002$). Porém, no grupo controle, houve isolados resistentes ao itraconazol (*C. albicans* e *C. glabrata*), fato esse não verificado nas leveduras isoladas do grupo de pacientes.

Com relação às cepas de *C. albicans*, os resultados mostraram percentual de resistência ao fluconazol inferior ($p=0,6637$) no grupo paciente comparado ao valor obtido para as cepas isoladas a partir do grupo controle.

Conforme anteriormente mencionado, nenhuma diferença pode ser observada quanto a sensibilidade frente a anfotericina B já que 100% dos isolados deste estudo apresentaram-se sensíveis à essa droga.

3.3.2. Microdiluição

A avaliação do perfil de sensibilidade aos agentes antifúngicos (fluconazol, cetoconazol, anfotericina B e itraconazol) foi também efetuada por meio da metodologia de microdiluição. Todas as cepas isoladas a partir do grupo de pacientes (n=46) e dos indivíduos saudáveis (n=29) foram testadas.

3.3.2.1. Pacientes

Nenhum isolado de *Candida* sp. obtida a partir da mucosa oral dos pacientes mostrou-se resistente às drogas testadas por meio da microdiluição. No entanto, aproximadamente 85% dos isolados de *C. albicans* obtidos a partir da mucosa oral dos indivíduos soropositivos para o HIV/doentes com AIDS mostrou sensibilidade dependente da dose (SDD) para o cetoconazol, 11% para o fluconazol e 24% para o itraconazol.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) necessárias para a inibição do crescimento de *C. albicans* variaram de:

- 0,125 µg/mL a 16 µg/mL para o fluconazol;
- 0,0156 µg/mL a 0,5 µg/mL para o itraconazol;
- 0,0312 µg/mL a 1 µg/mL para o cetoconazol e
- 0,0078 µg/mL a 0,5 µg/mL para a anfotericina B (**Tabela 4**).

Tabela 4: Susceptibilidade de *C. albicans*, expressa por meio da CIM, isolada a partir da mucosa oral de soropositivos para o HIV/doentes com AIDS, frente à ação das seguintes drogas: fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B.

Antifúngico: Fluconazol								
CIM (µg/mL)	0,125*	0,25*	0,5*	1*	2*	4*	8**	16**
nº e % de cepas	6 (13,8%)	7 (19,5%)	6 (13,8%)	3 (8,4%)	5 (13,8%)	6 (16,7%)	2 (5,6%)	3 (8,4%)
Antifúngico: Cetoconazol								
CIM (µg/mL)	0,0312	0,0625**	0,125**	0,25**	0,5**	1**		
nº e % de cepas	5 (8,4%)	7 (19,5%)	5 (13,8%)	11 (30,5%)	8 (22,2%)	2 (5,6%)		
Antifúngico: Itraconazol								
CIM (µg/mL)	0,0156	0,0312	0,0625	0,125	0,25**	0,5**		
nº e % de cepas	6 (13,8%)	7 (16,6%)	3 (8,4%)	13 (36,11%)	7 (19,5%)	2 (5,6%)		
Antifúngico: Anfotericina B								
CIM (µg/mL)	0,078	0,0156	0,0312	0,0625	0,125	0,25*	0,5*	
nº e % de cepas	2 (2,7%)	8 (22,2%)	8 (22,2%)	13 (33,3%)	5 (13,8%)	1 (2,7%)	1 (2,7%)	

CA: *C. albicans*, CIM: concentração inibitória mínima; *cepas sensíveis, **cepas sensíveis dependentes da dose.

Por sua vez, a CIM necessária para inibir o crescimento de 50% (CIM₅₀) e de 90% (CIM₉₀) das cepas de *C. albicans* foram, respectivamente:

- 0,5 µg/mL e 8 µg/mL para o fluconazol;
- 0,25 µg/mL e 0,5 µg/mL para o cetoconazol;
- 0,125 µg/mL e 0,5 µg/mL para o itraconazol e
- 0,0625 µg/mL e 0,125 µg/mL para a anfotericina B.

No Quadro 3 são apresentadas as CIM₅₀ e CIM₉₀ para cada espécie “não albicans”, isolada a partir da mucosa oral dos pacientes que foram respectivamente: para *C. krusei*; 0,125 µg/mL e 1,0 µg/mL frente ao fluconazol, 0,0312 µg/mL e 0,0312 µg/mL frente ao itraconazol., 0,0312 µg/mL e 0,25 µg/mL frente ao cetoconazol e 0,0078 µg/mL e 0,0156 frente à anfotericina B µg/mL; para *C. tropicalis*, 0,25 µg/mL e 0,5 µg/mL frente ao fluconazol, 0,0156 µg/mL e 0,25 µg/mL frente ao itraconazol, 0,0625 µg/mL e 0,0625 µg/mL frente ao cetoconazol e 0,0156 µg/mL e 0,0312 frente à anfotericina B µg/mL; para *C. famata*, 1 µg/mL e 1 µg/mL frente ao fluconazol, 0,0625 µg/mL e 0,0625 µg/mL frente ao itraconazol, 0,25 µg/mL e 0,25 µg/mL frente ao cetoconazol e 0,0312 µg/mL e 0,0312 µg/mL frente à anfotericina B; para *C. guilliermondii*, 0,25 µg/mL e 0,25 µg/mL frente ao fluconazol, 0,125 µg/mL e 0,125 µg/mL frente ao itraconazol, 0,0625 µg/mL e 0,0625 µg/mL frente ao cetoconazol e , 0,0625 µg/mL e 0,0625 µg/mL frente à anfotericina B; para *C. inconspicua* 0,5 µg/mL e 4 µg/mL frente ao fluconazol, 0,0156 µg/mL e 0,0312 µg/mL frente ao itraconazol, frente ao cetoconazol 0,0312 µg/mL e 0,125 µg/mL e e 0,0312 µg/mL e 0,125 µg/mL frente à anfotericina B (**Quadro 1**).

Quadro 1: Concentração inibitória mínima dos antifúngicos fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B para inibir, respectivamente, o crescimento de 50% (CIM₅₀) e 90% (CIM₉₀) das cepas de *Candida* “não albicans” isoladas a partir da mucosa oral de pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS.

ANT) <i>Candida</i> sp	Fluconazol		Cetoconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
	CIM ₅₀	CIM ₉₀						
CA	0,5 *	8**	0,25**	0,5**	0,125*	0,25**	0,0625	0,125*
CK	0,125 *	1*	0,0312*	0,25**	0,0312 *	0,0312 *	0,0078 *	0,0156 *
CT	0,25*	0,5*	0,0625*	0,0625*	0,0156 *	0,25**	0,0156 *	0,0312 *
CF	1*	1*	0,25**	0,25**	0,0625	0,0625	0,0312	0,0312

					*	*	*	*
CGUI	0,25*	0,25*	0,0312*	0,0312*	0,125*	0,125*	0,0625*	0,0625*
CI	0,5*	4*	0,0312*	1**	0,0156*	0,0312*	0,0312*	0,125*

ANT:antifúngico; CIM: concentração inibitória mínima; CA, CK, CT, CF, CGUI, CI: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. guilliermondii* e *C. inconspicua*.. *cepas sensíveis, **cepas sensíveis dependentes da dose.

Foi detectado ainda que dentre as *C. albicans* cerca de 11%, 24% e 84% necessitaram de CIM indicativa de SDD para os antifúngicos fluconazol, itraconazol e cetoconazol, respectivamente (**Quadro 1**).

Todas as espécies “não albicans” foram sensíveis ao fluconazol e à anfotericina B. Já em relação ao cetoconazol, *C. tropicalis* (100%), *C. famata* (100%), *C. krusei* (50%) e *C. inconspicua* (50%) tiveram representantes com perfil SDD, enquanto que *C. guilliermondii* foi sensível à mesma. Quanto ao itraconazol, metade dos isolados de *C. tropicalis* (50%) exibiu SDD.

3.3.2.2. Grupo controle

Nenhuma cepa de *Candida* sp. isolada a partir da mucosa oral dos indivíduos imunocompetentes mostrou-se resistente às drogas testadas por meio da microdiluição. Cerca de 17% dos isolados de *C. albicans* mostraram SDD ao itraconazol Assim sendo a CIM necessária para inibir o crescimento das cepas de *C. albicans* foram de: 0,125 µg/mL a 4 µg/mL para o fluconazol, 0,0125 µg/mL a 0,625 µg/mL para o itraconazol, 0,0625 µg/mL a 1,0 µg/mL para o cetoconazol e 0,0625 µg/mL a 0,125 µg/mL para a anfotericina B. (**Tabela 5**).

Tabela 5: Susceptibilidade das cepas de *C. albicans*, expressa através da concentração inibitória mínima (CIM), isoladas a partir da mucosa oral do grupo controle frente às drogas: fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B, após microdiluição em caldo.

Antifúngico: Fluconazol							
CIM	0,125*	0,25*	0,5*	1*	2*	4*	
(µg/mL)							
nº e % de cepas	3 (13%)	5 (21,7%)	3 (13%)	3 (13%)	7 (30,4%)	2 (8,7%)	
Antifúngico: Cetoconazol							
CIM	0,0625**	0,125**	0,25**	0,5**	1**		
(µg/mL)							
nº e % de cepas	5 (21,7%)	5 (21,7%)	8 (34,7%)	4 (17,4%)	1 (4,3%)		
Antifúngico: Itraconazol							
CIM	0,0125*	0,0312*	0,0625*	0,125*	0,25**	0,312**	0,625**
(µg/mL)							
nº e % de cepas	1 (4,3%)	7 (30,4%)	6 (26%)	5 (21,7%)	1 (4,3%)	1 (4,3%)	2 (8,7%)
Antifúngico: Anfotericina B							
CIM	0,0625*	0,125*					
(µg/mL)							
nº e % de cepas	15 (65,2%)	8 (34,7%)					

CA: *C. albicans*, * cepas sensíveis, ** cepas sensíveis dependentes da dose.

Já a CIM necessária para inibir o crescimento de 50% (CIM₅₀) e de 90%

(CIM₉₀) das cepas de *C. albicans* foram respectivamente: 0,125 µg/mL e 4 µg/mL para o fluconazol; 0,0625 µg/mL e 1 µg/mL para o cetoconazol; 0,0125 µg/mL e 0,0625 µg/mL para o itraconazol e 0,0625 µg/mL e 0,125 µg/mL para a anfotericina B. No Quadro 2 encontram-se descritas as CIM₅₀ e CIM₉₀ para cada uma das espécies isoladas a partir dos indivíduos saudáveis, após a microdiluição em caldo.

Quadro 2: Concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B necessária para inibir o crescimento de 50% (CIM₅₀) e 90% (CIM₉₀) das cepas de *Candida* sp. isoladas a partir da mucosa oral de indivíduos saudáveis.

ANT	Fluconazol		Cetoconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
	CIM ₅₀	CIM ₉₀						
CIM(µg/mL) <i>Candida</i> sp								
CA	0,125*	4*	0,0625**	1**	0,0125*	0,0625*	0,0625*	0,125*
CP	1*	1*	0,0625**	0,0625**	0,0625*	0,0625*	0,0625*	0,0625*
CGL	0,5*	4*	0,25**	0,5**	0,0625*	0,25**	0,0625*	0,125*
CF	0,125*	0,125*	0,25**	0,25**	0,0625*	0,0625*	0,125*	0,125*
CT	0,25*	0,25*	0,125**	0,125**	0,0625*	0,0625*	0,0625*	0,0625*

ANT:antifúngico; CIM: concentração inibitória mínima; CA, CP, CGL, CF, CT: *C.albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. famata* e *C. tropicalis*. *cepas sensíveis, **cepas sensíveis dependentes da dose.

Todas as *Candida* “não albicans” foram sensíveis ao fluconazol e à anfotericina B. Já em relação ao cetoconazol, *C. tropicalis*, *C. famata* e *C. glabrata* (cerca de 67%) exibiram SDD. Quanto ao itraconazol, o destaque ficou com *C. glabrata* com 33% das cepas SDD (**Tabela 6**).

Tabela 6: Susceptibilidade de *Candida* “não albicans”, isoladas a partir da mucosa oral do grupo controle, frente aos medicamentos: fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B, após microdiluição em caldo.

ANTIFÚNGICO	FLU (%)			ITRA (%)			CET (%)			ANF B (%)		
	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R
CEPAS												
sensibilidade												
CF	100	0	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0
CGL	100	0	0	66,7	33,3	0	33,3	66,7	0	100	0	0

CT	100	0	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0
CP	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0

CF: *C. famata*, CGL: *C. glabrata*, CT: *C. tropicalis*, CP: *C. parapsilosis*. FLU: fluconazol, ITRA: itraconazol, CET: cetoconazol, ANF B: anfotericina B.

3.3.2.3. Comparação dos perfis de sensibilidade antifúngica obtidos por microdiluição em caldo entre os grupos estudados

Por meio da metodologia de microdiluição observou-se que as cepas de *C. albicans* isoladas a partir do grupo de pacientes apresentaram, para o antifúngico fluconazol, índices de CIM₅₀ e CIM₉₀ (0,5 µg/mL) superiores aos apresentados pelas cepas provenientes da mucosa oral do grupo controle (0,125 µg/mL, P<0,01). Já em relação à anfotericina B essa espécie (em ambos os grupos) apresentou valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ semelhantes.

Quanto ao perfil de sensibilidade das cepas de *C. albicans* (grupos paciente e controle) constatou-se que: para a anfotericina B, em ambos os grupos as cepas isoladas foram sensíveis. Já frente ao fluconazol, houve maior percentual dessas cepas (cerca de 8%) obtidas a partir dos soropositivos para o HIV/AIDS, com perfil SDD em relação às cepas de mesma espécie isoladas no grupo controle (0% SDD, P< 0,02). O mesmo foi observado em relação ao itraconazol (SDD sendo: 24% no grupo HIV e 17% grupo imunocompetente, P<0,06). Para o cetoconazol, houve maior percentual (100%) de cepas obtidas a partir do grupo de pessoas saudáveis com perfil SDD em relação aos isolados de *C. albicans* do grupo controle (89%, P<0,1) Em relação às espécies “não albicans” isoladas nos dois grupos verificou-se que todas foram sensíveis ao fluconazol e à anfotericina B. Para o cetoconazol, 63%

e 77% dessas cepas isoladas dos respectivos grupos paciente e controle, apresentaram perfil de SDD frente ao itraconazol a prevalência de espécies “não albicans” com perfil SDD obtidas a partir do grupo controle continua (17%) em relação aos isolados no grupo paciente com esse fenótipo (13%).

3.3.3. Isolados resistentes na disco difusão versus comportamento dos mesmos na microdiluição

3.3.3.1. *Candida* sp. isoladas do grupo paciente

Todas as cepas de *Candida* sp. caracterizadas como resistentes ao fluconazol pela metodologia de disco difusão (três cepas de *C. albicans*, duas de *C. krusei* e uma *C. inconspicua*), segundo a metodologia de microdiluição demonstraram ser sensíveis à essa droga.

Já dentre os isolados de *C. albicans* que tiveram perfil intermediário frente ao itraconazol (12 cepas) pela disco difusão, 05 apresentaram perfil SDD frente à mesma droga pela metodologia de microdiluição. Dentre os não albicans caracterizados como sendo de perfil intermediário frente a mesma droga pela disco difusão (*C. inconspicua*, *C. famata*, *C. krusei*), apenas um (*C. tropicalis*) foi SDD segundo a microdiluição sendo os outros sensíveis.

Para a droga cetoconazol, houve apenas um isolado de *C. albicans* que, segundo a disco difusão classificado com perfil intermediário frente à essa droga, e pela microdiluição perfil SDD, ao passo que, dos considerados sensíveis segundo a disco difusão (38), 35 cepas, pela microdiluição, foram SDD. Dentre as não albicans sensíveis pela disco difusão frente a essa droga (uma *C. inconspicua*, duas *C. tropicalis*) todas foram SDD segundo a microdiluição.

Dentre as cepas com perfil intermediário frente ao itraconazol e resistente ao fluconazol (duas cepas de *C. albicans* e duas cepas de *C. krusei*) simultaneamente segundo a disco difusão, pela microdiluição foram respectivamente sensíveis frente ao fluconazol e com SDD para o itraconazol. Já as duas cepas de *C. krusei* isoladas exibiram perfil intermediário frente ao itraconazol e resistente para o fluconazol segundo a disco difusão ao passo que foram sensíveis para ambas as drogas segundo a microdiluição.

Para as droga cetozonazol, itraconazol e fluconazol, apenas uma cepa de *C. albicans* apresentou perfil intermediário, sensível e resistente respectivamente, segundo a disco difusão enquanto que a mesma foi considerada SDD para cetozonazol e itraconazol e sensível para fluconazol.

Para a anfotericina B, os resultados apresentados segundo a disco difusão e microdiluição foram todos compatíveis.

3.3.3.2. *Candida* sp. isoladas do grupo controle

Para os isolados de *C. albicans* obtidos a partir da mucosa oral dos indivíduos saudáveis, uma cepa de *C. albicans* foi simultaneamente resistente às drogas cetozonazol, itraconazol e fluconazol pela disco difusão ao passo que segundo a microdiluição para essas mesmas drogas, demonstrou ser SDD para as duas primeiras e sensível frente ao fluconazol.

Outro isolado de *C. albicans*, apresentou perfil de resistência frente ao fluconazol pela disco difusão ao passo que, pela microdiluição foi SDD para o cetozonazol e itraconazol enquanto sensível para o fluconazol. Ainda uma outra cepa de *C. albicans* ora intermediária para a droga fluconazol pela metodologia de

difusão em disco, pela microdiluição foi SDD para o itraconazol e sensível aos demais sendo o mesmo observado para um outro isolado de *C. albicans* com perfil de resistência para o fluconazol pela técnica de disco difusão.

Todos os isolados de *C. albicans* considerados sensíveis ao cetoconazol pela disco difusão, foram SDD a essa mesma droga através da técnica de microdiluição.

Dentre as não albicans, um isolado de *C. glabrata* enquanto sensível frente às drogas testadas pela disco difusão, demonstrou perfil de SDD frente ao itraconazol através da microdiluição. Já outra cepa de *C. glabrata* intermediária para os antifúngicos itraconazol e fluconazol, pela microdiluição apresentou perfil SDD para itraconazol e cetoconazol ao passo que foi sensível para o fluconazol.

Um isolado de *C. parapsilosis*, dois de *C. glabrata*, um de *C. famata* e um de *C. tropicalis*, considerados sensíveis aos antifúngicos testados pela disco difusão, exibiram respectivamente, os seguintes perfis de sensibilidade antifúngica pela microdiluição: SDD frente ao cetoconazol; SDD frente ao cetoconazol e itraconazol; SDD frente ao cetoconazol e itraconazol; SDD frente ao cetoconazol e SDD frente ao cetoconazol.

4. DISCUSSÃO

Candida albicans é a espécie mais comumente isolada a partir da mucosa oral infectada por leveduras. Entretanto, nas duas últimas décadas, desde a introdução e o aumento do uso das drogas azólicas, outras espécies, patogênicas e oportunistas, têm emergido com importante significado clínico. ⁽⁷³⁾ Logo, diversos estudos buscam elucidar as inter-relações que propiciam a interação fungo–hospedeiro tanto para a colonização quanto para a infecção. Nesses, são investigadas características fenotípicas, genotípicas como fatores predisponentes à infecção, tanto relacionadas ao agente etiológico (fatores de virulência) bem como ao hospedeiro humano tais como a etnia, os hábitos alimentares, a higiene, o consumo de bebidas alcoólicas, o uso de drogas endovenosas e a presença de artefatos orais que podem torna-lo predisposto ao desenvolvimento de candidíase oral. ^(3, 10, 18, 19, 44, 50, 53, 74)

O presente estudo abordou a prevalência de *Candida* sp. na cavidade oral de um grupo de indivíduos soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana e de um outro composto por pessoas imunocompetentes, todos moradores de municípios da região Noroeste Paulista.

Dado o pareamento realizado entre os grupos, os dados sócio-demográficos obtidos no conjunto aqui descrito são muito similares àqueles anteriormente citados para o grupo “paciente”. Quando considerados os fatores gênero, etnia e localização geográfica observou-se que os resultados obtidos no grupo com a síndrome da imunodeficiência humana adquirida acompanham dados nacionais. Essa vem, nos últimos anos, sofrendo alterações importantes no aspecto epidemiológico caracterizando-se por feminilização, interiorização e heterossexualidade. ^(74, 75) Em relação à faixa etária, a média de idade para ambos os sexos foi, aproximadamente,

a mesma. Isso confirma a tendência de aumento da AIDS em mulheres, casadas e monogâmicas, em plena idade reprodutiva e de sexualidade ativa. ⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾

De fato, os dados acumulados na literatura e a pesquisa junto ao Ministério da Saúde ⁽⁷⁸⁾, apontam para o crescimento da infecção na população feminina, sendo estimado que, aproximadamente para cada dois homens portadores do HIV/AIDS há uma mulher igualmente infectada. Com certeza, a veiculação de termos como “comportamento de risco” e “grupo de risco” contribui de modo negativo para o estigma que institui a AIDS como doença restrita a determinados grupos. Essa percepção errônea favorece para o aumento de mulheres contaminadas. ^(77, 79)

Na estratificação da idade dos pacientes, nossos achados mostram, assim como os nacionais, a incidência considerável da AIDS em pessoas em faixa etária acima de 50 anos de idade. ⁽⁷⁸⁾ De 1996 ao ano de 2005, entre os homens, o aumento ocorreu de 5,96% a 8,6% e entre as mulheres de 1,7% a 4,6%. De fato, no presente estudo, verificamos que cerca de 20% dos pacientes do sexo masculino e 14% do sexo feminino estão na quinta década de vida, corroborando as pesquisas que avaliam a epidemia no Brasil. ^(78, 80) Tais características sócio-demográficas denotam que o grupo de portadores do HIV-1/doentes com AIDS é representativo da população acometida por essa doença no país.

Conforme esperado, a candidíase oral foi exclusiva do grupo paciente já que, classicamente, indivíduos imunocomprometidos são mais suscetíveis à infecção por leveduras na cavidade oral, em especial por *Candida* sp. ^(9, 81, 82) Isso se deve à depleção do sistema imune em virtude da presença do HIV, pois a redução da defesa sistêmica interfere diretamente na imunidade celular da mucosa bucal a qual, em condições normais, exerce uma barreira de defesa contra microrganismos patogênicos. Como conseqüência, essa região torna-se um dos alvos de infecções

oportunistas no curso da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. ^(9, 83, 84)
Uma outra possibilidade é o fato da mucosa oral, em particular, ser mais exposta ao ambiente externo se comparada às demais.

Por sua vez, o número de portadores do HIV/doentes com AIDS com candidose bucal vem diminuindo proporcionalmente ao longo dos anos. Diversos estudos evidenciaram que a prevalência dessa doença entre indivíduos soropositivos para o HIV/doentes com AIDS variava, na década de 90, entre 20% e 70%. ^(26, 85-87) Porém, após o uso da terapia múltipla associada com antiretrovirais e fármacos inibidores de proteases (HAART), observou-se uma diminuição na prevalência dessa infecção para índices inferiores a 20%. ⁽⁸⁸⁻⁹²⁾

O propósito da HAART é protelar o progresso da infecção pelo HIV por meio do controle do fenômeno de replicação da partícula viral, da manutenção da função imune através da reversão ou prevenção da imunodeficiência, acarretando em redução da mortalidade, bem como das infecções oportunistas, como a candidíase oral. ⁽⁹²⁻⁹⁵⁾ A supressão da replicação do vírus, após o início da HAART, associa-se às alterações quantitativas e qualitativas no sistema imune. Portanto, naqueles pacientes com doença avançada e que estão em pleno uso de HAART, ocorre um aumento das células TCD4+ e TCD8+ entre os três primeiros meses de terapia. Após isso, há uma fase de elevação mais lenta dessas células. ⁽⁹³⁾ Quanto à classe de medicamentos que compõem essa terapêutica, os inibidores de protease têm a capacidade de reduzir a liberação da enzima aspartil proteinase secretada por *C. albicans*, um dos mais significativos fatores de virulência dessa levedura. ^(96, 97) Logo, a candidíase oral é também um marcador da progressão da doença além de sinalizar quadros de imunossupressão ^(89, 98-106)

No entanto, no presente estudo, 77% dos pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS portavam *Candida* sp. na mucosa oral. A alta taxa de isolamento desse microrganismo é semelhante àquela obtida em estudos anteriores. No Nordeste do Brasil esse índice foi de 93% ⁽⁹⁷⁾ e em outros países, correspondeu a 65% na Índia ⁽¹⁰⁷⁾, 67% na Itália ⁽⁴²⁾, 83,5% no México ⁽¹⁰⁸⁾, 100% no Camboja ⁽¹⁰⁹⁾ e 50% nos Estados Unidos da América (EUA). ⁽¹¹⁰⁾ Para o presente estudo, esse número elevado era esperado nessa população como consequência das alterações que acontecem na função imunológica, que levam à redução da imunidade do paciente, ^(42, 111) permitindo a persistência dessa levedura oportunista.

Essa microbiota fúngica, que outrora permanecia em perfeito comensalismo, evade do sistema imunológico do portador do HIV/AIDS, e pode iniciar um processo desordenado de proliferação, caracterizado pela entrada de leveduras oportunistas, capazes de induzirem infecções cuja gravidade vai depender de fatores outros tais como: condições insatisfatórias de higiene oral, a presença de outras complicações, como a xerostomia, alteração do pH local, uso de tabaco e o tipo de dieta ingerida pelo indivíduo. ⁽¹¹²⁻¹¹⁴⁾

Quanto à xerostomia, EPSTEIN et al. ⁽¹¹⁵⁾ constataram que a ausência ou produção insuficiente de saliva favorece a colonização por leveduras do gênero *Candida* sp. Isso porque a saliva tem proteínas com propriedades antimicrobianas e, a redução do fluxo salivar ocasiona, indiretamente, a inatividade desse produto endógeno. Também, a diminuição da produção de saliva facilita o processo de aderência das leveduras à superfície da mucosa oral ⁽¹¹⁵⁾ favorecendo a expressão de importantes fatores de virulência como as fosfolipases e as proteinases ácidas, cruciais para a invasão tecidual. ^(1, 32, 116) Em adição, dietas ricas em hidratos de carbono e a acidificação do pH salivar entre 2 a 4 (geralmente o pH ótimo neste sítio

oscila entre 5,6 e 7,8) favorecem, significativamente, a colonização por cepas de *Candida* sp. ⁽¹¹¹⁾ Curiosamente, a HAART atua reduzindo a quantidade de saliva e mimetizando a dieta rica em carboidratos já que acidifica o pH bucal. ⁽¹¹⁰⁾ Infelizmente, no presente estudo não foi possível a obtenção de dados acurados quanto à HAART, o que inviabilizou a análise da colonização por *Candida* sp. *versus* a ingestão desse grupo de medicamentos.

Houve maior freqüência de isolamento da espécie *C. albicans* no grupo de pacientes, assim como das demais espécies desse gênero (17%) quando comparados às leveduras obtidas a partir do grupo controle. Esse fato ocorre, dentre outros fatores, pelo uso mais freqüente de antifúngicos por esses pacientes, em especial do fluconazol, o qual pode favorecer não apenas a colonização/infecção por *C. albicans* resistentes, mas também a seleção de espécies “não albicans”, principalmente *C. krusei* e *C. glabrata*, por serem essas espécies intrinsecamente resistentes a essa droga. ^(57, 117-121)

Tais resultados foram semelhantes aos achados de outros autores em diferentes localidades. Rocha e col. ⁽¹²²⁾, em um estudo realizado na cidade de Goiânia, GO, observaram que das leveduras isoladas a partir da cavidade oral de pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS, cerca de 77% correspondia a espécie *C. albicans* enquanto que, 23% eram cepas “não albicans” (*C. parapsilosis* e *C. glabrata*). Estudando um grupo acometido pela mesma doença, Sant’ana *et al.*, ⁽⁶⁵⁾ tiparam 9% dos isolados como espécies “não albicans.

Nesta pesquisa, dentre as “não albicans”, chama a atenção a freqüência de isolamento de *C. tropicalis*, que foi similar (18%) ao de outro estudo realizado com indivíduos soropositivos e doentes com AIDS nesta mesma região geográfica. ⁽¹²³⁾ Isso sugere que esse resultado possa ser extrapolado como tendência do Noroeste

paulista, muito embora superior aos valores relatados em outras regiões do país. ^(65, 89, 91, 92)

Em uma perspectiva mundial, uma pesquisa conduzida em instituições de saúde norte-americanas ⁽¹²⁴⁾ mostrou que dentre as cepas de *Candida* sp. isoladas, 52% correspondia a *C. albicans* e 48% a espécies “não albicans” sendo que, dessas, 20% eram *C. glabrata*, 11% *C. tropicalis*, 8% *C. parapsilosis* e 5% *C. krusei*. Nossos dados são comparáveis à pesquisa realizada em uma população tailandesa ⁽⁹²⁾, na qual dos isolados obtidos a partir da coleta de amostra da mucosa oral de pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS, cerca de 87% foi tipada como *C. albicans*. Essa diferença observada entre países desenvolvidos e subdesenvolvidos, pode ser atribuída ao fato de que o uso do fluconazol é menor em nações que estão em processo de desenvolvimento, dado o custo elevado da droga, uma vez que se atribui a inversão na incidência albicans X não albicans ao incremento na terapêutica com esse azol. ^(98, 114, 125)

No estudo, a maior frequência (75%) de isolamento de cepas de *Candida* “não albicans” foi observada nos pacientes ambulatoriais em comparação àqueles internados. Essa constitui uma observação incomum, pois o esperado é a ocorrência de maior índice de isolamento de espécies “não albicans” em portadores do HIV/AIDS expostos a períodos longos de tratamento antifúngico e com o sistema imune debilitado. ^(24, 126) Isso provavelmente se explica em função de internação anterior aos 12 meses que precederam a inclusão neste estudo, conforme verificado para a maioria deles após revisão mais extensa de seus prontuários.

Apesar da variabilidade de espécies de *Candida* sp. obtida na presente pesquisa, não foi possível o isolamento da espécie *C. dubliniensis*. Em estudo anterior, por meio de metodologia de triagem fenotípica, Atique e cols. ⁽¹²³⁾

descreveram taxa de colonização da mucosa oral por essa espécie de 2,8% entre os portadores do HIV/doentes com AIDS da região Noroeste paulista, valor esse inferior ao aqui encontrado previamente à triagem molecular (3,8%). Tais resultados enfatizam a importância do uso do método molecular após a triagem fenotípica inicial como importante ferramenta para identificação inequívoca desse patógeno emergente. Maiores prevalências dessa espécie foram mais frequentemente observadas em países do hemisfério norte em detrimento aos localizados na América Latina. ^(12, 41, 127-132) Já no Sul da África, em um estudo realizado por Blignaut ⁽¹³³⁾, *C. dubliniensis* foi a segunda espécie mais isolada (26,3%) a partir da mucosa oral de crianças soropositivas para o HIV/AIDS, o que indica que dentre os portadores do HIV/AIDS, as crianças são mais susceptíveis à colonização da mucosa oral por essa espécie. ⁽¹³⁴⁾ No Brasil, o índice de isolamento de *C. dubliniensis* oscila de 0% a 6%. ^(65, 133, 128, 135-138)

Na presente pesquisa, a ocorrência de colonização mista foi verificada em 15% dos pacientes, tendo sido identificadas associações entre *C. albicans* e diferentes espécies de “não albicans”. Casos de dupla colonização e/ou infecção por espécies e ou cepas distintas dessa levedura em indivíduos soropositivos para o HIV/AIDS são relatados por outros pesquisadores com percentuais que variaram de 0% a 23%. ^(52, 139-146) Em um estudo realizado por Cartledge et al. ⁽¹⁴⁶⁾, em um grupo de pacientes com AIDS e que apresentavam manifestações orais sugestivas de candidíase no momento da coleta da amostra, cerca de 60% dos pacientes estava oralmente colonizados por duas espécies de *Candida* sp. sendo identificadas as seguintes associações: *C. glabrata* + *C. albicans* (38,5%), *C. krusei*+ *C. albicans* (29,1%) ; *C. tropicalis* + *C. albicans* (5,2%); *C. kefyr*+ *C. albicans* (2,0%); *C. lusitaniae* + *C. albicans* (1,0%) e *C. norvagensis* + *C. albicans* (1,0%). No presente

estudo, especificamente o índice de isolamento de colonização/infecção mista por *C. albicans* + *C. krusei* (25%) foi semelhante ao achado no estudo citado anteriormente, embora as outras combinações tenham sido divergentes. A presença de associações específicas pode estar relacionada a circulação preferencial de espécies desse gênero em diferentes comunidades ou ainda a particularidades na interação biológica entre as espécies e das mesmas com o hospedeiro humano. Estudos futuros que abordem a intimidade das relações entre microrganismos de espécies distintas bem como desses com a mucosa oral humana em diferentes populações serão importantes para o estabelecimento dos fatores determinantes da colonização mista por *Candida* sp.

No grupo controle, a freqüência de indivíduos colonizados por *Candida* sp. na mucosa oral (50%), está de acordo com os dados literários. De fato, cerca de 20% a 80% da população saudável é colonizada, de forma assintomática, por essa levedura na cavidade oral ao passo que nos portadores do vírus da imunodeficiência humana adquirida/doentes com AIDS, essa freqüência pode chegar até 90%.^(9, 96, 97)

Entretanto, no respectivo estudo, uma alta freqüência de isolamento de cepas de *Candida* “não *albicans*” (cerca de 21%) foi verificada a partir da mucosa oral de pessoas saudáveis. Interessantemente, tal observação foi anteriormente verificada em uma população da cidade de Ribeirão Preto⁽³²⁾, cidade que dista 190 km do município de São José do Rio Preto, no mesmo Estado. Esses autores identificaram, dentre os isolados de *Candida* sp. obtidos a partir da raspagem da mucosa oral de indivíduos imunocompetentes com e sem manifestações orais indicativas de candidose bucal, um total de cerca de 23% de espécies “não *albicans*”. Tal fato também foi observado, em um estudo conduzido nos EUA por Jabra et al.⁽¹¹⁰⁾ que verificaram que dentre as crianças saudáveis, 13% estava colonizada na mucosa

oral por espécies “não albicans”. Aliados aos dados da literatura, nossos resultados sugerem que a disseminação comunitária dessas espécies é maior do que a inicialmente prevista ⁽¹⁴⁷⁾ além de ser possível indicador de mudança no perfil da microbiota oral do indivíduo imunocompetente. Esse achado é potencialmente preocupante dada à variabilidade dos fatores de virulência e do perfil de sensibilidade antifúngica dessas espécies. ^(110, 148)

Dentre as cepas aqui isoladas a partir da mucosa oral do grupo controle, o percentual de *C. glabrata* (10,34%) foi maior que o referido para a população ribeirão-pretense ao passo que tais números foram similares para *C. tropicalis* (3,5%) e *C. parapsilosis* (3,5%). A presença comunitária de *C. glabrata* é preocupante, dada a sua resistência intrínseca ao fluconazol. Estudos futuros que considerem a colonização/infecção por essa levedura em diferentes populações e em outros sítios anatômicos, contribuirão para a elucidação de seu papel como patógeno oportunista do indivíduo hígido. ⁽¹⁴⁹⁻¹⁵¹⁾

Ainda no mesmo grupo, outro achado interessante foi a ocorrência de duplas colonizações em pessoas saudáveis, em um número duas vezes maior do que o previamente relatado em uma população paulista por Candido e cols. ⁽³²⁾. De fato, tais autores identificaram as associações de: *C. albicans* e *C. tropicalis* (cerca de 67% das associações), e *C. albicans* e *C. glabrata* (cerca de 33% das associações) sendo que essa última combinação também foi encontrada em nosso estudo em frequências maiores (cerca de 67%). Ainda, interessantemente, o índice de ocorrência de colonização mista por *Candida* sp. não diferiu entre pacientes e controles. Esse é um fato incomum, pois as pesquisas clínicas apontam esse fenômeno em indivíduos imunocomprometidos. ^(60, 61, 146) Isso pode ser explicado em

função da já mencionada disseminação comunitária regional das espécies “não-albicans” que, possivelmente, somaram-se às *C. albicans* pré-colonizadoras.

Oitenta e nove por cento dos portadores de prótese dentária do grupo paciente estava colonizado/infectado por *Candida* sp. Realmente, o uso de artefatos orais – associado ou não aos hábitos de higiene oral e etilista predispõe a colonização por leveduras na cavidade bucal, principalmente em portadores do vírus HIV/doentes com AIDS. ^(17, 152-155) A prótese dental, principalmente as que recobrem uma grande área da cavidade bucal, desencadeia a xerostomia, pois interfere tanto na produção como na atuação local da saliva e, por conseqüência, isenta o palato da ação antimicrobiana salivar, favorecendo a colonização e/ou a infecção por *Candida*. ⁽¹⁵⁶⁻¹⁵⁸⁾ Além disso, a redução do fluxo salivar e a presença de próteses orais facilitam a ocorrência de traumas teciduais, o que também contribui para a instalação e a invasão local dessas leveduras ⁽⁴³⁾ Essa redução salivar também é observada como efeito colateral de alguns anti-retrovirais, como o Indinavir (inibidor de proteases), droga largamente utilizada por portadores do HIV/doentes com AIDS. ⁽¹⁵⁹⁻¹⁶²⁾ Salas ⁽¹⁶³⁾ observou que cerca de metade dos portadores do HIV/AIDS, usuários de fármacos antiretrovirais, relatam ter sensação de boca seca. Para o alívio desse sintoma o uso de sialogogos e saliva artificial podem ser úteis para minimizar o desconforto além de contribuir para a prevenção de infecção por *Candida* sp. ⁽¹⁶⁴⁾ Outras drogas antiretrovirais, também inibidoras de proteases (Amprenavir, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir), têm como efeito colateral a indução de quadro hiperglicêmico com possibilidade de desenvolvimento do diabetes tipo II. Essa patologia, por sua vez, também predispõe à xerostomia, favorecendo a colonização por *Candida* sp. ⁽¹⁶¹⁾

No grupo controle, o percentual de pessoas com a associação prótese dentária+colonização oral por *Candida* sp., foi inferior. Esse achado é esperado pois, a candidíase oral necessita, para instalar-se, de mais fatores além da colonização tais como: imunossupressão, xerostomia, alterações hormonais, discrasias sangüíneas, fatores mecânicos, iatrogênicos dentre outros, não referidos no grupo controle. ^(9, 17, 157, 165) Nitidamente, nesse estudo, os indivíduos imunocompetentes realizavam de modo satisfatório a higienização bucal o que provavelmente contribuiu de modo significativo para esses resultados.

Quanto à influência das bebidas alcoólicas no isolamento de leveduras, a grande maioria dos pacientes e dos entrevistados saudáveis que consumiam o álcool de modo abusivo, estava oralmente colonizado/infectado por *Candida* sp. A ingestão de álcool é outro fator reconhecidamente indutor de diminuição de produção da saliva, além de diminuir os anticorpos IgA na mucosa oral. ^(156, 157, 166) o que explica este achado.

Uma pessoa saudável colonizada por pelo menos uma espécie “não albicans”, era portadora de Diabetes tipo II. Conforme acima descrito, essa condição favorece a instalação na mucosa pelo gênero *Candida*. ^(161, 167, 168) Logo, em indivíduos diabéticos, é fundamental um acompanhamento clínico constante para averiguar a saúde bucal, independentemente da soropositividade para HIV. ⁽¹⁶⁹⁾

No presente estudo, os portadores do vírus da imunodeficiência humana/doentes com AIDS, sabidamente submetidos à terapia antiretroviral, foram menos colonizados por cepas “não albicans” em comparação aos que não fazem uso dessa medicação. Esse achado tem sido observado por outros pesquisadores que detectaram, após o início da HAART, um declínio na prevalência de candidíase orofaríngea, chegando a valores inferiores a 20%. ^(90-101, 170) Arribas et al. ⁽¹⁷¹⁾

observaram em portadores de AIDS hospitalizados um decréscimo significativo (redução na incidência de 31% para 1% em 48 semanas de terapia) da prevalência de lesões por *Candida* sp. após o início da HAART. Em especial para os indivíduos com infecção avançada pelo HIV, o tratamento com terapia antiretroviral, incluindo os fármacos inibidores de proteases (IP) teve impacto positivo na redução da ocorrência de candidíase orofaríngea. ^(165, 172) Isso se deve à dupla atividade exercida por esses medicamentos: a antiviral e a antifúngica. A ação antifúngica é decorrente da ação inibitória direta que exercem sobre as aspárticoproteases (Saps), importante fator de virulência de *Candida*. Isso se deve ao fato de que essa classe de proteases das leveduras é a mesma presente no ciclo de replicação da partícula do vírus HIV e, portanto, sensível aos IPs. ^(96, 97, 173)

Porém, após o advento da HAART, se por um lado houve decréscimo na prevalência das infecções bucais, em especial das fúngicas, por outro ocorreu o aumento das doenças das glândulas salivares, como um dos efeitos colaterais desse “pool” de fármacos. ^(172, 173) É fundamental, portanto, a atenção dos profissionais de saúde, em especial dos odontólogos, quanto às manifestações bucais peculiares dos portadores do vírus HIV/doentes de AIDS além das prováveis reações adversas dos antiretrovirais prescritos, no sentido de contribuir para a prevenção dos fenômenos adversos ou ainda para o tratamento adequado dos mesmos, entre eles a candidíase oral. ⁽¹⁷⁴⁻¹⁷⁵⁾

No presente estudo, o perfil de sensibilidade antifúngica foi verificado com o auxílio dos métodos de difusão em disco e de microdiluição em caldo.

A primeira técnica, permitiu a detecção de freqüências similares de resistência ao fluconazol por parte das cepas de *Candida* sp., isoladas a partir da mucosa oral, tanto de pacientes quanto de indivíduos saudáveis. Isso contraria os dados da

literatura uma vez que o isolamento de cepas de *Candida* sp. resistente aos azólicos é esperado sobretudo entre hospedeiros previamente expostos a drogas azólicas por períodos prolongados, sendo incomum esse achado nas pessoas saudáveis. ^(50, 119) Quanto aos dados obtidos para o grupo de indivíduos imunocomprometidos, a resistência observada frente à droga fluconazol está de acordo com o observado por Perea et al. (2002) em um estudo realizado na cidade do Texas, (EUA), ao constatarem a resistência apresentada por cepas de *Candida* sp. isoladas a partir de portadores do HIV que tiveram exposição prévia ao fluconazol. ⁽⁶²⁾ Canuto et al. (2000) também verificaram que cerca de 12% dos pacientes portadores do HIV/AIDS que abrigavam pelo menos uma cepa de *Candida* sp. com perfil de resistência frente ao fluconazol, passaram ou estavam em tratamento com o antifúngico fluconazol. ⁽⁵⁰⁾

No grupo de pacientes, os três indivíduos a partir dos quais foram isoladas cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, estavam sob tratamento com antibioticoterapia e antifungicoterapia durante internação e, um deles, manifestava a infecção no momento da coleta. De fato, a exposição prévia aos azólicos constitui fator que aumenta a probabilidade de seleção de cepas resistentes à essa classe de medicamentos por *Candida* sp., anteriormente constituinte da microflora oral. ^(50, 62) Logo, para tais pacientes, que utilizam medicamentos que são derivados de drogas azólicas, deve-se considerar a terapêutica local como a de primeira linha nos casos em que a manifestação clínica da infecção for compatível com a mesma. Já para os casos moderados a severos, deve-se utilizar a terapêutica sistêmica. ^(146, 176) No presente estudo observou-se também, maior frequência do fenótipo de sensibilidade dependente da dose de *Candida* sp. isolada a partir dos portadores do HIV/doentes com AIDS frente ao itraconazol. Esse achado possivelmente reflete o uso prévio de azóis, conforme anteriormente relatado. ^(50, 62)

OHMIT et al. (2003) ⁽¹¹¹⁾ em um estudo realizado com uma população de pacientes soropositivos para o HIV, que fazia profilaxia com drogas azólicas, pode observar que a persistência e a ocorrência da colonização da mucosa oral por leveduras de *Candida* sp. estava relacionada ao uso de medicamentos derivados de azóis, porém essa medicação prévia não foi determinante no desenvolvimento e/ou número de episódios de candidíase orofaríngea. Já em um estudo realizado por Hung et al. (2005) ⁽⁹⁰⁾ ficou evidente que as drogas azólicas, em especial o fluconazol, influenciavam não apenas a composição da microflora oral comensal como também o número de episódios de candidíase bucal. Dada a ausência de dados completos sobre a antifungoterapia nos prontuários dos pacientes aqui incluídos, não foi possível pesquisar a possível influência de tal exposição sobre a colonização/infecção por *Candida* sp. ou ainda sobre a ocorrência de candidíase orofaríngea.

Por sua vez, dentre as espécies “não albicans” isoladas a partir da mucosa oral do grupo de pacientes, destaca-se *C. krusei*, que apresentou perfil de sensibilidade intermediário frente ao itraconazol e resistência para o fluconazol expressiva, fato esse de acordo com dados da literatura, em razão da resistência intrínseca dessa espécie frente aos azólicos. ⁽⁵⁹⁾ Além do mais, *C. krusei* é mais comumente encontrada como colonizadora da cavidade oral de indivíduos que fazem uso contínuo de derivados azólicos. De fato, Abi-Said et al. (1997) ⁽⁵³⁾ verificaram que a profilaxia com fluconazol em soropositivos para o HIV/doentes com AIDS, proporcionou alta proteção contra *C. tropicalis* e *C. albicans*, porém promoveu elevação da ocorrência de *C. glabrata* e de *C. krusei*. Também, Sant’ Ana et al. (2002) ⁽⁶⁵⁾ em um estudo multicêntrico realizado no Brasil, observaram que os

isolados de *C. krusei* obtidos a partir do grupo de indivíduos soropositivos para o HIV/doentes com AIDS, apresentaram sensibilidade diminuída frente aos azóis.

Provavelmente, a terapia e/ou a quimioprofilaxia antifúngica, frequentemente indicada aos portadores do HIV/doentes com AIDS, propiciou o isolamento de espécies de *Candida* sp. com sensibilidade reduzida aos azóis na população de pacientes aqui estudada.

No presente estudo, a constatação de indivíduos saudáveis cuja microflora oral foi composta por cepas de *Candida* sp. resistentes aos derivados azólicos, é um dado intrigante, visto que esse acontecimento é raramente citado na literatura.^(50, 57, 62) Chama ainda a atenção, o fato de que nenhum dos indivíduos desse grupo relatou exposição prévia a esses fármacos. Uma possível explicação seria a já mencionada tendência de mudança na composição da microflora oral por disseminação comunitária de cepas anteriormente restritas a grupos mais suscetíveis. Nesses casos, seria possível verificar a disseminação de espécies com reduzida sensibilidade aos azóis, culminando em cepas com perfil não usual de resposta aos antifúngicos como colonizantes da cavidade bucal de pessoas saudáveis.⁽¹⁴⁸⁾ Ainda, o fato de terem sido isoladas cepas de *C. glabrata*, intrinsecamente resistentes aos azóis,⁽⁵⁰⁾ contribuiu sobremaneira para a elevação do total de cepas com sensibilidade reduzida nesse grupo

Enfim, o método de disco difusão, embora seja uma técnica prática e econômica para uso em rotina diagnóstica, possui limitações significativas entre elas o resultado qualitativo, ou seja, a impossibilidade de determinação da concentração inibitória mínima (MIC), além da dificuldade de obtenção de resultados reprodutíveis por longos períodos. Logo, os dados obtidos por meio desse recurso devem ser contabilizados com precaução⁽¹⁷⁷⁻¹⁷⁹⁾

A avaliação do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos realizada por microdiluição em caldo, permitiu determinar a resposta *in vitro* de todas as leveduras isoladas frente aos antifúngicos: fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B utilizando protocolo validado pelo NCCLS (2002).⁽⁷²⁾ Para esse comitê, o método de diluição em caldo é o de referência, pois apresenta uma reprodutibilidade intra e interlaboratorial superior a 90%.⁽¹⁸⁰⁾ Porém, embora apresente boa reprodutibilidade, é um método laborioso, demorado e dispendioso. Por sua vez, metodologias mais simples como o teste de difusão em disco⁽¹⁷⁹⁾ e mesmo o Etest⁽¹⁷⁸⁾ apresentam uma eficiência limitada apenas aos casos de isolados suscetíveis, porém não nos dose-dependentes ou resistentes.^(39, 181)

A microdiluição em caldo forneceu assim resultados diferentes daqueles observados no antifungigrama por disco difusão para as cepas testadas nesta pesquisa. Foram verificadas cepas sensíveis e com perfil SDD frente às drogas testadas, porém nenhum isolado de *Candida* sp. foi resistente. Tais achados são consistentes já que essa metodologia é considerada padrão ouro dentre os testes para avaliação do perfil de sensibilidade antifúngica.^(72, 178-181)

Frente à anfotericina B todas as cepas obtidas a partir da mucosa oral dos grupos (paciente e controle) foram sensíveis, resposta essa também verificada por disco difusão. De fato, a resistência das leveduras desse gênero aos polienos é raramente observada, pois esses medicamentos exigem curtos períodos de exposição visto a sua elevada toxicidade o que acaba por minimizar a seleção de cepas resistentes.^(56, 57)

Para o fluconazol, a diferença entre as CIM₅₀ e CIM₉₀, encontradas entre as cepas de *C. albicans* obtidas a partir do grupo paciente (0,5 µg/mL e 8,0 µg/mL respectivamente) e grupo controle (0,125 µg/mL e 4,0 µg/mL respectivamente)

indicam uma alteração nas concentrações necessárias para inibição do crescimento dessa levedura, de tal modo que, apenas no grupo de pessoas soropositivas para o HIV/doentes com AIDS, obteve-se cepas com perfil SDD frente à essa droga (aproximadamente 5% dos isolados de *C. albicans*). Nossos achados estão de acordo com um estudo realizado por Sant'Ana et al. (2002) que identificaram cerca de 6% das cepas de *C. albicans*, isoladas a partir da cavidade oral de pacientes soropositivos para o HIV/AIDS, com perfil SDD frente a essa droga. ⁽⁶⁵⁾

A importância de se determinar a CIM, principalmente para os derivados azólicos, consiste no fato de que a ação desses fármacos é dependente da concentração da droga. ^(183, 184) Conforme já relatado por outros autores, a exposição prévia aos azólicos, em especial ao fluconazol, exerce uma pressão seletiva sobre as leveduras da microbiota oral de modo que as mesmas tenham que ser expostas a doses cada vez maiores para inibição do crescimento, além de favorecer a permanência de *Candida* sp. resistente, ou ainda de indução dos mecanismos de resistência. ^(50, 57, 59, 60) Quanto aos últimos, um dos mecanismos que vêm sendo mais extensivamente estudados relaciona-se à diminuição da concentração do fármaco devido ao aumento da ativação ou expressão dos genes (MDR e CDR) que codificam as bombas de eliminação ativa de drogas antifúngicas, em especial as azólicas. ⁽⁵⁷⁾ Esse mecanismo já foi observado em até 85% dos isolados com perfil de SDD e resistência. ⁽⁶²⁾ Outros meios de resistência apresentados são as alterações no gene *ERG11* que codifica a enzima lanosterol 14 alfa desmetilase (componente imprescindível para a formação da membrana fúngica celular), detectadas em até 35% dos isolados resistentes. ⁽⁶²⁾ De modo geral, o que acontece é a combinação de vários mecanismos de resistência ao mesmo tempo, sendo essa

somatória verificada em até 75% dos isolados de *Candida* sp. com alto nível de resistência frente ao fluconazol. ^(57, 62)

Quanto ao itraconazol o percentual das cepas de *C. albicans* SDD obtidas a partir do grupo de pacientes (24%) foi superior em relação ao mesmo fenótipo expresso pelas cepas obtidas no grupo controle (17%). Para o primeiro grupo, esse fenótipo não surpreende dada a possível exposição prévia aos azóis. ⁽⁵⁷⁾ Porém, a detecção de *C. albicans*, obtidas a partir da mucosa oral das pessoas imunocompetentes, com perfil de SDD frente ao itraconazol, é um fato que contraria os dados existentes. Esse dado pode ser um indício de uma alteração no perfil de sensibilidade antifúngica das cepas de *C. albicans* comensais da microbiota oral, de pessoas saudáveis, conforme já sugerido por outros autores. ^(50, 57, 60, 61) Para o cetoconazol, surpreendentemente, todas as espécies, obtidas a partir dos indivíduos imunocompetentes, foram SDD com proporção ligeiramente superior àquela observada nas cepas de *C. albicans*, isoladas a partir da mucosa oral dos imunocomprometidos. Esse achado, aliado aos nossos dados sobre o perfil SDD frente ao itraconazol, é preocupante, visto que a literatura aponta essa tendência como típica de pacientes soropositivos para o HIV/AIDS, em decorrência da exposição dos pacientes frente a esse fármaco, mas, tal comportamento exibido pelas cepas isoladas a partir de pessoas saudáveis, aponta para a possibilidade de disseminação comunitária de estirpes com tendência a uma rápida manifestação de resistência frente aos derivados azólicos. ^(57, 59, 60)

Em relação às espécies “não albicans” isoladas nos dois grupos verificou-se que todas foram sensíveis ao fluconazol, fato esse não esperado ^(124, 185) Quanto ao cetoconazol e ao itraconazol, o comportamento das *Candida* “não albicans”, em ambos os grupos, apresentou resultados similares. Tais achados reforçam a

hipótese já levantada de disseminação comunitária, agora de espécies de *Candida* “não albicans”, como agentes comensais exibindo perfil SDD frente a alguns antifúngicos azólicos, no caso ao cetoconazol e ao itraconazol. Ademais, o fato de encontrar cepas que exibiram perfil de SDD frente à mais de uma droga azólica simultaneamente, indica uma possibilidade de resistência cruzada à tais medicamentos^(57, 60)

Quanto ao grupo de pacientes, embora a colonização/infecção por cepas com perfil de resistência aos azóis seja típico de soropositivos para o HIV/AIDS, há uma preocupação quanto a probabilidade da transmissão dessas cepas entre os comunicantes dessas pessoas, com possibilidade de disseminação em âmbito social, justificando assim o monitoramento dos pacientes que fazem profilaxia ou tratamento com drogas azólicas.^(176, 184) Tais achados demonstram tanto a importância da determinação prévia da CIM para estabelecer o protocolo clínico mais adequado para o tratamento dos episódios de candidíase orofaríngea principalmente as recorrentes, nesse grupo de indivíduos.^(140, 184)

Enfim, é fundamental considerar que a identificação da espécie é importante, mas não suficiente, para manter ou re-orientar a conduta terapêutica principalmente em pacientes com história de profilaxia e/ou terapia prévia com azóis ou em caso de falhas terapêuticas.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

As seguintes conclusões foram obtidas sobre a microbiota oral do gênero *Candida* sp. obtida a partir de uma população de portadores do HIV/doentes de AIDS e respectivo grupo controle da região Noroeste do Estado de São Paulo:

- Pacientes imunocomprometidos são mais suscetíveis à colonização/infecção em relação às pessoas saudáveis.
- A espécie mais freqüente em ambos os grupos é *Candida albicans*, enquanto que *C. dubliniensis* não acomete a população estudada.
- *Candida* “não albicans” coloniza quantitativa e qualitativamente, de modo equivalente, a mucosa oral das pessoas saudáveis e daquelas portadoras do HIV ou doentes de AIDS.
- *Candida* sp. exibe índices similares de sensibilidade dependente da dose frente ao cetoconazol e ao itraconazol nos grupos estudados.
- O uso de próteses dentárias aumenta as chances de colonização/infecção, somente nos portadores do HIV e doentes de AIDS.
- É fundamental considerar que a identificação da espécie é importante, mas não suficiente, para manter ou re-orientar a conduta terapêutica principalmente em pacientes com história de profilaxia e/ou terapia prévia com azóis ou em caso de falhas terapêuticas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Odds FC. *Candida* and candidosis: a review and bibliography, 2^a ed. London: Baillière Tindall, 1988.
2. Rinaldi MG. Biology and Pathogenicity of *Candida* species. En Gerald P. Biology: - Candidiasis. Pathogenesis, diagnosis, and treatment. 2^a. ed. Nueva York. RAven Press, 1993; 1-17.
3. Edwards DSJE Jr; *Candida* species. En Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Principles and practice of infectious. Disease. 4a. ed. Churchill Livingstone. Nueva York, 1995.
4. Shepard MG. Cell envelope of *Candida albicans*. CRC Crit Rev Microbiol, 1987, 15:7-25.
5. Douglas LJ. Adhesion of *Candida albicans* to epithelial surfaces. CRC Crit Rev Microbiol. 1987;15:27-43.
6. Slutsky B, Buffo J, Soll DR, et al. High frequency swtching of colony morphology in *Candida albicans*. Science 1985; 230: 665-669.
7. Colombo AL *et al.* High rate of nonalbicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. London 2000; 34(4):381-386.
8. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence

-
- of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. FEMS Yest Res. 2004; 4:369-76.
9. Cavassani VGS, Sobrinho JA, Homem MG, Rapoport A. Candidíase oral como marcador de prognóstico em pacientes portadores do HIV Oral candidiasis as prognostic marker of HIV-infected patients. Rev. Bras. Otorrinolaringol. 2002; 68: 5.
10. Bautista-Munoz C, Boldo XM, Villa-Tanacaa L, Hernandez-Rodriguez. Identification of *Candida* spp. By Randomly Amplified Polymorphic DNA. Analisis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Direct PCR Methods. J. clin. Microbiol. 2003; 41(1): 414-420.
11. Sullivan DJ, Haynes K, Bille J, Boerlin P, Rodero L, Lloyd S, et al. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 960-4.
12. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. J Clin Microbiol. 1998;36(2):329-34.
13. Kocsube S, Toth M, Vagvolgyi C, Doczi I, Pesti M, Pocsi I, Szabo J, Varga J. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. J Med Microbiol. 2007 Feb;56(Pt 2):190-5.
14. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. Nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidíases in HIV-infected individuals. Microbiology 1995; 141:1507-1521.

15. Sidrin JJC, Rocha MFG. Micologia Médica à luz de autores contemporâneos. 1ª. ed. Editora Guanabara Koogan, 2004.
16. Fricker-Hidalgo H, Valdapel O, Duchesne MA, Mazoyer MA, Noget D, Lardy B, Lebeau B, Freney J, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Comparison of the a new API Candida system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species. J. Clin. Microbiol. 1996; 34(7):1846-1848.
17. Candido RC, Azevedo RVP, Ito IY. Leveduras: prevalência na cavidade bucal de portadores e não portadores de prótese total. Rev. Odontolol. 1995; 7: 27-33.
18. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev. 2003; 67(3): 400-28.
19. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. Cell Microbiol. 2004; 6(10): 915-26.
20. Barchiesi F, Morbidutcci V, Ancarani F, Scalise. Emergence of oropharyngeal candidiasis caused by non-albicans species of *Candida* in HIV- infected patients. *Eur J Epidemiol* 9: 455-456, 1993.
21. Barrinuevo, Presencia de *Candida albicans* y su relacion con los valores de CD4+ en pacientes con infección por VHI. Tese doutorado, Granada. Editorial de la Universidad de Granada, 1995.

-
22. Linares CED. Aspecto do comportamento fenotípico e da suscetibilidade a antifúngicos em *Candida dubliniensis* [dissertação]. Santa Maria (RS):UFSM; 2002.
23. Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, et al. Importance of *Candida species* other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med. Mycol.* 1998; 36 (Suppl. 1):156-165.
24. Sano A, Vilela, MM, Takahashi I, Fukushima K, Takizawa K, Silva MT, Uno J, Nishimura K, Miyaji M.. Isolation of *Candida dubliniensis* from the oral cavity of an HIV-positive child in Brazil. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2000; 41, 177–181.
25. Greenspan D, Komarof E, Redford M, Phelan JA, Navazesh M, Alves MEAF et al. Oral mucosa lesions and HIV viral load in the women's interagency HIV study (WIHS). *J. Acquir Immune Defic Syndr.* 2000; 25(1):44-50.
26. Dodd CL, Greenspan D, Katz MH, et al. Oral candidiasis in HIV infection: Pseudomembraneous and erythematous candidiasis show similar rates of progression to AIDS. *AIDS* 1991; 5:1339-1343.
27. Greenspan D & Greenspan J S. Oral manifestations of Human Immunodeficiency virus infection. *Dent. Clin. North Am., Filadélfia* Jan 1993; 37(1): 2132 p.
28. Freitas G, Lopes MM, Frade JP. HIV e infecções fúngicas. Departamento de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Disponível em :<<http://www.aidscongress.net/pdf/119.pdf>> Acesso em : 10/01/2007.

29. Millian RS et al. Effect of salivary secretory IgA on the adhesion of *Candida albicans* to polystyrene. *Microbiology*, Spencers Wood 2000; 146(9):2105-2112.
30. Pinheiro A, Marcenes W, Zakrzewska JM, Robinson PG. Dental and oral lesions in HIV infected patients: a study in Brazil. *Int Dent J*. 2004 Jun;54(3):131-7.
31. Coleman DC et al. Oral *Candida* in HIV infection and AIDS: new perspectives / new approaches. *Crit. Rev. Microbiol*. 1993; 19:61-82.
32. Candido RC, Azevedo RVP, Komesu MC. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* set-out. 2000; 3(5): 437-442.
33. Hazen KC. Relationship between expression of cell surface hydrophobicity protein 1 (CSH1p) and surface hydrophobicity properties of *Candida dubliniensis*. *Curr Microbiol*. 2004 Jun;48(6):447-51.
34. Lortholary O and Dupont B. Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. *Clin. Microbiol. Rev*. 1997; 10:477-504.
35. Smoall EH, Melnick DA, Ruggeri R, et al. A novel natural inhibitor from *Candida albicans* hyphae causing dissociations of the neutrophil respiratory burst response to chemotactic peptides from other post activation events. *J. Immunol* 1988; 140: 3893-3899.
36. Tapia PC, González PA, Pereira AA et al. Susceptibilidad antifúngica de *Candida albicans* recuperadas de pacientes con SIDA y candidiosis

- orofaríngea y esofágica. Experiencia con Etest. Rev Méd Chile 2003; 131:515-519.
37. Martinez M, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. J. Clin. Microbiol. 2002; 40:3135-3139
38. Melo ASA, Almeida LP, Colombo AL, Briones MRS. Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Mycopathol. 1998; 142:57-66.
39. Li J, Nong H, Nong D, Cheng L. Study on susceptibility test of pathogenic fungi from otorhinolaryngology by Etest method. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi. 2001; 15:77-79.
40. Pfaller et al., For The SENTRY Participant Group (Europe). International Surveillance of Blood Stream Infections due to *Candida* Species in The European SENTRY Program: Species Distribution and Antifungal Susceptibility Including Investigational Triazole Echinocandin Agents. New York: Diagnostic Microbiology Infectious Diseases, 2001; 35:19-25.
41. Mc Carthy GM. Host factors associated with HIV related oral candidiasis. Oral Surg Oral Med 1992; 73:1816.
42. Birnbaum W, et al. Prognostic significance of HIV-associated oral lesions and their relation to therapy. Oral Diseases 2002; 8: 110-114.

43. Campsi G, Pizzo G, Milici ME, Mancuso S, Margiotta V. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus infected subjects. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2002; 93: 281-286.
44. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect. Immun*. 2003; 62:915-921.
45. Solbes JD, Myers PG, Kaye D, Levison ME. Adherence of *Candida albicans* to human increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* 1980; 28:464-468.
46. Hay RJ. Overview of studies of fluconazol in oropharyngeal candidiases. *Rev Infect Dis* 1990; 12:S334-S337.
47. Smoall EH, Melnick DA, Ruggeri R, et al. A novel natural inhibitor from *Candida albicans* hyphae causing dissociations of the neutrophil respiratory burst response to chemotactic peptides from other post activation events. *J. Immunol* 1988; 140: 3893-3899.
48. Gottlieb MS, Schrodd R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, and Sawon A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med*. 1981; 305:1425.
49. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Disponível em: <www.unaids.org/en/HIVdata/Epidemiology/epipublications.asp> Acesso em: 16/11/2006.

50. Canuto MM, Rodero GF, Ducasse OTV, Aguado HI, Gonzáles MC, Sevillano SA, Hidalgo MA. Determinants for the development of oropharyngeal colonization or infection by fluconazole-resistant *Candida* strains in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19(8):593-601.
51. Fichtenbaum CJS, Koletar C, Yiannoutsos F, Holland J, Pottage SE, Cohn A et al. Refractory mucosal candidiasis in advanced human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 30:749–756.
52. Dronda F, Alonso-Sanz M, Laguna F, Chaves F, Martinez-Suarez JV, Rodriguez-Tudella JL, Gonzalez-Lopez A, Valencia E. Mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non-*albicans Candida* strains in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996; 15: 446-452.
53. Abi-Said D. et al. The Epidemiology of Hematogenous Candidiasis by Different *Candida species*. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago. 1997; 24:1122-128.
54. Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, et al. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:3457-3459.
55. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:501-517.
56. Denning W D. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 2002; 362: 1142-1151.

57. Mellado E, et al. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20(10):523-530.
58. Nucci M, Colombo AL. Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. *Brazil J Infect Dis* 2002; 6(3):124-28.
59. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med* 1991; 325:1274-1277.
60. Schmidt-Westhausen AM, Bendick C, Reichart PA, Samaranayake LP. Oral candidosis and associated *Candida* species in HIV-infected Cambodians exposed to antimycotics. *Mycoses*. 2004 Oct;47(9-10):435-41.
61. Nguyen MH, Peacock JEJR, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Yu VL. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 100: 617-623, 1998.
62. Perea S, López-Ribot JL, Wickes BL, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmann SP, Keller SM, Martinez M, Patterson TF. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. 45:2676–2684.
63. Morschhäuser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1587:240-48.

64. Silva VV, Díaz MC, Febré N. Vigilancia de la resistencia de leveduras a antifúngicos. Rev Chil infect 2002; 19:56-65.
65. Sant' Ana PL, Milan EP, Martinez R, et al. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from Aids patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97: 253-257.
66. Vazquez JA, Arganoza MT, Boikov D, Yoon S, Sobel JD, Akins RA. Stable phenotypic resistance of *Candida* species to amphotericin B conferred by preexposure to subinhibitory levels of azoles. J Clin Microbiol. 1998 Sep;36(9):2690-5.
67. Duncan BB, Chambless LE, Schimdt ML, Folsom AR, Crouse JR, Carpenter MA. Association of the waist-to-hip ratio is different with wine than with beer or had liquor consumption. Atherosclerosis risk in Communities Study Investigators. Am. J. Epidemiol 1995; 142(10):1034-8.
68. Odds FC, Nuffel LV, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. J Clin. Microbiol. 1998; 36(10): 2869-2873.
69. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presuntive identification of clinically important *Candida* species. *Candida albicans*. J. clin. Microbiol. 1994; 32(8):1923-1929
70. Van Der Walt JP. Criteria and methods used in classification. In: Lodder J., ed. The Yeasts: a Taxonomic Study. 2nd. ed. Amsterdam: North – Holland Publishing Company 1971; 35-113.

-
71. Capoor MR, Nair D, Deb M, Verma PK, Srivastava L, Aggarwal P. Emergence of non-albicans *Candida* species and antifungal resistance in a tertiary care hospital. *Jpn J Infect Dis.* 2005, Dec; 58(6):344-8.
72. NCCLS, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard- Second Edition. NCCLS Document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.
73. Obuekwe ON, Onunu AN. Gender and Oral Manifestations of HIV Infection Among Adult Nigerians *African Journal of Reproductive Health*, Vol. 10, No. 2, August, 2005, pp. 81-89.
74. Santos NA, Paiva MS. Trajetória da infecção pelo HIV/AIDS em um município do interior da Bahia (Artigo) *Epidemiology, Prevention and Public Health*. Disponível em: <<http://www.aidscongress.net>> Acesso em: 16.02.2007.
75. Parker R, Camargo JRKR. Pobreza e HIV/aids: aspectos antropológicos e sociológicos. *Cadernos de Saúde Pública.* 2000; 16:89-102..
76. Rodrigues-Júnior AL, Castilho EA. A epidemia de AIDS no Brasil, 1991-2000: descrição espaço-temporal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2004 , jul-ago; 37(4):312-317.
77. Nascimento AMG, Barbosa CS, Medrado B. Mulheres de Camaragibe: representação social sobre a vulnerabilidade feminina em tempo de AIDS. Recife; *Rev. Saúde Coletiva* 2005 jan./mar; 5(1)..

78. Ministério da Saúde. DST-AIDS/Área Técnica/Epidemiologia/AIDS. <www.aids.gov.br/>. Acesso em: 04 de abril de 2007.
79. Bastos FI & Szwarcwald CL. AIDS e pauperização: principais conceitos e evidências empíricas. Brasília. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS; 1999.
80. Castilho EA, Bastos FI, Szwarcwald CL et al. AIDS in Brazil: a changing epidemic. *Cad. Saúde Pública* 2000;16 (SUPPL.1):S04-S05.
81. Jorge AO 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* 1997; 11 (4): 279-285.
82. Saramayake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73(2): 202-10.
83. Shirlaw PJ. et al. Oral and dental care and treatment protocols for the management of HIVinfected patients. *Oral Diseases* 2002; 8:136-143.
84. Hilton J F et al. Accuracy of diagnoses of HIVrelated oral lesions by medical clinicians. Findings from the women's interagency HIV study. *Community Dent Oral Epidemiol* 2001; 29: 362- 372.
85. Leggott PJ. Oral manifestations of HIV infection in children. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, 1992 Feb.; 73(2):18793 p.
86. Ramosgomez FJ et al. Classification, diagnostic criteria, and treatment recommendations for orofacial manifestations and in HIVinfected children. *Birmingham J Clin. Pediatr. Dent.*, 1999; 23(2): 8589 p.

87. Castro GF, Portela MB, Esteves C et al. Oral manifestations and their correlation with clinical/immunological classification in HIV+ children. *J . Dent. Res.*, Chicago, v. 79, Special Issue, p.480 (abstr. 2692), April, 2000.
88. Portela. MB, Ribeiro AA, Castro G F, et al.. Dental oral profile of HIVinfected children from Rio de Janeiro Brazil. *Chicago. J . Dent. Res.*, 2000;79 (Special Issue).
89. Santos LC, Castro GF, Souza IP et al. Oral manifestations related to immunosuppression degree in HIVpositive children. *Ribeirão Preto. Braz. Dent. J* 2001;12(2): 1358 p.
90. Hung CC, Yang YL, Lauderdale TL, Mcdonald LC, Hsiao CF, Cheng HH, Ho YA, Lo HJ. Colonization of Human Immunodeficiency Virus-Infected Outpatients in Taiwan with Candida Species. *J Clin Microbiol.* 2005 Apr; 43(4):1600-1606
91. Yang YL, Lo HJ, Hung CC, Li Y. Effect of prolonged HAART on oral colonization with Candida and candidíases. *BMC Infect Dis.* 2006; 20(6):8.
92. Walker AS, Mulenga V, Sinyinza F, Lishimpi K, Nunn A, Chintu C, et al. Determinants of survival without antiretroviral therapy after infancy in HIV-1-infected Zambian children in the CHAO Trial. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42: 637-45.
93. Ormaasen V, Sandvik L, Dudman SG, Bruun JN. HIV related and non-HIV related mortality before and after the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in Norway compared to the general population *Scand J Infect Dis.* 2007;39(1):51-7.

94. Jevtovic DO, Salemovic D, Ranin J, Pesic I, Zerjav S, Djurkovic-Djakovic O. Long-term survival of HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy in Serbia and Montenegro. *HIV Med.* 2007 Mar;8(2):75-9.
95. Korting HC, Schaller M, Eder G. et al. Effects of Human Immunodeficiency Virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999; 43 (8): 2038-42.
96. Cassone A, De Bernardis F, Torosantucci IA et al. In vitro and vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *J Infect Dis* 1999; 180:448-53.
97. Souza LB, Pereira PL, Medeiros AMC, Araújo RFJ, Mesquita OJX. Manifestações orais em pacientes com AIDS em uma população brasileira. *Pesq Odont Bras*, 2000 jan./mar.; 14(1):79-85.
98. Schuman P, Sobel JD, Ohmit SE, Mayer KH, Carpenter CC, Rompalo A, Duerr A, Smith DK, Warren D, Klein RS. Mucosal candidal colonization and candidiasis in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group. *Clin Infect Dis.* 1998 Nov;27(5):1161-7..
99. Klein RS, Harris CA, Small CB, Moll B, Lesser M, Friedland GH. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1984; 311:354-358
100. Ramirez-Amador V, Ponce-De-Leon S, Sierra-Madero J, Soto RL, Esquivel PL, Anaya SG. Synchronous kinetics of CD4+ lymphocytes and viral

- load before the onset of oral candidoses and hairy leukoplakia in a cohort of Mexican HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. V. 21, n. 12, p. 981-90, 2005.
101. Chiou C C, Groll AH, Gonzalez CE, Callender D, Venzon D, Pizzo PA, Wood L, Walsh TJ. Esophageal candidiasis in pediatric acquired immunodeficiency syndrome: clinical manifestations and risk factors. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000;19:729–734.
102. Lima OCC, Silveira FRX, Birman EG. Manifestações bucais de origem infecciosa em pacientes HIV-positivos ou com AIDS/ Doenças fúngicas. *Rev ABO Nac* 1994;2:28-32.
103. Shiboski CH . HIV-related oral disease epidemiology among women: year 2000 update. *Oral Dis* 2002; 8(Suppl 2):44–48.
104. Ranganathan K, Hemalatha R. Oral lesions in HIV infection in developing countries: an overview. *Adv Dent Res*. 2006 Apr 1;19(1):63-8.
105. Bauerle M, Schroppel K, Taylor K, Begmann S, Schmitt-Haendle M, T. Analysis of the *Candida albicans* - specific T-cell response and oropharyngeal *Candida* colonization in a cohort of HIV-1-infected patients. *Eur J Med Res*. 2006 Nov 30;11(11):479-84.
106. Greenspan JS, Greenspan D. The epidemiology of the oral lesions of HIV infection in the developed world. *Oral Dis* 2002; 8(Suppl 2):34–39.

-
107. Gugnani HC, Becker K, Fegeler W, Bau S, Chattopadhyaya D, Baveja U, Satyanarayana S, Kalghatgi T, Murlidhar A. Oropharyngeal carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in India. *Mycoses* 2003; 46:281-288.
108. Sanchez-Vargas LO, Ortiz-Lopez NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, Lopez-Ribot JL, Gaitan-Cepeda LA, Quindos G. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev Iberoam Micol.* 2005 Jun;22(2):83-92.
109. Schmidt-Westhausen AM et al. Decline in the rate of oral opportunistic infections following introduction of highly active antiretroviral therapy. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 336-341.
110. Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr, Enwonwu CO, Onwujekwe DI Jr, Merz WG, Meiller TF. Prevalence of yeast among children in Nigeria and the United States. *Oral Microbiol Immunol.* 2001 Dec;16(6):383-5.
111. Ohmit SE, Sobel JD, Schuman P, Duerr A, Mayer K, Rompalo A, Klein RS. Longitudinal study of mucosal *Candida* species colonization and candidiasis among human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women. *J. Infect. Dis.* 2003;188:118–127.
112. Mesquita RA, Aguiar MCF, Tarquino SBC et al. Candidíase oral co infecção HIV. *Rev CROMG* 1998;4:27-31.
113. Greenspan JS, Greenspan D. The epidemiology of the oral lesions of HIV infection in the developed world. *Oral Dis* 2002; 8(Suppl 2):34–39.

114. Childers EA, Stinnett P, Wheeler P et al. Oral complications in children with cancer. *Oral Surg Oral Med Patol Oral* 1993;75:41-47.
115. Epstein JE, Freilich MM, LE ND. Risk factors for oropharyngeal candidiasis in patients who receive radiation therapy for malignant conditions of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Pathol* 1993 ;76(2)269-274.
116. Samaranayake LP, Lamey PJ, Lamb AB, Macfarlane TW. Oral carriage of *Candida* species and coliforms in patients with burning mouth syndrome. *J Oral Pathol* 1989; 18:233-5.
117. Dunne WM. *Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?* *Clinical Microbiology Reviews*. 2003; 15:155-166.
118. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD et al. Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. *J Infect Dis*. 2000; 30: 662-678.
119. Berardi R. Peptic Ulcer Disease. Em: Dipiro J et al, eds, *Pharmacotherapy*. New York McGraw- -Hill. A Pathophysiologic Approach, 2002; 5a ed.
120. Fidel PL Jr. Candida-host interactions in HIV disease: relationships in oropharyngeal candidiasis. *Adv Dent Res*. 2006 Apr 1;19(1):80-4.
121. Zardo, F.; Mezzan, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. *NewsLab* 2004; 63.
122. Rocha CGB, Reis C, Pimenta FC. Contagem e identificação de microrganismos na saliva de portadores do vírus da imunodeficiência humana

- antes e após higienização e bochecho com anti-sépticos. *Revista de Patologia Tropical* 2006 maio-ago.; 35(2): 125-133.
123. Atique TSC. Pesquisa das Espécies e Sensibilidade Antifúngica de *Candida* sp. em Indivíduos soropositivos para o HIV. [dissertação]. São José do Rio Preto, (SP): Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP – 2006.
124. Pfaller MA et al. and the scope participant group. National Surveillance of Nosocomial Blood Stream Infection due to *Candida* Other than *Candida albicans*: Frequency of Occurrence and Antifungal Suscetibility In The Scope Program. *Diagnostic Microbiology Infectious Diseases*, New York, 1998a; 30:121-129.
125. Hodgson TA, Greenspan D, Greenspan JS. Oral Lesions of HIV Disease and HAART in Industrialized Countries. *Adv Dent Res* 19:57-62, April, 2006.
126. Margiotta V, Campisi G, Mancuso S, Accurso V, Abbadessa V. HIV infection: oral lesions, CD4+ cell count and viral load in an Italian study population. *J OralPatholMed* 1999;28:173-7.
127. Schorling SR, Kortinga HC, Froschb M, Mühlischlegel FA. The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Crit Rev Microbiol*. 2000; 26(1): 59-68.
128. Alves SH, Milan EP, Branchini ML, Nishimura K, Fukushima K, Oliveira LO, et al. first isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001; 39(3):165-168.

129. Meiller TF, Jabrarizk MA, Baqui AMA et al. Oral *Candida dubliniensis* as a clinically important species in HIVseropositive patients in United States. Oral Surg. Oral Med, Oral Pathol. Oral Radiol. Oral Endod., St. Louis, v. 88, n. 5, p. 573580, Nov., 1999.
130. Brito Gamboa A, Mendoza M, Fernández A, Díaz E. Detection of *Candida dubliniensis* in patients with candidiasis in Caracas, Venezuela. Rev Iberoam Micol. 2006 Jun;23(2):81-4.
131. Binolfi A, Biasoli MS, Luque AG, Tosello ME, Magaro HM. High prevalence of oral colonization by *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. Clin Microbiol. 1999 Feb;37(2):321-326.
132. Binolfi A, Biasoli MS, Luque AG, Tosello ME, Magaró HM. High prevalence of oral colonization by *Candida dubliniensis* in HIV-positive patients in Argentina. Med Mycol. 2005 Aug;43(5):431-7.
133. Blignaut, E., S. Messer, R. J. Hollis, and M. A. Pfaller. 2002. Antifungal susceptibility of South African oral yeast isolates from HIV/AIDS patients and healthy individuals. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 44:169–174.
134. Kim JO, Garofalo L, Shelly BD, MCGowan KL. *Candida dubliniensis* infections in a pediatric population: retrospective identification from clinical laboratory isolates of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2003; 41(7):3354-3357.
135. Portela MB, Souza IP, Costa EM, Hagler NA, Soares RM, Santos AL. Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in human

- immunodeficiency virus positive and health children from Rio de Janeiro, Brazil. *J clin Microbiol*. 2004 dec;42(12):5925-7.
136. Milan EP, Burattini MN, Kallas EG, Fischman O, Costa PRO, Colombo AL. Azole reistence among oral *Candida* species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure. *Diagn Microbiol Infect Dis* 32: 1115-1118, 1998.
137. Milan EP, De Laet Santana P, De Azevedo Melo AS. Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001; 41(1/2): 29-35.
138. Powderly WG, Robinson K, Keath EJ. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus- positive patients: evidence for two patterns of recurrence. *J. Infect. Dis*. 1993;168:463–466
139. Sangeorzan JA, Bradley SF, He X, Zarins LT, Ridenour GL, Tivalli RN, Kauffman CA. Epidemiology of oral candidíases and HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med* 1994; 97(4):339-346.
140. Bradley SF, He X, Zarins LT, Ridenour GL, Tiballi RN, Kauffman CA. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am. J. Med*. 1994; 97:339–346.

141. Martins MD, Lozano-Chiu M, Rex JH. Point prevalence of Oropharyngeal carriage of fluconazole-resistant *Candida* in human immunodeficiency virus infected patients. *Clin Infect Dis* 1997;25(4):843-846.
142. Redding SW, Pfaller MA, Messer SA, Smith JA, Prows J, Bradley LL, Fothergill AW, Rinaldi MG. Variations in fluconazole susceptibility and DNA subtyping of multiple *Candida albicans* colonies from patients with AIDS and oral candidiasis suffering one or more episodes of infection. *J. Clin. Microbiol.* 1997.35:1761–1765.
143. Barchiesi F, Arzeni D, Del Prete MS, Sinicco A, Falconi DF, Pasticci MB, Lamura L, Nuzzo MM, Burzacchini F, Coppola S, Chiodo F, Scalise G. Fluconazole susceptibility and strain variation of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients with oropharyngeal candidosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998; 41:541–548.
144. Lasker BA, Elie CM, Lott TJ, Espinel-Ingroff A, Gallagher L., Kuykendall RJ, Kellum ME, Pruitt WR, Warnock DW, Rimland D, Mcneil MM, Reiss E. Molecular epidemiology of *Candida albicans* strains isolated from the oropharynx of HIV-positive patients at successive clinic visits. *Med. Mycol.* 2001; 39:341–352.
145. Vargas GK, Joly S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidíases in human immunodeficiency virus-positive individuals. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40:341-350.

146. Cartledge JD, Midgley J, Gazzard BG. Non-albicans oral candidosis in HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother* 1999 Mar;43(3):419-22.
147. Woolhouse MEJ et al. Centre for Infectious Diseases, University of Edinburgh, UK Population Biology of Multiple Hosts and Multiple Pathogens University of Edinburgh, 2005 March.
148. Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA, Pfaller MA. Epidemiology of Candidemia: 3-Year Results from the Emerging Infections and the Epidemiology of Iowa Organisms Study *J.Clin. Microbiol.* 2002; 40.
149. Fleck R, Dietz A, Hof H. In vitro susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest: *J Antimicrob Chemother.* 2007 Apr;59(4):767-71.
150. Miyazaki H, Miyazaki Y, Geber A, Parkinson T, Hitchcock C, Falconer DJ, Ward DJ, Marsden K et al. Fluconazole Resistance Associated with Drug Efflux and Increased Transcription of a Drug Transporter Gene, *PDH1*, in *Candida glabrata* Antimicrobial agents and chemotherapy, July 1998; 42(7):1695–1701.
151. Safdar A, Perlin DS & Armstrong D. - Hematogeneous infections due to *C. parapsilosis*: changing trends in fungemic patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. *Diagn. Microbiol. infect. Dis.*, 44: 11-16, 2002.

152. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral Candida: Clearance, colonization, or candidiasis?, *J. Dent. Res.* 1995;74: 1152-1161.
153. Budtz-Jørgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a longterm care facility. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 2000; 28: 141-149.
154. Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people, *J. Oral Rehabil.* 2002; 29: 300-304.
155. Pires FR, Santos EBD, Bonan PRF, et al. Denture stomatitis and salivary Candida in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabilitation.* 2002; 19:1115-1119.
156. Narhi TO, Tenovuo J, Amano A. Antimicrobial factors, sialic acid, and protein concentration in whole saliva of the elderly. *Scand. J. dent. Res.* 1994; 102(2): 120-125.
157. Nederfors et al. Xerostomia and Hyposalivation. *Adv Dent Res* 2000 december; 14:48-56.
158. Daniels TE, Fox PC. Salivary and oral components of Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 571-89.
159. Malagón SX, Chimenos E, López J, Jané E, Roselló X, Mohammad N. Aspectos clínico-terapéuticos de la patología de las glándulas salivales en la infección por VIH. *Av Odontoestomatol* 1997; 15: 453-8.A.

160. Malagón SX, Chimenos E, López J, Jané E, Roselló X, Mohammad N. Aspectos clínico-terapéuticos de la patología de las glándulas salivales en la infección por VIH. *Av Odontoestomatol* 1997; 15: 453-8.B.
161. Chávez EM, Taylor GW, Borrell LN, Ship JA. Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89: 305-11.
162. Chimenos E, Marques MS. Boca ardiente y saliva. *Med Oral* 2002; 7: 244-53.
163. Salas EJ. Impacto de los tratamientos antirretrovirales en la patología oral de pacientes vih positivos. Tese de doutorado. Departament d'Odontoestomatologia Facultat d'Odontologia Universitat de Barcelona. Barcelona 2002.
164. Al-Hashimi I. Tratamiento del Síndrome de Sjögren en la práctica odontológica. *JADA* 2002; 5: 37-45.
165. Jabrahizk MA, Falker WA, Enwonwu CO, Onwujekwe DI, Merz G, Meiller TF. Prevalence of yeast among children in Nigeria and United States. *Oral Microbiol .Immun.*, Copenhagen 2001;16: 3835 p.
166. Kubler A, Ziegler C, Barth T, Zoller J. Squamous epithelial carcinoma in a 27-year-old patient with cellular immune defect *Mund Kiefer Gesichtschir.* 1998 Mar;2(2):58-61.
167. Ship JA. Diabetes and oral health: an overview. *JADA* 2003;134 (Suppl.):4S-10S.

-
168. Levin RP et al. How treating the patient with diabetes can enhance your practice Recommendations for practice management. JADA, 2003 October;134.
169. Twetman S, Johansson I, Birkhed D, Nederfors T. Caries incidence in young type 1 diabetes mellitus patients in relation to metabolic control and caries-associated risk factors. Caries Res 2002; 36:31-5.
170. Castro GF, Souza IPRF. Frequency of oral manifestations in HIV infected children. J . Dent. Res., Chicago, v. 78, n. 5, p. 1026, abstract B260, May, 1999.
171. Arribas JR, Hernandez-Albujar S, Gonzales-Garcia JJ, Pena JM, Gonzales A, Canedo T, Madero R, Vazquez JJ, Powderly WG. Impact of protease inhibitor therapy on HIV-related oropharyngeal candidiasis. AIDS 2000;14(8):979-85.
172. Patton LL, Mckaig R, Straauss R, Rogers D, Enron JJ JR. Changing prevalence of oral manifestations of human immunodeficiency virus in the era of protease inhibitor therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2000;90:299-304.
173. Zepelin MB, Meyer I, Thomssen R. et al. HIVproteinase inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. J. Invest Dermatol 1999; 113 (5): 747751.
174. Holmes H, Arendorf T. Are the oral manifestations associated with HIV infection really relevant to the practising South African dentist? A comparative analysis of oral HIV studies in South Africa. SADJ. 1999 Dec;54(12):631-5.

-
175. Hilton JF, MacPhail LA, Pascasio L, Sroussi HY, Cheikh B, LaBao ME, Malvin K, Greenspan D, Dodd MJ. Self-care intervention to reduce oral candidiasis recurrences in HIV-seropositive persons: a pilot study. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004 Jun;32(3):190-200.
176. Maenza JR, Keruly JC, Moore RD, Chaisson RE, Merz WG, Gallant JE. Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1996 Jan;173(1):219-25.
177. Colombo AL, Matta D, Almeida LP, Rosas R. Fluconazole Susceptibility of Brazilian Candida Isolates Assessed by a Disk Diffusion Method. *The Brazilian Journal of Infections Diseases.* 2002. 6(3): 118-123.
178. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer AS, Boyken L, Hollis RJ. Activities of Fluconazole and Voriconazole against 1586 Recent Clinical Isolates of *Candida species* determined by Broth Microdilution, Disk Diffusion, and Etest Methods: Report from The ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *J Clin Microbiol.* 2003. 41(4): 1440-1446.
179. Meis J et al. A global evaluation of the susceptibility of *Candida* sp. to fluconazole by disk diffusion. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 36:215-223.
180. Espinel-Ingroff A et al. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol,* 29: 1089-94, 1991.
181. Latiff AA, Banerjee U, Rajendra P, Biswas A, Wig N, Sharma N, Haque A, Gupta N, Baquer NZ, Mukhopadhyay G. Susceptibility Pattern and Molecular Type of Species-Specific Candida in Oropharyngeal Lesions of

- Indian Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar. 2004.
182. Lacaz CS, Negro G. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia médica fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo : Savier, 1991; 616-651.
183. Arenas R. *Micologia medica ilustrada*. México: Nueva editorial interamericana, 1993;359-376.
184. Barchiesi F, Hollis RJ, Del Poeta M, MCGough DA, Scalise G, Rinaldi MG, Pfaller MA. Transmission of fluconazole-resistant *Candida albicans* between patients with AIDS and oropharyngeal candidíases documented by pulsed-field gel electrophoresis. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 561–564.
185. Walsh TJ, Gonzalez CE, Piscitelli S, Bacher JD, Peter J, Torres R, Shetti D, Katsov V, Kligys K, Lyman CA. Correlation between in vitro and in vivo antifungal activities in experimental fluconazole resistant oropharyngeal and esophageal candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:2369–2373.
186. Newman SL, Flanigan TP, Fisher A, Rinaldi MG, Stein M, Vgilante K. Clinically significant mucosal candidiasis resistant to fluconazole treatment in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1994; 19(4):684-686.

Apêndice 1.

TERMO DE PARTICIPAÇÃO E LIVRE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa chamada “*Candida* sp. na microbiota oral de indivíduos soropositivos para o HIV-1 e Imunocompetentes”. Esse projeto coordenado pela Prof.^a Dr.^a Andréa R. B. Rossit, vai estudar os micróbios causadores da candidíase (sapinho) nas pessoas portadoras e não portadoras do HIV. Sua participação consiste em permitir, caso queira, que os profissionais de saúde (médicos ou enfermeiros), façam uma raspagem, com material estéril de uso individual, da parte interna de sua bochecha. Depois disso, faremos uma avaliação dos micróbios em laboratório. Essa coleta não terá desconforto ou alteração em seu quadro clínico. Vale a pena lembrar que todos temos micróbios em nosso organismo e que apenas em algumas situações especiais eles podem causar doença.

Queremos deixar claro que seu nome nunca será divulgado, nem a origem das informações que você nos fornecer. Durante a pesquisa, você poderá tirar qualquer dúvida a respeito do trabalho e, se necessário, entrar em contato com a coordenadora da mesma, a Prof.^a Dr.^a Andréa R. B. Rossit, pelo telefone: 017-3201-5736/5911, na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Você também não terá nenhuma despesa com essa pesquisa. O material cedido destina-se a análise científica e não pode ser comercializado ou fornecido como resultado da análise clínica.

Caso tenha dúvidas sobre esse acordo ou alguma questão que não tenha sido resolvida, você ainda poderá entrar em contato com a Comissão de Ética da Faculdade (017-3201-5700 R 5813).

São José do Rio Preto, _____, _____, _____
Nome do sujeito da pesquisa: _____

Assinatura: _____

Endereço:

RG do prontuário médico:

Médico responsável:

Telefone:

Pesquisadora responsável:

Prof.^a Dr.^a Andréa Regina Baptista Rossit

FAMERP: Centro de Investigação de Microrganismos.

FONE: (0XX17) 3201 5700 R: 5736/5911

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 Vila São Pedro, CEP 15090-000

Apêndice 2.

FICHA EPIDEMIOLÓGICA

Nº amostra:

Nome:

Rg do prontuário:

Idade:

Sexo: 1) Masculino 2)Feminino

Etnia: 1) Caucasóide 2) Negróide 3) Mestiço 4)Oriental
5) Indígena

Endereço : 1) zona rural 2) zona urbana 3) semi urbana 4)periferia

Paciente internado? 1) Sim 2) Não

Data da internação:

Tempo de internação:

É usuário de prótese dentária: 1) Sim 2) Não

Como realiza a higiene bucal? 1) Escova dental
2) Escova + fio dental
3) Outro:

Qual a freqüência? 1) 1x/dia 2) 2x/dia 3) 3x/dia
4) 4x/dia 5) + de 4x/dia

É usuário de drogas injetáveis: 1) Sim 2) Não

Abuso de álcool? 1) Sim 2) Não

Primeira infecção? 1) Sim 2) Não

Transplantado? 1) Sim 2) Não

Necessitou de Unidade de Terapia Intensiva? 1) Sim 2) Não
Quanto tempo permaneceu na UTI?

É portador de : 1) HIV Contagem de CDC Carga Viral
CD4 CD8
2) Diabete

- 3) neoplasia local:
- 4) neutropenia
- 5) doença crônica qual?
- 6) válvula cardíaca
- 7) prótese
- 6) Outras Qual?

Necessitou ou necessita de: 1) terapia imunossupressora
2) hemodiálise
3) nutrição parenteral
4) ventilação mecânica
5) transfusão de sangue quantas?
6) quimioterapia
7) radioterapia
8) sondagem tipo:
9) cateter venoso central

Já fez uso de: Antibioticoterapia 1) Sim 2) Não
Agente:
Período:
Poliquimioterapico? 1) Sim 2) Não
Antifungicoterapia 1) Sim 2) Não
Motivo/agente:
nº de hemoculturas positivas:
qual antifúngico?
Dose?
Por quanto tempo?
Há quanto tempo?
Terapia antiretroviral 1) Sim 2) Não
Qual:
Período:
Há quanto tempo?

Observações :

Apêndice 3

Apêndice 4.

Critérios para definição da sensibilidade aos antifúngicos testados por meio do antifungigrama por disco difusão

Susceptibilidade	ANTIFÚNGICO TESTADO / HALO DE INIBIÇÃO (mm)			
	Fluconazol	Itraconazol	Cetoconazol	Anfotericina B
Sensível	>19	≥20	>20	>10
Intermediário	14 a 19	12 a 19	10 a 20	
Resistente	<14	≤10	≤20	≤10

FONTE:CECON: Disponível em:< www.ceconsp.com.br/produtos.html>, acesso em 10/05/2005.

Apêndice 5.

Crítérios de susceptibilidade aos antifúngicos: fluconazol e itraconazol para o teste de Microdiluição

Suscetibilidade	CIM fluconazol (µg/mL)	CIM itraconazol (µg/mL)
Sensível	≤8	≤0,125
S-DD	16 e 32	0,25 -0,5
Resistente	≥64	≥ 1

Fonte: NCCLS. Método de Referência para testes de diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada –Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suíte 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 *Estados Unidos*, 2002.S-DD: sensível dependente da dose.

Apêndice 6.

Resumo

Este estudo avaliou *Candida* sp. isolada da mucosa orofaríngea e sua sensibilidade antifúngica em 52 portadores do HIV/Aids, residentes na Região Noroeste Paulista e respectivos controles. Para tanto, foram utilizados testes clássicos, o “kit” API20IDAUX e a disco difusão para: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol. O isolamento de *Candida* sp. foi maior ($p < 0,05$) em pacientes e controles, sendo o índice de colonização/infecção superior entre usuários de próteses dentárias, em ambos os grupos ($p < 0,05$). A frequência de espécies “não-*albicans*” não diferiu (21%) nesses grupos. Todas as cepas obtidas foram sensíveis a anfotericina B, enquanto uma cepa de *C. albicans* foi resistente a todos os azóis. Treze por cento das cepas foram resistentes ao fluconazol, em ambos os grupos. Nossos resultados mostram que o grupo HIV/Aids é mais colonizado por *Candida* sp. que os soronegativos para este vírus, sem mudança na proporção *Candida albicans* / “não-*albicans*” ou no perfil de resistência aos azóis.

Palavras-chave: HIV, microbiota oral, *Candida* sp., drogas antifúngicas.

Apêndice 7.

Aprovação trabalho 22/2007 - Revista Panamericana de Infectologia

- Original Message -----

From: [Revista API](#)

To: [Andrea](#)

Sent: Friday, July 27, 2007 1:07 PM

Subject: Aprovação trabalho 22/2007 - Revista Panamericana de Infectología

Prezada Dra. Andréia,

É com satisfação que a Revista Panamericana de Infectología comunica que o trabalho 22/2007: "*Candida* sp. na cavidade oral de indivíduos soropositivos e soronegativos para HIV-1 no Noroeste Paulista, Brasil", de Gismar Monteiro Castro Rodrigues, Tábata Dias Capobianco, Tábata Salum Callile Atique, Luciana Moran Conceição, Valéria Daltibari Fraga, Maria José Soares Mendes Giannini, Irineu Luiz Maia, Margarete Teresa Gottardo de Almeida, Ricardo Luiz Dantas Machado e de sua autoria foi aprovado para publicação na Revista Panamericana de Infectología no dia 27 de julho de 2007.

Atenciosamente,

Cynthia de Oliveira Araújo
Jornalista Responsável
Office Editora e Publicidade
Tel.: (11) 5078-6815/5587-5300
www.revista-api.com.br

Apêndice 8.

ARTÍCULO ORIGINAL/ARTIGO ORIGINAL

Estudo de colonização por *Candida* sp. na cavidade oral de indivíduos soropositivos e soronegativos para HIV-1 no Noroeste Paulista, Brasil

Candida sp. in the oral cavities of HIV-1 serum positive and serum negative individuals from the Northeastern São Paulo State region, Brazil

Gismar Monteiro Castro Rodrigues¹
Tábata Dias Capobianco¹
Tábata Salum Callile Atique¹
Luciana Moran Conceição¹
Valéria Daltibari Fraga¹
Maria José Soares Mendes Giannini³
Irineu Luiz Maia²
Ricardo Luiz Dantas Machado¹
Margarete Teresa Gottardo de Almeida⁴
Andréa Regina Baptista Rossit^{1*}

¹Centro de Investigação de Microrganismos, Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, São Paulo.

²Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital de Base, Fundação Faculdade Regional de Medicina (FUNFARME).

³Laboratório de Micologia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara, Araraquara, São Paulo.

⁴Laboratório de Microbiologia da FAMERP, Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, São Paulo.

Auxílio financeiro: Fapesp 02/09546-1 e PIBIC/CNPq

Rev Panam Infectol 2007;9(3):26-31

Conflicto de intereses: ninguno

Recibido en 24/4/2007.

Aceptado para publicación en 27/7/2007.

Resumo

Este estudo avaliou *Candida* sp. isolada da mucosa orofaríngea e sua sensibilidade antifúngica em 52 portadores do HIV/Aids, residentes na Região Noroeste Paulista e respectivos controles. Para tanto, foram utilizados testes clássicos, o "kit" API20IDAUX e a disco difusão para: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol. O isolamento de *Candida* sp. foi maior ($p < 0,05$) em pacientes e controles, sendo o índice de colonização/infecção superior entre usuários de próteses dentárias, em ambos os grupos ($p < 0,05$). A frequência de espécies "não-*albicans*" não diferiu (21%) nesses grupos. Todas as cepas obtidas foram sensíveis a anfotericina B, enquanto uma cepa de *C. albicans* foi resistente a todos os azóis. Treze por cento das cepas foram resistentes ao fluconazol, em ambos os grupos. Nossos resultados mostram que o grupo HIV/Aids é mais colonizado por *Candida* sp. que os soronegativos para este vírus, sem mudança na proporção *Candida albicans*/"não-*albicans*" ou no perfil de resistência aos azóis.

Palavras-chave: HIV, microbiota oral, *Candida* sp., drogas antifúngicas.

Abstract

This study evaluated *Candida* sp. and its antifungal sensitivity profile in the oral mucosa of 52 HIV/Aids carriers and respective controls in the Northeastern São Paulo State region. Classic tests and the API20IDAUX kit as well as the disc-diffusion method (anfotericin B, fluconazol, itraconazol and cetoconazol) were performed. *Candida* sp. isolation rate was higher ($p < 0,05$) in patients than controls and the colonization rate was superior among dental apparatus users, in both groups ($p < 0,05$). *Candida* "non *albicans*" species frequencies did not differ (21%) between these groups. All isolated strains were susceptible to anfotericin B, while one *C. albicans* strain was resistant to all azoles. Thirteen percent of the strains were resistant to fluconazol, in both groups. Our results show that the HIV/Aids group

is more frequently colonized by *Candida* sp. than the serum-negative individuals, without alterations in the *C. albicans*/"not *albicans*" ratio or in the resistant phenotype to azoles.

Key words: HIV, oral flora, *Candida* sp., Antifungal drugs.

Introdução

As leveduras do gênero *Candida* sp. colonizam como agentes comensais a cavidade bucal de cerca de 30% a 35% da população adulta sem evidência de infecção e a espécie *Candida albicans* corresponde a 95% do total de isolados.⁽¹⁾ De fato, relatos de colonização de mucosas do trato gastrointestinal⁽²⁾ por *Candida* sp. e de candidíase de manifestação superficial^(3,4) têm sido descritos na literatura. Os principais fatores relacionados a esses fenômenos são o advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) e o uso difundido da antibioticoterapia de largo espectro de ação, bem como da quimioprofilaxia antifúngica, também administrados aos portadores de neoplasias e transplantados e que, por sua vez, selecionam agentes oportunistas e cepas resistentes.⁽⁵⁾ Em pacientes soropositivos para o HIV, a candidíase de mucosa é ocorrência freqüente, sendo a *C. albicans* o agente responsável por cerca de 85% das infecções.^(3,6) Dentre as espécies "não-*albicans*", algumas são consideradas patógenos emergentes, dentre elas a *C. dubliniensis* e a *C. glabrata*, já que, além de outras propriedades, a primeira manifesta rápida resistência após exposição ao fluconazol, enquanto a segunda tem como característica marcante a resistência intrínseca ao mesmo.⁽⁷⁾

Apesar da aprovação dos antifúngicos imidazólicos e triazólicos ter representado um grande avanço no tratamento de infecções fúngicas sistêmica e local, atualmente verifica-se que o amplo emprego desses no tratamento de patologias por leveduras tem favorecido a seleção de cepas com reduzida sensibilidade ou até mesmo a manifestação do fenótipo resistente. Por sua vez, o perfil de sensibilidade de *Candida* sp. aos antifúngicos difere, o que torna fundamental a identificação do agente etiológico causador da candidíase antes de iniciar a terapêutica empírica.^(8,4)

A prevalência da infecção pelo vírus HIV no Sudeste do Brasil é alta, contribuindo com cerca de 68% de todos os casos do país, sendo que o município de São José do Rio Preto destaca-se no Estado de São Paulo na quinta posição em número de casos.⁽⁹⁾ O Hospital de Base de São José do Rio Preto é um hospital escola de nível terciário, responsável pelo atendimento da grande

maioria da população da Região Noroeste do Estado de São Paulo. Nesse contexto, é a referência regional para o tratamento dos portadores do HIV e doentes de Aids.

O objetivo deste estudo foi determinar as freqüências e perfil de sensibilidade antifúngica das espécies de *Candida* sp., isoladas a partir da mucosa orofaríngea de portadores do HIV-1, com a doença Aids manifesta ou não, e de seus respectivos controles, bem como avaliar os fatores de risco associados à presença dessas leveduras.

Pacientes e métodos

Foi efetuada a coleta a partir da mucosa oral de 52 pacientes portadores do HIV, com a doença Aids manifesta ou não, atendidos no ambulatório de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs) ou internados no Setor de Doenças Infectoparasitárias do Hospital de Base de São José do Rio Preto, utilizando-se um swab estéril de transporte. As amostras foram imediatamente encaminhadas ao Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) para processamento. Os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos a partir dos prontuários e entrevista, sendo em seguida anotados em ficha apropriada e posteriormente registrados em base de dados. Paralelamente à coleta realizada no grupo de pacientes, foram obtidas amostras a partir do mesmo número de indivíduos saudáveis, recrutados entre alunos e funcionários da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), pareados por etnia, idade e sexo, para constituir o grupo controle. Foram consideradas cepas colonizantes aquelas provenientes da mucosa oral de indivíduos que não referiram sintomas de candidíase oral no momento da coleta, enquanto as infectantes foram isoladas a partir de mucosas orais afetadas. As amostras foram semeadas em meio CHROMagar *Candida* (BioMérieux, Paris, França) e incubadas a 30°C por até cinco dias para identificação presumida. Em paralelo, o material obtido foi semeado em ágar Sabouraud para posterior análise micromorfológica por meio dos testes de formação do tubo germinativo e microcultivo em ágar Corn Meal CM103® (Oxoid) acrescido de Tween 80 P.S.® (Vetec) e bioquímica pelo kit comercial API 20 ID C AUX (BioMérieux, Paris, França), de acordo com instruções do fabricante. O perfil de sensibilidade antifúngica foi avaliado por disco difusão (M-44P, NCCLS),⁽⁸⁾ frente as seguintes drogas: anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e fluconazol (CECON, Brasil). As análises foram realizadas no programa estatístico EPIINFO (versão 6.0). Para obter a in-

dependência entre as proporções foram utilizados o teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5%.

Aspectos éticos

O protocolo deste estudo foi elaborado de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Resolução do Conselho Nacional de Saúde n. 196/96, de 10 de outubro de 1996) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da FAMERP (protocolo n° 5386/2002). Os indivíduos aqui recrutados foram previamente elucidados quanto ao estudo a ser desenvolvido e aqueles que concordaram em participar, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram incluídos.

Resultados

Para ambos os grupos, a média de idade foi de 42,71 anos ($s^2 = 10,37$) e a faixa etária variou de 22 a 73 anos. Quanto ao gênero, a maioria (61,54%) pertenceu ao sexo masculino e, em relação à etnia, aproximadamente 81% foi classificada como caucasóide e os demais como negróides. O tempo médio de diagnóstico positivo para o HIV-1 foi de 6,72

anos, variando de um mês a 20 anos. A pesquisa do *status* imunológico forneceu contagem de células TCD4⁺ variando de 2 a 1130 U/mm³ ($\bar{X} = 232,44$ e $s^2 = 270$ U/mm³), enquanto a média da carga viral foi de $\bar{X} = 56260,8$ cópias/mm³.

As características clínico-epidemiológicas dos portadores do HIV-1 e/ou doentes com Aids e respectivos controles estão sumarizadas na Tabela 1. O maior índice no uso de prótese dentária foi verificado no grupo HIV/Aids (qui-quadrado, $p = 0,002$), que também realizava higiene bucal de pior qualidade (qui-quadrado, $p = 0,019$). Além disso, o mesmo grupo apresentou maior frequência de etilistas (qui-quadrado, $p = 0,011$) e de usuários de drogas injetáveis (teste exato de Fischer, $p = 0,006$), o que ocorreu também em relação ao uso de antibioticoterapia (46,15% em pacientes versus 2% grupo controle), antifúngicos e anti-retrovirais (84,5% em pacientes versus zero grupo controle, qui-quadrado, $p < 0,001$). Por fim, os portadores do HIV/doentes de Aids foram mais afetados pela candidíase orofaríngea do que os indivíduos saudáveis (teste exato de Fischer, $p = 0,005$).

A taxa de isolamento de *Candida* sp. foi significativamente maior (76,9%) no grupo HIV/Aids que no grupo controle (50% - qui-quadrado, $p < 0,05$). Uma relação diretamente proporcional foi verificada quanto ao número de cópias do HIV-1 e a incidência de colonização/infecção por *Candida* sp. (qui-quadrado, $p < 0,05$). Foram isoladas cerca de 79% de cepas de *Candida albicans* e 21% de *Candida* "não-*albicans*", nos dois grupos

Tabela 1. Características clínico-epidemiológicas dos portadores do HIV-1 e/ou doentes com Aids e respectivos controles

Variável	Pacientes (n = 52)		Grupo Controle (n = 52)		P
		%		%	
Higiene Oral					
Satisfatória	30	57,6	42	80,7	0,019*
Insatisfatória	22	42,4	10	19,3	
Prótese Dentária					
Sim	26	50	10	19,2	0,002*
Não	26	50	42	80,8	
Uso de Drogas Injetáveis					
Sim	7	13,5	0	0	0,006**
Não	45	86,5	52	100	
Etilista					
Sim	15	28,8	4	7,6	0,011*
Não	37	71,2	48	92,3	
Candidíase Orofaríngea					
Sim	8	15,4	0	0	0,005**
Não	44	84,6	52	100	
Internação (prévia ou atual)					
Sim	27	51,9	4	7,7	< 0,001*
Não	25	48,1	48	92,3	
Terapia Antimicrobiana*					
Sim	33	63,5	1	1,9	< 0,001*
Não	19	36,5	51	98,1	
Uso da HAART					
Sim	35	67,3	0	0	< 0,001*
Não	17	32,7	52	100	

*Antibacterianos e/ou Antifúngicos; *Qui-quadrado; **Teste Exato de Fischer

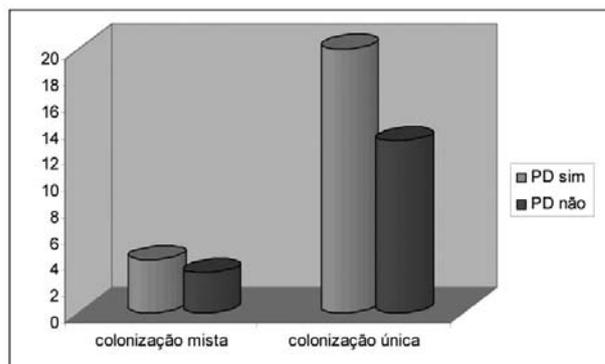


Figura 1. Distribuição dos pacientes soropositivos para HIV e doentes com Aids de acordo com o índice de colonização mista por *Candida* sp. nos pacientes que fazem (PD sim) ou não (PD não) uso de prótese dentária (qui-quadrado; $P < 0,05$).

Tabela 2. Distribuição das cepas de *Candida* sp. isoladas (n = 47) a partir da mucosa de indivíduos soropositivos para o HIV-1 segundo perfil de sensibilidade aos antifúngicos: cetoconazol, anfotericina B, itraconazol, fluconazol

Antifúngicos	Perfil de Sensibilidade (%)			Total
	Sensível	Intermediária	Resistente	
Cetoconazol	97,87	2,13	0	100
Itraconazol	61,7	38,3	0	100
Fluconazol	80,85	6,38	12,77	100
Anfotericina B	100	00	00	100

estudados. As cepas de *Candida* “não-*albicans*” isoladas a partir da mucosa oral dos pacientes foram: duas cepas de *C. dubliniensis*, duas de *C. krusei*, duas de *C. inconspicua*, duas de *C. tropicalis* e, finalmente, uma como *C. guilhermondii* e uma como *C. famata*. Já no grupo controle, as *Candida* “não-*albicans*” foram classificadas como: *C. glabrata* (três cepas) e como *C. famata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (uma cepa de cada). No grupo controle, três indivíduos (7%) apresentaram dupla colonização. Em dois deles foram isoladas cepas de *C. glabrata* e *C. albicans*, enquanto um terceiro apresentou *C. parapsilosis* e *C. albicans*. Sete indivíduos do grupo HIV/Aids apresentaram diferentes combinações de espécies configurando dupla colonização (14%): dois deles portavam *C. albicans* e *C. inconspicua*; um *C. albicans* e *C. guilhermondii*; um *C. albicans* e *C. dubliniensis*; um *C. krusei* e *C. dubliniensis*; um *C. albicans* e *C. krusei* e, um último, *C. albicans* e *C. famata*. O índice de colonização (única e mista) foi superior (qui-quadrado, $p < 0,05$) em usuários de próteses em relação aos não usuários, tanto em pacientes (Figura 1) quanto nos indivíduos saudáveis. Trinta e três por cento das cepas isoladas a partir da mucosa oral desses indivíduos correspondem a *Candida* “não-*albicans*”. Dentre as cepas de *C. albicans* obtidas dos soropositivos para o HIV, verificou-se que 8% eram resistentes ao fluconazol, enquanto 35% apresentavam sensibilidade intermediária (uma para o cetoconazol e 12 para o fluconazol; Tabela 2). Já dentre as *Candida* “não-*albicans*”, 30% mostraram resistência ao fluconazol, enquanto 70% e 10% mostraram sensibilidade intermediária ao itraconazol e ao fluconazol, respectivamente (Tabela 3). Nos indivíduos saudáveis, todas foram sensíveis ao cetoconazol. Dentre as *C. albicans* isoladas, 4% mostraram resistência ao itraconazol e 13% ao fluconazol. Uma única cepa resultou em perfil de sensibilidade intermediária ao fluconazol (4%). Para *Candida* “não-*albicans*”, a única cepa de *C.*

Tabela 3. Distribuição das cepas de *Candida* ‘não-*albicans*’ isoladas (n = 12) a partir da mucosa de indivíduos soropositivos para o HIV-1 segundo perfil de sensibilidade aos antifúngicos: cetoconazol, anfotericina B, itraconazol, fluconazol

Antifúngicos	Perfil de Sensibilidade (%)			Total
	Sensível	Intermediária	Resistente	
Cetoconazol	100	0	0	100
Itraconazol	50	50	0	100
Fluconazol	67	8	25	100
Anfotericina B	100	00	00	100

glabrata isolada (17%) foi resistente ao fluconazol e ao itraconazol. Todas as leveduras obtidas, a partir de ambos os grupos, foram sensíveis a anfotericina B.

Discussão

É inquestionável a importância da *Candida* sp. como um colonizador da mucosa gastrointestinal no grupo de indivíduos soropositivos para o HIV-1.⁽⁴⁾ Nossos resultados indicam que os hábitos relacionados à higiene bucal propiciam a colonização por *Candida* sp., independente do status sorológico para o HIV-1, corroborando os dados descritos na literatura.^(6,10) Ademais, a maior taxa de colonização, bem como as colonizações por mais de uma espécie, também foram favorecidas pelo uso de prótese dentária. De fato, a prótese dentária atua como um sítio adicional para colonização, com a conseqüente formação do biofilme, tanto bacteriano quanto fúngico, constituindo-se em importante fator de risco, já que, por um lado, dificulta a ação do sistema imunológico e, por outro, contribui para o insucesso da terapêutica antimicrobiana.^(5,11,12)

No grupo HIV/Aids, o aumento da carga viral contribuiu para a maior propensão a desenvolver candidíase de mucosa oral (qui-quadrado, $p < 0,05$), conforme já descrito por outros autores.^(3,1) Porém, é importante ressaltar que a infecção oral por *Candida* sp., tanto em pacientes soropositivos quanto em indivíduos saudáveis, depende também de outros fatores inerentes à levedura ou a esse sítio para o seu desenvolvimento, tais como: a produção de enzimas, adesão, dimorfismo, salivação, presença de próteses, produção de toxinas, colonização bacteriana e, principalmente, aqueles ligados à defesa do hospedeiro.^(5,13,11)

Inicialmente, as espécies denominadas em conjunto como “não-*albicans*” foram associadas com a candidíase orofaríngea em pacientes infectados pelo vírus HIV ou entre aqueles com causas outras de imunodepressão ou ainda entre indivi-

duos repetida e/ou prolongadamente expostos ao fluconazol.⁽¹⁴⁾ No entanto, no presente estudo, a frequência dessas leveduras em ambos os grupos foi similar, o que acompanha a tendência recente de isolamento das mesmas a partir de indivíduos saudáveis, usuários de próteses dentárias, portadores de neoplasias e de fibrose cística.^(15,3) Nossos dados, aliados aos demais, sugerem que essa levedura faz parte da microbiota oral normal, com distribuição ampla e independente do *status* imune na população geral.

As duas cepas de *C. dubliniensis* aqui identificadas foram isoladas a partir de dois pacientes do grupo HIV/Aids, sendo que: ambos eram usuários de prótese dentária, um deles havia sido submetido a terapêutica antifúngica e não recebia terapia anti-retroviral, enquanto o outro nunca fizera uso de antifúngicos, mas estava sob terapia anti-retroviral há dez anos. De fato, a presença do vírus HIV, somada ao uso de antifúngicos e/ou anti-retrovirais, em especial entre os usuários de prótese dentária, já foi referida como predisponente à colonização por *C. dubliniensis*.^(11,7)

Ficou evidenciado neste estudo que a dupla colonização da mucosa oral por cepas de *Candida* sp. ocorre mais em portadores do HIV/doentes de Aids do que em indivíduos saudáveis (qui-quadrado, $p = 0,05$), conforme previamente descrito.^(14,1)

Tradicionalmente, a inversão na proporção de *C. albicans* versus “não-*albicans*”, com o crescente aumento no isolamento das últimas, ocorre em pacientes soropositivos para o HIV e doentes com Aids.^(15,14,5) Contudo, neste estudo, a taxa de isolamento de espécies “não-*albicans*” em ambos os grupos não diferiu, confirmando pesquisas recentes que demonstram a substituição de *C. albicans* da flora comensal oral de indivíduos saudáveis por cepas de *Candida* “não-*albicans*”.^(3,10,16) As causas para tanto não estão totalmente esclarecidas, parecendo que a exposição social ao patógeno é um fator contribuinte para a disseminação de novas espécies de *Candida*.⁽³⁾

Quanto ao perfil de sensibilidade antifúngica, observa-se uma tendência das cepas obtidas a partir do grupo HIV/Aids em se tornarem resistentes aos antifúngicos azólicos testados. Este fato merece atenção, pois essas cepas podem alcançar a corrente sanguínea e culminar em candidemia disseminada refratária a tratamento, já que a maioria dos pacientes estava sob terapia com antibacterianos (58%) e pelo menos 20% deles possuía um ou mais dos demais fatores de risco para tal ocorrência (internação em UTI, uso de dispositivos invasivos, neutropenia).⁽¹⁴⁾ Já no

grupo controle, 13% das leveduras isoladas foram resistentes ao fluconazol, apesar de seus portadores não terem sido expostos previamente a esseazol. Alguns estudos relacionam achados atípicos como este ao uso de próteses dentárias, má higiene bucal, abuso de drogas antifúngicas e candidíases recorrentes, fatores também observados nos indivíduos desse grupo.^(11,10) Outra possível explicação para tal resultado reside na metodologia utilizada para determinação do perfil de sensibilidade aos antifúngicos, a disco difusão, uma limitação que reconhecemos. Por sua vez, das cepas de *Candida* “não-*albicans*” isoladas a partir da mucosa oral do grupo de pacientes, 50% demonstraram perfil de sensibilidade intermediária aos antifúngicos azólicos, enquanto 25% apresentaram resistência (Tabela 3). Já no grupo controle, das cepas de *Candida* “não-*albicans*” isoladas, apenas uma cepa (17%) foi resistente ao fluconazol e ao itraconazol, sendo que as demais foram sensíveis a todos os antifúngicos. Observa-se, portanto, que as cepas de *Candida* “não-*albicans*” isoladas da mucosa oral dos pacientes exibiram tendência superior ao desenvolvimento de resistência a drogas antifúngicas do que aquelas do grupo controle, conforme previamente descrito.^(5,4,7)

Os dados obtidos mostraram que o grupo HIV/Aids é mais colonizado por *Candida* sp. que os soronegativos para este vírus, sem mudança na proporção *C. albicans*/"não-*albicans*" ou no perfil de resistência aos azóis. Uma vez que o isolamento dos agentes leveduriformes do gênero *Candida* sp. tem fornecido resultados que mostram importante mudança qualitativa nas espécies que compõem a microbiota oral,⁽¹⁴⁾ a identificação da espécie constitui etapa importante. Nossos dados sugerem que a resistência em isolados orais de *Candida* sp. ao fluconazol na Região Noroeste paulista pode ser preocupante, uma vez que não está restrita aos portadores do HIV/doentes com Aids. Por fim, a prótese dentária deve ser considerada fator de risco para a colonização/infecção por *Candida* sp, independentemente do *status* imunológico do usuário.

Agradecimentos e financiamento

Os autores agradecem a todos os indivíduos que participaram do estudo e ao auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp (02/09546-1). T.D.C. é bolsista do PIBIC/CNPq – FAMERP e G.M.C.R é aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Referências

1. Samaranayake LP, Holmstrup P. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. *J Oral Pathol Med*. 1998;18:554-564.
2. Rossit AR, Almeida MT, Nogueira CA, Oliveira JGC, Barbosa DM, Moscardini AC et al. Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from Sao Paulo State, Southeastern Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;57:59-66.
3. Leigh JE, Shetty K, Fidel PL Jr. Oral opportunistic infections in HIV-positive individuals: review and role of mucosal immunity. *AIDS Patient Care STDS*. 2004;18:443-456.
4. Rozkiewicz D, Daniluk T, Sciepek M, Kurzqtkowska B, Oldak E, Zaremba ML. Prevalence of *Candida albicans* in stool of hospitalized children in 2003 with or without diarrhea from the Bialystok region. *Przegl Epidemiol*. 2005;59:43-51.
5. Holmes AR, Niimi M, Girgis JM, Boyd DH, Cannon RD. Antifungal drug susceptibilities of comensal *Candida* isolates. *NZ Dent J*. 2002;432:36-39.
6. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/Aids. Algumas informações sobre Aids, sífilis congênita e gestante HIV+ no Estado de São Paulo, 1980-2004. Disponível em <http://www.aids.gov.br>, 2006.
7. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yest Res*. 2004;4:369-376.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for both dilution antifungal susceptibility testing of yeast. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1997.
9. Tudela JLR, Roder L, Estrella MC, Córdoba S. Determinación de la Resistencia a los Antifúngicos en el Laboratorio. III Curso Hispano – Argentino de Micología Médica, 2002.
10. Nikawa H, Mikihiro S, Egusa H, Fukushima H, Kawabata R, Hamada T et al. *Candida* adherence and biofilm formation on oral surfaces Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2005;46:233-242.
11. Lyon JP, de Resende MA. Evaluation of adhesion to buccal epithelial cells in *Candida* species obtained from denture wearers after exposure to fluconazole. *Mycoses*. 2007;50:21-24.
12. Perezous LF, Stevenson GC, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL, Nichols CM. The effect of complete dentures with a metal palate on candida species growth in HIV infected patients. *J Prosthodont*. 2006;15:306-315.
13. Jones DS, McGovern JG, Adair CG, Woolfson AD, Gorman SP. Conditioning film and environmental effects on the adherence of *Candida* spp. to silicone and poly(vinylchloride) biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2001;12:399-405.
14. Basseti M, Trecarichi EM, Sanguinetti M, Bisio F, Postero B, Soro O et al. Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. Survey in 2 Italian university hospitals. *Diag. Microbiol Infect Dis*. In press, 2007.
15. Al-Karaawi ZM, Manfredi M, Waugh AC, McCullough MJ, Jorge J, Scully C et al. Molecular characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17:44-49.
16. Yildirim MS, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. *J Oral Rehabil*. 2005;32:518-525.
17. Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ et al. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol*. 1998;36:156-165.

Correspondência:

Dra. Andréa Regina Baptista Rossit

Centro de Investigação de Microrganismos, Departamento de Doenças Dermatológicas, Infeciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP
 Av. Brigadeiro Faria Lima, 5.416
 CEP 15090-000 - São José do Rio Preto, SP, Brasil.
 e-mail: andrea@famerp.br