

Tábata Salum Calille Atique

**Pesquisa das Espécies e Sensibilidade  
Antifúngica de *Candida* sp. em  
Indivíduos Soropositivos para o HIV**

São José do Rio Preto  
2006

Tábata Salum Calille Atique

**Pesquisa das Espécies e Sensibilidade  
Antifúngica de *Candida* sp. em Indivíduos  
Soropositivos para o HIV**

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

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Regina Baptista Rossit  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto  
2006

Atique, Tábata Salum Calille

Pesquisa das espécies e perfil de sensibilidade antifúngica de *Candida* sp. em indivíduos soropositivos para o HIV/Tábata Salum Calille Atique.

São José do Rio Preto, 2006

154p.; 33 cm

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.  
Área de Concentração: Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Regina Baptista Rossit

1. Candidíase; 2.Síndrome de Imunodeficiência Adquirida; 3.Sensibilidade antifúngica; 4. *Candida dubliniensis*.

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Agradecimentos. ....	vi
Epígrafe.....	x
Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas e quadros.....	xiii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xiv
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>001</b>
1.1. Candidíase orofaríngea .....	003
1.2. A candidíase orofaríngea em pacientes soropositivos para o HIV.....	006
1.3. Identificação das espécies de Candida.....	008
1.4. Resistência Antifúngica.....	012
1.5. Objetivo.....	018
1. 5.1. Objetivo Geral.....	018
1. 5. 2. Objetivos Específicos.....	018
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>019</b>
2.1. Casuística.....	020
2.1.1. Critérios de inclusão e exclusão.....	020
2.1.2. Aspectos éticos.....	021
2.2. Desenho do estudo.....	021
2.3. Coleta de amostras.....	022
2.4. Isolamento e identificação das leveduras.....	023
2.4.1. Isolamento das leveduras.....	023

2.4.2. Identificação das leveduras.....	023
2.4.2.1. Reisolamento e identificação presuntiva das espécies de <i>Candida</i> sp. ....	023
2.4.2.2. Prova do Tubo Germinativo.....	024
2.4.2.3. Prova do Microcultivo.....	024
2.4.2.4. Avaliação do Perfil Bioquímico.....	025
2.5. Triagem fenotípica de <i>C. dubliniensis</i> .....	026
2.5.1. Testes clássicos.....	026
2.5.2. Testes específicos.....	027
2.5.2.1. Teste de tolerância à temperatura de 42°C.....	027
2.5.2.2. Teste de tolerância à temperatura de 45°C.....	028
2.5.2.3. Formação de franjas de hifas em agar Niger.....	028
2.5.2.4. Formação de franjas de hifas em agar Girassol.....	028
2.5.2.5. Teste de tolerância ao agar Sabouraud hipertônico.....	029
2.5.2.6. Teste de opacificação em agar com Tween 80.....	029
2.6. Armazenamento das cepas.....	030
2.6.1. Formação da micoteca.....	030
2.6.2. Congelamento.....	030
2.7. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos.....	031
2.7.1. Método da difusão em disco.....	031
2.7.2. Microdiluição.....	032
2.8. Análises estatísticas.....	034
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>035</b>
3.1. População estudada .....	036
3.1.1. Pacientes.....	036

3.1.2. Grupo controle.....	047
3.1.3. Comparação entre os grupos estudados.....	048
3.2. Prevalência de <i>Candida</i> sp. ....	049
3.2.1. Pacientes.....	049
3.2.1.1. Portadores do HIV versus doentes com AIDS.....	054
3.2.1.2. Pacientes colonizados por <i>C. dubliniensis</i> .....	057
3.2.2. Grupo controle.....	060
3.2.3. Comparação entre colonização/infecção nos portadores do HIV e doentes com AIDS manifesta e grupo controle.....	061
3.3. Perfil de sensibilidade antifúngica dos isolados às seguintes drogas: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol.....	063
3.3.1. Difusão em Disco.....	063
3.3.1.1. Pacientes.....	065
3.3.1.2. Grupo controle.....	067
3.3.1.3. Comparação entre os perfis de sensibilidade antifúngica dos grupos estudados.....	067
3.3.2. Microdiluição.....	067
3.3.2.1. Pacientes.....	068
3.3.2.2. Grupo controle.....	069
3.3.3. Comparação entre os métodos de difusão em disco e Microdiluição.....	070
3.4. <i>Candida</i> sp. versus aspectos clínico-epidemiológicos.....	073
3.5. Avaliação da metodologia de triagem fenotípica de <i>Candida</i> <i>dubliniensis</i> .....	079
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>086</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>108</b>

<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>148</b>
Anexos 1. Prevalência de <i>C. dubliniensis</i> nos diversos trabalhos referidos na literatura.....	149
<b>8. APÊNDICES.....</b>	<b>150</b>
Apêndice 1. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	151
Apêndice 2. Ficha epidemiológica.....	152
Apêndice 3. Protocolo nº5386/2002 do Comitê de Ética da FAMERP.....	154

*Dedico*

*Ao grande amor da minha vida,*

*meu marido*

*Halim Atique Netto*

*Meu grande incentivador e um grande companheiro!*

*Meu porto seguro! Um espetáculo!!!!!!!!!!!!!!*

*Verdadeiramente, um presente de Deus em minha vida!!!*

*“As muitas águas não podem apagar este amor, nem os rios  
afogá-lo”. (Cantares 8:7)*



## *Agradeço*

*À Profa. Dra. Andréa Regina Baptista Rossit por toda a sua dedicação, doçura, carinho e por sua constante mostra de amizade, exercendo seu papel de ORIENTADORA com sabedoria e afeto, ajudando-me sempre na superação das dificuldades encontradas no decorrer da pesquisa.*

*Uma Grande Orientadora!!!*

*“Entrega teus caminhos nas mãos do Senhor, confia Nele,  
e o mais Ele fará!” (Salmos 37:5)*

*À Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida por ter confiado em  
minha capacidade e ter me apresentado à minha orientadora.*

*Meu muito abrigada!*

*Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado pelos relevantes conselhos e  
sugestões, os quais só vieram contribuir e somar ao meu trabalho.*

*Ao Prof. Dr. José Antonio Cordeiro pelo apoio e colaboração na execução  
dos testes estatísticos.*

*Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, do Laboratório de Pesquisas Micológicas  
(LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria, pelo apoio e ajuda na  
execução de testes de identificação fenotípica.*

*A todos os colegas do Centro de Investigação de Microorganismos que  
muito me ensinaram e pelas experiências que trocamos ao me acompanharem  
durante este período de busca de conhecimentos.*

*Aos colegas, alunos de iniciação científica, Marcela Suman e Bruno Bortot de Souza, que me acompanharam e me auxiliaram durante essa jornada, em especial pelo levantamento primoroso dos dados dos prontuários médicos.*

*Não teria conseguido sem vocês, muito obrigada!*

*À Reitoria, Vice Reitoria e Pró-Reitorias do Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP), pelo incentivo e por autorizarem minhas ausências quando necessárias para que esse trabalho pudesse ser realizado.*

*Ao Diretor do Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”, Prof. MSc. Halim Atique Netto, que por muitas vezes realizou minhas atividades profissionais, cobrindo minhas ausências e falhas para que eu pudesse terminar essa dissertação.*

*Meu grande professor de “Gestão Hospitalar”!*

*A todos os colegas do Hospital Veterinário, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, em especial à colega Érika, pelo apoio e ajuda nos momentos de necessidade.*

*À minha, “tia mais nova” Ariadne por ter me ajudado, com disposição e paciência, na revisão desse trabalho.*

*Aos meus queridos pais Abílio Calille Junior e Regina Celi Miguel Salum.*

*Vocês têm parte em todas as minhas conquistas!*

*O agradecimento maior a Deus por tudo o que sou!*

*Só o Senhor é digno de receber toda Glória, Honra e Louvor!*

*“Tudo posso naquele que me fortalece!”  
(Filipenses 4, 13)*

*“Há para todas as coisas, um tempo determinado por Deus!”  
(Eclesiastes 3,1)*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cavidade bucal com apresentação clínica clássica da candidíase pseudomembranosa aguda, típica em pacientes com AIDS.....	5
<b>Figura 2.</b> Cavidade bucal apresentando candidíase eritematosa.....	5
<b>Figura 3.</b> Distribuição dos pacientes soropositivos para HIV e doentes com AIDS de acordo com idade e sexo.....	37
<b>Figura 4.</b> Distribuição segundo o gênero dos indivíduos soropositivos para HIV e doentes de AIDS de acordo com a forma de contaminação pelo HIV.....	40
<b>Figura 5.</b> Classificação dos pacientes estudados nas diferentes categorias clínicas de acordo com o documento do CDC de 1993.....	41
<b>Figura 6.</b> Distribuição dos pacientes soropositivos para HIV e doentes com AIDS de acordo com a contagem de células TCD4 <sup>+</sup> .....	41
<b>Figura 7.</b> Distribuição dos pacientes soropositivos para HIV e doentes com AIDS de acordo com a contagem de cópias do HIV-1.....	43
<b>Figura 8.</b> Distribuição do número de pacientes portadores do HIV e doentes com AIDS de acordo com a manifestação de candidíase orofaríngea (CO) ou candidíase esofágica (CE).....	43
<b>Figura 9.</b> Comorbidades apresentadas pelos portadores de HIV e doentes com AIDS, nos últimos 12 meses anteriores à inclusão neste estudo.....	44
<b>Figura 10.</b> Distribuição dos pacientes soropositivos para o HIV e doentes com AIDS de acordo com o uso e tipo de terapia antiretroviral.....	46
<b>Figura 11.</b> Número de cepas das diferentes espécies de <i>Candida</i> sp. isoladas da cavidade oral de 87 pacientes soropositivos para o HIV e doentes com AIDS.....	53
<b>Figura 12.</b> Cultura em CHROMagar <i>Candida</i> <sup>®</sup> evidenciando a coloração das colônias de <i>C. glabrata</i> (A - roxas) e de <i>Candida albicans</i> (B - verdes).....	55
<b>Figura 13.</b> Número de portadores do HIV e doentes com AIDS que tiveram mucosa oral colonizadas/infectadas pelas diferentes espécies de <i>Candida</i> sp. isoladas.....	56

---

<b>Figura 15.</b> Perfil de sensibilidade das cepas de <i>C. albicans</i> (CA), <i>C. tropicalis</i> (CT), <i>C. glabrata</i> (CG) e <i>C. dubliniensis</i> (CD) frente aos antifúngicos fluconazol (A), itraconazol (B), cetoconazol (C) e anfotericina B (D).....	66
<b>Figura 16.</b> Perfil de sensibilidade antifúngica das cepas avaliadas por disco difusão (DD) e por microdiluição (MD).....	72
<b>Figura 17.</b> Aspecto microscópico da cultura em agar Niger de <i>Candida dubliniensis</i> (A) evidenciando bordas rugosas e <i>Candida albicans</i> (B), evidenciando bordas lisas (100X).....	80
<b>Figura 18.</b> Aspecto micromorfológico de <i>Candida dubliniensis</i> (A) e de <i>Candida albicans</i> (B) em agar fubá com Tween 80 (microcultivo) evidenciando clamidósporos em “triplets” (seta vermelha) e clamidósporos únicos (setas pretas).....	81
<b>Figura 19.</b> Placa de Petri com meio CHROMagar Candida® evidenciando a coloração das colônias de <i>C. dubliniensis</i> (A – verdes escuras) e de <i>Candida albicans</i> (B – verdes mais claras).....	82
<b>Figura 20.</b> Cultura de <i>Candida dubliniensis</i> e de <i>Candida albicans</i> em placa de Petri com agar com Tween 80, mostrando halo de opacidade (seta).....	83

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Critérios de susceptibilidade aos antifúngicos testados.....	32
<b>Quadro 2.</b> Critérios de susceptibilidade ao fluconazol.....	33
<b>Quadro 3.</b> Resultados dos testes efetuados para triagem fenotípica de <i>C. dubliniensis</i> nos portadores do HIV/doentes com AIDS.....	50
<b>Quadro 4.</b> Variáveis demográficas e clínico-epidemiológicas dos três pacientes colonizados por <i>C. dubliniensis</i> .....	58
<b>Quadro 5.</b> Resultados dos testes efetuados para triagem fenotípica de <i>C. dubliniensis</i> nas cepas isoladas no grupo controle.....	62
<b>Quadro 6.</b> Resultados dos testes Disco Difusão (DD) e de Microdiluição (MD) das amostras de <i>C. albicans</i> e de <i>C. dubliniensis</i> .....	71
<b>Tabela 1.</b> Suscetibilidade de <i>C. albicans</i> e <i>Candida dubliniensis</i> a ação do fluconazol, expressa por meio da CIM.....	69
<b>Tabela 2.</b> Porcentagem de sensibilidade, especificidade, eficácia e valor p do método de disco difusão.....	72
<b>Tabela 3.</b> Número de cepas das diferentes espécies de <i>Candida</i> sp. isoladas a partir da cavidade oral dos pacientes soropositivos para o HIV de acordo com o uso prévio de terapia antiretroviral, antifúngica e antibacteriana.....	76
<b>Tabela 4.</b> Distribuição das diferentes espécies de <i>Candida</i> sp. e perfil de sensibilidade aos antifúngicos, de acordo com a história medicamentosa pregressa.....	78
<b>Tabela 5.</b> Porcentagem de sensibilidade, especificidade, eficácia e valores de p para os pares discordantes dos métodos de triagem fenotípicas para <i>C. dubliniensis</i> em comparação com o teste de formação de franjas de hifas em agar Niger.....	85



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
>	Maior do que
<	Menor do que
≤	Maior do que ou igual a
≥	Menor do que ou igual a
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
=	Igual a
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CDC	“Center for Disease Control”
CE	Candidíase esofágica
Cim	Centro de Investigação de Microorganismos
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM <sub>50</sub>	Concentração Inibitória Mínima para 50% das cepas
CIM <sub>90</sub>	Concentração Inibitória Mínima para 90% das cepas
CO	Candidíase orofaríngea
DIP	Departamento de Doenças Infectoparasitárias
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - SP
HAART	Terapia antiretroviral de alta potência
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IP	Inibidor de proteases
LAPEMI	Laboratório de Pesquisas Micológicas
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NCCLS	“National Committee for Clinical Laboratory Standards”
PCR	Reação de polimerização em cadeia
RAPD	Amplificação randômica do DNA
SAP	Aspartil proteinase
sp.	Espécie
UNIRP	Centro Universitário de Rio Preto – SP

---

## RESUMO

**Introdução:** A candidíase orofaríngea é a infecção mais comum entre os indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o agente etiológico mais freqüentemente isolado é *Candida albicans*. Entretanto, outras espécies têm tido significativo aumento, algumas dessas apresentando suscetibilidade diferencial ou total insensibilidade aos antifúngicos, em especial ao fluconazol. **Objetivo:** Determinar a prevalência de *Candida* sp. na mucosa orofaríngea de uma população soropositiva para o HIV/portadora da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e de um grupo controle com ênfase na pesquisa de *C. dubliniensis*, além da pesquisa dos perfis de sensibilidade antifúngica das cepas isoladas. **Métodos:** A coleta de material da cavidade oral foi realizada com swab estéril com posterior semeadura em meio Agar Sabouraud Dextrose<sup>®</sup> e BBL Mycosel Agar<sup>®</sup>. As colônias com aspecto compatível ao de *Candida* foram ressemeadas em meio cromatogênico CHROMagar *Candida*<sup>®</sup>. Em seguida, as colônias de cores e/ou tonalidades distintas foram submetidas aos seguintes testes de identificação: microcultivo, prova do tubo germinativo e análise do perfil bioquímico. As colônias verdes foram submetidas a testes específicos para triagem fenotípica de *C. dubliniensis*: tolerância à temperatura de 42°C a 45°C e ao agar Sabouraud hipertônico, formação de franjas de hifas em agar Niger e Girassol, opacificação em agar com Tween 80 e assimilação de D-xylose e  $\alpha$ -D-glucopiranoside. Por fim, o perfil de sensibilidade antifúngica foi avaliado por difusão em disco e por microdiluição. **Resultados:** Nos pacientes a prevalência

de colonização/infecção foi de 87%, sendo isoladas 107 cepas. Dessas 76 cepas foram identificadas como *C. albicans*, enquanto que 31 como não-*albicans* sendo: 18 como *C. tropicalis*, 10 como *C. glabrata* e três como *C. dubliniensis*. A partir do material obtido da mucosa orofaríngea de 20 pacientes, foi possível o isolamento de mais de uma espécie de *Candida* sp, caracterizando a presença de colonização/infecção mista. Já a partir dos indivíduos do grupo controle, a prevalência foi significativamente menor (9%) e a totalidade das cepas isoladas foi identificada como *Candida albicans*. As cepas isoladas a partir dos pacientes foram significativamente mais resistentes ao fluconazol ( $p= 0,0039$ ) que aquelas isoladas a partir da cavidade orofaríngea dos controles. **Conclusões:** A prevalência de *Candida* sp., tanto de *C. albicans* quanto de “não-*albicans*” nos pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS é elevada sendo que a de *C. dubliniensis* é similar àquela encontrada em outras regiões do Brasil. *C. albicans* é a única espécie isolada da mucosa orofaríngea de indivíduos saudáveis. Cepas isoladas da mucosa oral dos pacientes são mais resistentes aos antifúngicos que aquelas isoladas no mesmo sítio anatômico no grupo controle. Finalmente, espécies “não *albicans*” são mais resistentes aos azóis e à anfotericina B que os isolados de *C. albicans*.

## ABSTRACT

**Introduction:** Oropharyngeal candidiasis is the commonest infection among HIV-infected individuals and the most frequently isolated agent is *Candida albicans*. However, other species have had significant increase, some of these presenting distinguishing susceptibility or total unresponsive to the antifungal drugs, in special to fluconazole. **Objective:** To determine the prevalence of *Candida* sp. in the oropharyngeal cavity of a HIV-infected/AIDS population and of its control group, with emphasis in *C. dubliniensis* study. Furthermore, our objective was to assess the antifungal susceptibility profiles of the isolated strains. **Methods:** The sample collection was realized through a sterile swab and posterior isolation on agar Sabouraud Dextrose<sup>®</sup> and BBL Mycosel Agar<sup>®</sup>. Colonies which resembled *Candida* were replaced in CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> media. Afterwards, accordingly to their colours and/or tonalities the distinct colonies were submitted to the following identification tests: chlamyospore production on corn meal agar with Tween 80; germinative tube formation and biochemical profile analysis. The green colonies were also submitted to specific tests for phenotypic selection of *C. dubliniensis*: tolerance to 42 and 45 degrees temperature to C and 6,5% hypertonic agar, chlamyospore formation on Sunflower Seed agar and Niger agar, by the formation of an opacity halo in agar with Tween 80 and D-xylose and alpha D-glucopiranoside assimilation. Finally, the antifungal susceptibility profiles were evaluated by disk diffusion and microdilution. **Results:** In patients, the prevalence of colonization/infection was of 87%, being a total of 107 strains there isolation. From these, seventy-six were identified as *C. albicans*, whereas non-albicans: 18 as *C. tropicalis*, 10 as

*C. glabrata* and three of them as *C. dubliniensis*. In addition, from the obtained material through the oropharyngeal cavity of 20 patients, was possible the isolation of more than one species of *Candida* sp., characterizing mixed colonization and/or infection. On the other hand, from the individuals of the control group, this prevalence was much smaller (9%) and the totality of the isolated strains was typed as *C. albicans*. The isolated strains from the patients were significantly more resistant to fluconazole ( $p= 0,0039$ ) than those isolated from the oropharyngeal cavity of the controls. **Conclusions:** The prevalence of *Candida* sp., considering *C. albicans* and non-*albicans* in the HIV serumpositive/AIDS patients is high. *C. dubliniensis* prevalence is similar to that one those reported in other regions of Brazil. *C. albicans* was the only isolated species of the oropharyngeal cavity of the control group individuals. The isolated strains from patients oral cavity's are more resistant to antifungal drugs than those isolated in the same anatomical site in the control group. Finally, non-*albicans* species are more resistant to the azoles and amphotericin B than *C. albicans*.

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1) INTRODUÇÃO

No Brasil, desde a identificação do primeiro caso de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), no ano de 1980, até junho de 2005, foram notificados 371 mil casos da doença. Até a década de 90, as taxas de incidência foram crescentes chegando a alcançar cerca de 20 casos novos de AIDS por 100 mil habitantes. Ainda nesse período, mais de 80% dos casos estava concentrado nas regiões Sul e Sudeste. Contudo, apesar da alta taxa de incidência, o Sudeste é a única região que mostra uma tendência consistente de declínio, ainda que lento, desde 1998. <sup>(1)</sup>

Interessantemente, numerosos trabalhos têm descrito um significativo aumento na incidência e diagnóstico de candidíase, tanto superficial quanto sistêmica, na última década. <sup>(2, 3, 4, 5)</sup> As razões para este fato são muitas, mas a mais importante é o crescente número de pacientes imunocomprometidos, particularmente aqueles infectados pelo HIV, como também o aumento da sobrevivência dos mesmos. <sup>(6, 7, 8)</sup>

A sobrevivência mediana dos pacientes com AIDS no Brasil, na década de 80, era de apenas 5,1 meses. Isto significa dizer que, nesse período, cerca de 50% dos pacientes evoluíam a óbito em menos de seis meses após o diagnóstico da primeira infecção oportunista. <sup>(9)</sup> No entanto, a partir da introdução da terapia antiretroviral de alta potência (HAART), com distribuição universal e gratuita pelo Ministério da Saúde, houve importante queda nas taxas de mortalidade. <sup>(1, 10)</sup> Deste modo, no ano de 1996, o tempo de sobrevivência média era de 56 meses. <sup>(9)</sup> Contudo, o aumento na expectativa de vida elevou

o número de comorbidades, inclusive àquelas causadas por agentes oportunistas, bem como a incidência de recidivas das mesmas.<sup>(11)</sup>

### 1.3) Candidíase orofaríngea

Na microbiota fúngica da cavidade oral, há predomínio do gênero *Candida* sobre as demais leveduras.<sup>(12, 13, 14)</sup> Entretanto, a prevalência de colonização da cavidade oral por essa levedura em indivíduos saudáveis é muito variável sendo que índices de 5 a 60%, com média em torno de 40%, têm sido relatados<sup>(15, 16, 17, 18, 19, 20)</sup> A colonização por leveduras é mais intensa na língua, seguida pelo palato e mucosa jugal.<sup>(20, 21)</sup>

Caso haja desequilíbrio local ou ainda disfunção hormonal ou do sistema imune, a *Candida* sp. assume papel de fungo oportunista e o indivíduo passa do estado de portador ao de doente.<sup>(12, 13, 17)</sup> Nessas condições, essa levedura invade os tecidos causando quadros clínicos que variam desde processos infecciosos superficiais até infecções profundas envolvendo vísceras.<sup>(22)</sup>

Segundo Odds (1988),<sup>(23)</sup> condições tais como as infecções, as disfunções endócrinas, as imunodeficiências, as neoplasias, os extremos etários, a gestação, as dietas ricas em carboidratos e hipovitamínicas, o uso de próteses dentárias, a administração de contraceptivos, os corticosteróides, os antibióticos e os agentes imunossupressores seriam os principais fatores que predispõem à candidíase orofaríngea. Alguns autores admitem que a candidíase orofaríngea, a princípio, não coloca em risco a vida do doente, apesar de estar associada com a sensação de desconforto oral que pode



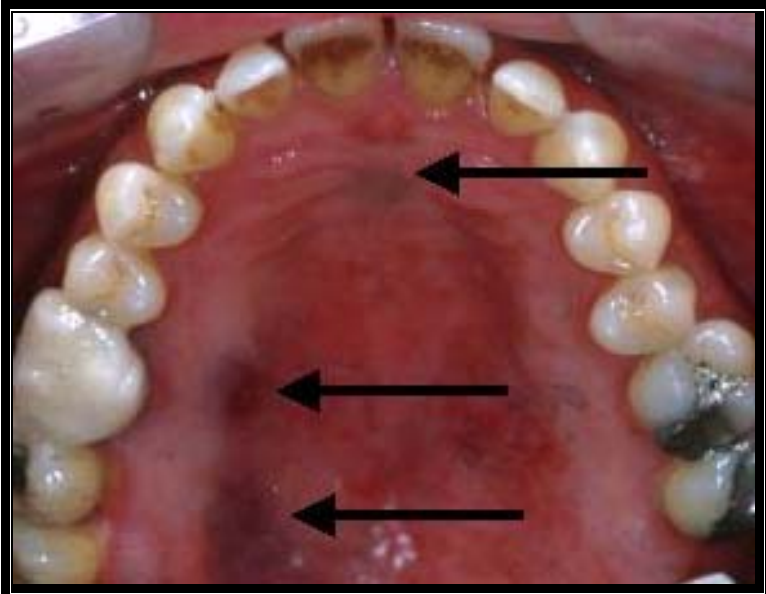
reduzir a ingestão de alimentos, contribuindo para a perda de peso do paciente.

(17, 24)

A candidíase orofaríngea, também chamada candidose, descrita por Hipócrates no século V a.C., compreende quadros de candidíase aguda, com suas formas pseudomembranosa e eritematosa, além da candidíase crônica, subdividida em formas atrófica, hiperplásica e candidíase mucocutânea.<sup>(25)</sup> A candidíase pseudomembranosa aguda constitui a apresentação clínica clássica, típica em pacientes com AIDS, e caracteriza-se pela presença de placas esbranquiçadas e cremosas, localizadas em qualquer parte da superfície da mucosa oral. Essas lesões, ao serem removidas, revelam área eritematosa e sangrante (**Figura 1**). O segundo tipo mais comum é a candidíase eritematosa aguda, em que são observadas áreas avermelhadas, em geral localizadas no palato e dorso da língua, onde são encontradas porções depapiladas associadas à dor e a queimação (**Figura 2**). A forma atrófica crônica apresenta-se como mucosite eritematosa, algumas vezes assintomática, acometendo principalmente indivíduos portadores de prótese dentária. A quelite angular associa-se freqüentemente a essa forma clínica e caracteriza-se pela ocorrência de eritema e fissuras ou úlceras lineares nas comissuras labiais. A variante hiperplásica crônica está relacionada com o tabagismo e não raro acompanha-se de atipia epitelial ou degeneração maligna do tecido. Todas as infecções descritas são pobremente responsivas ao tratamento tópico, entretanto respondem ao tratamento sistêmico. (17, 25, 26, 27, 28)



**Figura 1.** Cavidade bucal mostrando a apresentação clínica clássica da candidíase pseudomembranosa aguda, típica em pacientes com AIDS.



**Figura 2.** Cavidade bucal apresentando candidíase eritematosa.

Na maioria de suas manifestações, a candidíase orofaríngea provoca dor, salivação, disfagia e sangramento e, em casos mais graves, pode produzir esofagite e dores retroesternais intensas. <sup>(29, 30, 31)</sup> As conseqüências da mucosite característica da candidíase orofaríngea incluem ainda a desidratação e a perda de peso secundários, além de má digestão, podendo acarretar desnutrição. <sup>(29)</sup>

## **1.2. Candidíase orofaríngea em pacientes soropositivos para o HIV**

A candidíase orofaríngea é a infecção mais comum entre os indivíduos infectados pelo HIV, sendo que antes mesmo do aparecimento dos sintomas dessa afecção ocorre intensa colonização por *Candida*, decorrente do imunocomprometimento desses pacientes. <sup>(36)</sup>

Cerca de 90% dos portadores do HIV/ doentes de AIDS apresentam candidíase orofaríngea pelo menos uma vez durante o curso da doença. <sup>(11)</sup> A ocorrência desta infecção entre os mesmos é uma das manifestações preditivas de atividade retroviral, independentemente do número de células TCD4<sup>+</sup> no momento do diagnóstico da lesão dermatológica. <sup>(30)</sup> Entretanto, essa manifestação é mais comum em pacientes com níveis de TCD4<sup>+</sup> menores que 200 células/mm <sup>(3)</sup>, tendo sido verificada em taxas de aproximadamente 60% nesses pacientes. <sup>(37)</sup>

Considerando o exposto no ítem anterior a candidíase orofaríngea torna-se preocupante já que a desnutrição é uma das primeiras complicações observadas nos portadores do HIV e representa fator determinante para a sobrevivência. <sup>(29, 32, 33, 34)</sup> Além disso, a desnutrição e

suas complicações podem tornar o indivíduo soropositivo mais suscetível a infecções oportunistas e reduzir a eficácia dos medicamentos. <sup>(35)</sup>

Os medicamentos antiretrovirais da classe dos inibidores da protease (IPs) do HIV tornaram-se disponíveis em 1996, mudando a partir de então a história natural da AIDS, com redução da mortalidade, do número de hospitalizações e da frequência de infecções oportunistas. <sup>(39, 40, 41)</sup> Desse modo, pode ser observada uma redução da incidência de infecções oportunistas em torno de 40% e da mortalidade, da ordem de 60%. <sup>(42, 43)</sup>

Desde a introdução dos IPs, as infecções fúngicas, incluindo a candidíase orofaríngea, também se tornaram menos frequentes nos portadores do HIV/pacientes com AIDS. Essa proteção parece estar correlacionada com a elevação das células TCD4<sup>+</sup> e a melhora da função imune. <sup>(11)</sup> Desse modo, nos portadores do HIV/pacientes com AIDS sob HAART há redução da incidência da candidíase orofaríngea, precocemente, antes mesmo da recuperação do número de células TCD4<sup>+</sup>. <sup>(44)</sup>

Devido à facilidade de identificação das lesões orais, a candidíase orofaríngea serve como marcador da progressão da doença de base e pode refletir a evolução da infecção viral. Assim, a avaliação da mucosa oral é importante ferramenta para inferência do estado imune e da replicação viral. A presença dessas lesões em pacientes sob HAART sugere falência do esquema terapêutico, recurso este bastante útil em países onde a determinação da carga viral não é rotina ou é pouco disponível. <sup>(38, 44, 45)</sup>

Além disto, já se sabe que a presença de microbiota potencialmente patogênica na cavidade bucal, associada com a imunodepressão e a

mecanismos que estimulam a virulência da *Candida* sp., explicam a precocidade da candidíase orofaríngea na história natural dos pacientes com AIDS.<sup>(46)</sup> Neste sentido, alguns estudos têm sido conduzidos com o objetivo de documentar as características de virulência de *C. albicans* nesses pacientes.<sup>(47)</sup>

### 1.3) Identificação das espécies de *Candida*

As infecções causadas por *Candida* são reconhecidas desde o século V a.C. No entanto, as primeiras observações microscópicas do agente causador só ocorreram em 1839.<sup>(3)</sup>

O gênero *Candida* sp. compreende aproximadamente 200 espécies, sendo que aproximadamente 15 são de interesse médico.<sup>(28)</sup> O agente etiológico isolado em maior frequência nos casos de candidíase orofaríngea é a *Candida albicans*, entretanto outras espécies denominadas em conjunto como “não-*albicans*”, tais como *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis*, têm tido significativo aumento.<sup>(2, 32, 48)</sup>

As espécies de *Candida* sp. podem ser diferenciadas através de suas características morfológicas e bioquímicas, à exceção de *C. dubliniensis* já que a mesma apresenta similaridade fenotípica à *C. albicans*.<sup>(49)</sup> Tais semelhanças fizeram com que muitos casos de candidíase orofaríngea por *C. albicans* fossem posteriormente reclassificados por métodos fenotípicos específicos e moleculares.<sup>(8, 50, 51, 52, 53)</sup>

*C. dubliniensis* é uma espécie “não-*albicans*” que foi primeiramente descrita na cavidade oral de indivíduos portadores de HIV e de doentes com AIDS, especialmente naqueles com candidíase de repetição. <sup>(49)</sup> Contudo, pouco se sabe sobre o papel epidemiológico e o significado clínico dessa levedura, visto que ela foi erroneamente identificada, até o final do século passado, como *C. albicans* <sup>(50, 51, 52, 53)</sup>. Apesar dessa nova espécie ter sido isolada pela primeira vez em Dublin (Irlanda), razão essa de sua denominação <sup>(49)</sup>, foi demonstrado que sua distribuição geográfica é ampla e que, provavelmente, esta espécie é constituinte da microbiota oral normal, com grande potencial para causar candidíase orofaríngea. <sup>(52)</sup>

A pesquisa da *C. dubliniensis* é importante uma vez que a mesma parece desempenhar papel relevante como agente etiológico da candidíase orofaríngea recorrente em pacientes com AIDS e, ainda, revela rápido desenvolvimento de resistência ao fluconazol. <sup>(2, 55)</sup> Além disso, essa espécie também apresenta propriedades adesivas que podem facilitar a colonização e infecção do tecido, além de promover a formação do biofilme. <sup>(56, 57)</sup> Por estas razões, a identificação inequívoca da mesma é importante para que a terapia antifúngica adequada possa ser iniciada. <sup>(7)</sup> Deste modo, diversos autores buscaram a padronização de métodos de fácil execução e baixo custo para diferenciação dessas leveduras. <sup>(49, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64)</sup>

O CHROMagar Candida<sup>®</sup> é um meio cromatogênico que permite a identificação presuntiva não só de *C. albicans* como também de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. <sup>(59, 60, 63, 65)</sup> Apresenta substrato cromatogênico que é metabolizado por diferentes enzimas de *Candida* sp.,

como a  $\beta$ -glucosaminidase, o que permite a formação de colônias em tonalidades distintas: verdes para *C. albicans*, azuis para *C. tropicalis* e rosadas para *C. krusei*.<sup>(66, 67, 68, 69)</sup> Recentemente, este meio foi aprimorado a fim de permitir a diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*<sup>(70)</sup>. Desse modo, após 48h de incubação à 37°C, é possível observar colônias azuis-esverdeadas claras, características de *C. albicans* e, em contraste, colônias verde-escuras, sugestivas de *C. dubliniensis*.<sup>(7, 23, 52, 53)</sup> Assim como *C. albicans*, *C. dubliniensis* também forma tubo germinativo quando em contato com soro humano à 37°C.<sup>(2, 49, 58)</sup> Características fenotípicas similares também podem ser observadas através da prova do microcultivo, onde ambas produzem clamidósporos. No entanto, enquanto *C. albicans* forma clamidósporos únicos e terminais, *C. dubliniensis* pode formá-los em pares, “triplets” ou mesmo cachos.<sup>(2, 71)</sup>

Outras diferenças fenotípicas entre as espécies do gênero *Candida* sp. podem ser determinadas pelo padrão de assimilação de carboidratos. O referido teste é baseado fundamentalmente em provas de assimilação de carboidratos e nitrogênio e na prova de fermentação de carboidratos.<sup>(71)</sup>

Com as provas de assimilação de carboidratos e de fermentação bioquímica podemos observar que diferentemente da *C. albicans*, *C. dubliniensis* não assimila a D-xilose, a  $\alpha$ -metil-D-glucopiranosido e o DL – lactato e pode ou não assimilar a trealose.<sup>(49, 71)</sup>

Os perfis de assimilação e de fermentação bioquímicas podem ser também ser determinados por sistemas comerciais de identificação como o API ID 32 AUX e o API 20 C AUX (Bio Meriéux).<sup>(19, 72, 73, 74, 75)</sup> Entretanto,

recentemente, Alves e colaboradores <sup>(74)</sup> relataram que uma porcentagem significativa de isolados de *C. dubliniensis* (32%) apresentou perfil duvidoso quando submetida ao API ID 32 AUX, muito embora o “software” do referido sistema tenha sugerido 83,6% de chance das mesmas pertencerem a essa espécie. Desse modo, os autores sugerem que devido à variabilidade fenotípica de *C. dubliniensis*, a identificação obtida através desse kit comercial deve ser considerada presuntiva. <sup>(74)</sup>

Além disso, após a estocagem ou repique, alguns caracteres fenotípicos podem ter sua expressão alterada, levando a resultados ambíguos e/ou difíceis de reproduzir. <sup>(49)</sup> Considerando-se que a morfotipificação e a biotipificação nem sempre são capazes de determinar a etiologia das infecções causadas por *C. dubliniensis*, <sup>(73)</sup> apenas os métodos genotípicos permitem a sua identificação inequívoca. As técnicas mais utilizadas são a reação em cadeia de polimerase (PCR) e a amplificação randômica do DNA (RAPD). <sup>(49, 76, 77)</sup> Entretanto, os métodos moleculares estão restritos aos laboratórios de pesquisa e, frequentemente, não são adotados em rotina laboratorial devido ao seu custo elevado. <sup>(76, 77, 78)</sup> Em função de tais limitações, os métodos fenotípicos estão sendo aperfeiçoados para permitir sua utilização como estratégia de triagem. <sup>(2, 71)</sup>

Nessa direção, outras diferenças fenotípicas entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* foram demonstradas em diferentes trabalhos e incluem: a ocorrência ou não de fluorescência sob lâmpada de Wood, <sup>(79)</sup> a incapacidade de *C. dubliniensis* crescer em meio Sabouraud hipertônico <sup>(64)</sup>, a produção pela mesma de “franjas de hifas” em Agar Girassol <sup>(58)</sup> e em Agar Niger, <sup>(62)</sup> além de



sua incapacidade em desenvolver halo de opacidade em Agar com Tween 80.  
(80)

No Brasil, Alves e colaboradores (2001),<sup>(81)</sup> isolaram *C. dubliniensis* na cidade de São Paulo e no estado do Rio Grande do Sul em dois pacientes com AIDS, sendo um adulto e uma criança e em três pacientes, respectivamente. Em um estudo multicêntrico, Milan e colaboradores<sup>(19)</sup> isolaram três cepas de *C. dubliniensis* em candidíase orofaríngea nas cidades de São Paulo e Natal. Destas, três foram isoladas em pacientes portadores de HIV e o índice obtido foi considerado baixo comparado com populações de indivíduos infectados pelo HIV em outros países. Confirmando o estudo anterior, em um levantamento retrospectivo, Mariano e colaboradores<sup>(54)</sup> analisaram 548 culturas previamente identificadas como *C. albicans* e determinaram que 2% destas foram erroneamente identificadas.

#### 1.4. Resistência Antifúngica

Os freqüentes relatos da incidência de espécies de *Candida* “não-*albicans*”<sup>(2, 50, 51, 82, 83, 84)</sup> têm sido relacionados à quimioprofilaxia e ao tratamento com as drogas antifúngicas, em especial o fluconazol.<sup>(2, 86)</sup>

De fato, a eficácia deste medicamento no tratamento da candidíase orofaríngea, assim como sua baixa toxicidade, larga janela terapêutica e grande espectro de ação tornaram-no o antifúngico de eleição nessa infecção.<sup>(87, 88)</sup> Infelizmente, os azóis são em geral fungistáticos e a resistência ao fluconazol emerge em diversos fungos patogênicos.<sup>(89)</sup>

Apesar disso, a erradicação completa dessa infecção não é fácil já que a ocorrência de recidivas, alguns meses após a conclusão do tratamento, é comum.<sup>(26)</sup> Nessas situações verifica-se progressiva redução da sensibilidade ao fluconazol ou a substituição de uma cepa sensível por uma outra resistente ou, ainda, a substituição de *C. albicans* por espécies “não-albicans”<sup>(4, 5, 25, 90, 91)</sup> Ademais, algumas espécies de *Candida* apresentam suscetibilidade diferencial ou total insensibilidade a essa droga, o que torna a identificação da espécie passo crucial para prescrição da terapêutica antifúngica adequada.<sup>(92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103)</sup>

O primeiro relato de resistência aos azóis em doentes com AIDS foi relacionado ao cetoconazol.<sup>(104)</sup> No entanto, com a introdução do fluconazol no mercado associado à sua larga utilização nesses pacientes, a maioria das publicações se relaciona à resistência a esse antifúngico.<sup>(105, 106, 107)</sup> De fato, relatos de caso de candidíase orofaríngea não responsiva ao fluconazol começaram a aparecer em 1991, após o uso deste antifúngico em esquemas terapêuticos ou profiláticos nos pacientes com AIDS.<sup>(87)</sup>

Conforme referido anteriormente algumas espécies de *Candida* sp. apresentam resistência intrínseca aos azóis, em especial ao fluconazol, notadamente: *C. glabrata* e *C. krusei*. Entretanto, leveduras desse gênero, após exposição aos antifúngicos, são capazes de manifestar resistência através de mecanismos moleculares como alteração da expressão das bombas de efluxo da droga bem como alteração da biossíntese do ergosterol.<sup>(32, 108)</sup>

Diferentes situações de colonização/infecção por *Candida* sp. culminam na formação do biofilme em dispositivos implantáveis tais como

cateteres intravenosos, válvulas cardíacas e próteses dentárias. <sup>(56, 57, 109, 110)</sup>

Esses consistem em microcolônias contendo leveduras associadas, arranjadas em uma estrutura única. Esses biofilmes são resistentes a uma gama de agentes antifúngicos de uso clínico atual, incluindo a anfotericina B e o fluconazol. <sup>(56)</sup> As conseqüências da formação do biofilme são o aumento da resistência aos antifúngicos e proteção contra as defesas imunológicas do paciente. <sup>(57, 109, 110)</sup>

O uso crescente dos azóis em pacientes imunocomprometidos tem como conseqüência um grande impacto na freqüência, morbidade e resposta terapêutica das infecções fúngicas, tanto nosocomial quanto comunitária. <sup>(46)</sup> Tendo em vista a já reconhecida manifestação de resistência no gênero *Candida* sp. após exposição prolongada ou repetida a antifúngicos, estratégias de tratamento devem ser propostas baseadas no fato de que a terapêutica da candidíase pode ser orientada por testes *in vitro*. <sup>(32)</sup> Por sua vez, o aumento da magnitude da resistência e o advento de novas drogas antifúngicas, tais como os novos azóis e as equinocandinas, têm gerado um interesse renovado no aperfeiçoamento de testes para determinação da suscetibilidade fúngica. <sup>(32, 89, 111)</sup>

Uma das situações em que os dados obtidos através dos testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* melhor se correlacionam com a resposta terapêutica *in vivo* é a candidíase orofaríngea no paciente soropositivo para o HIV. <sup>(46)</sup> Há quase vinte anos a busca de novos métodos para testar o perfil de sensibilidade antifúngica tem sido o foco de pesquisas. <sup>(112)</sup> Alguns métodos já

foram propostos e entre os mais difundidos estão o antifungigrama por disco difusão, o E-test e a microdiluição em caldo. <sup>(113, 114, 115, 116, 117, 118, 119)</sup>

O antifungigrama por disco difusão, adaptado do antibiograma clássico, é um método simples, rápido e de baixo custo, ideal para levantamento em larga escala do padrão de distribuição de suscetibilidade antifúngica, em especial ao fluconazol. <sup>(121, 122)</sup> Entretanto, tal recurso não está completamente padronizado e seus resultados não podem ser utilizados como guia para seleção e monitoramento da terapêutica antifúngica. <sup>(123)</sup>

Já o E-test (AB Biodisk, Sweden) representa um avanço na técnica de difusão para teste de sensibilidade antifúngica já que, em fita, as diferentes drogas estão disponíveis em concentração crescente, permitindo também o rápido estabelecimento da concentração inibitória mínima. Suas desvantagens referem-se, principalmente, ao alto custo das fitas o que impede sua aplicação em rotina laboratorial já que a literatura mostra boa correlação de seus resultados com a metodologia “gold standard”, que é a microdiluição. <sup>(71, 118, 124)</sup>

Por sua vez, a microdiluição em caldo, desenvolvida pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS) é o protocolo de referência (M-27 2A) para teste de sensibilidade antifúngica de leveduras. <sup>(113, 114)</sup> Contudo, exige pessoal treinado e aparelhos específicos além de sua padronização e execução serem laboriosas. Assim, esses testes nem sempre fazem parte da rotina laboratorial sendo o tratamento empírico aplicado já que, em adição, os mesmos raramente são solicitados antes do início da terapia antifúngica. <sup>(32)</sup>

Em se tratando do gênero *Candida* sp., o perfil de sensibilidade aos diferentes antifúngicos varia segundo a espécie. <sup>(124)</sup> Algumas delas apresentam resistência intrínseca aos antifúngicos azóis, tais como *C. krusei* e *C. glabrata*, enquanto, aparentemente, a resistência a anfotericina B é incomum entre isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Já isolados de *C. lusitaniae*, por sua vez, quase sempre se mostram resistentes a esta droga <sup>(32, 92)</sup> e um número crescente de dados sugere que alguns isolados de *C. glabrata* e *C. krusei* podem ser também resistentes à mesma. <sup>(32, 111, 125)</sup>

Assim, o sucesso da terapêutica depende da identificação do agente, do conhecimento do comportamento das diferentes espécies e cepas de *Candida* frente a esses medicamentos, bem como da interpretação correta dos resultados do teste de suscetibilidade e da correlação dos mesmos com a infecção e as variáveis clínicas associadas. <sup>(32)</sup>

Um exemplo dessa importância é a candidíase orofaríngea cujo agente etiológico é *C. dubliniensis* já que tais afecções foram primeiramente identificadas em pacientes previamente expostos ao fluconazol. Essa observação sugere a seleção de *C. dubliniensis* por indução terapêutica já que esta espécie pode apresentar a manifestação rápida de resistência pós-exposição ao fluconazol ou mesmo resistência intrínseca aos antifúngicos azóis, polienos e equinocandinas. <sup>(2, 9, 23, 91,125)</sup>

De fato, Martinez e colaboradores <sup>(51)</sup> estudaram doentes submetidos a tratamento com fluconazol e demonstraram que a maioria das culturas efetuadas no início do estudo permitiu o isolamento de *C. albicans* suscetíveis à droga. Contudo, das cepas isoladas nos episódios de recidiva, cerca de 30%

mostraram resistência e ao final do estudo apresentaram valores de CIMs  $\geq 64$   $\mu\text{g/ml}$ . Ainda, os cariótipos eletroforéticos das culturas finais demonstraram que, dos isolados iniciais de *C. albicans* suscetíveis ao fluconazol, cerca de 30% haviam sido substituídos por isolados de *C. dubliniensis*. Tais resultados foram confirmados pela utilização da sonda CD25, exclusiva desta espécie. <sup>(51)</sup>

Resultados similares foram obtidos em outros trabalhos <sup>(51, 62, 90)</sup> reiterando que muitos dos isolados de *C. albicans*, obtidos de doentes expostos ao fluconazol por longo período de tempo, embora não manifestem resistência durante os episódios da doença podem ser substituídos por outras espécies resistentes a essa droga. <sup>(2, 51, 91,125)</sup>

Embora a suscetibilidade de *Candida* a alguns agentes antifúngicos possa ser inferida quando determinada a espécie do isolado infectante, cepas particulares não seguem necessariamente o padrão da espécie, o que reforça a necessidade e a importância da realização dos testes de suscetibilidade para orientação do tratamento. <sup>(32)</sup> O estudo dos perfis de suscetibilidade antifúngica é útil ainda na avaliação de causas de falha da resposta clínica com vistas a mudanças no tratamento. <sup>(32)</sup>

Ademais, avaliações de cunho epidemiológico auxiliam a prevenção da disseminação de cepas resistentes em ambiente hospitalar bem como a implementação de estratégias de controle da mesma.

## 1.5. Objetivo

### 1. 5.1. Objetivo Geral

Pelo acima exposto, o objetivo deste trabalho é determinar a prevalência de *Candida* sp. isolada da mucosa orofaríngea de uma população soropositiva para o HIV e de um grupo controle, com ênfase na pesquisa de *Candida dubliniensis*.

### 1. 5. 2. Objetivos Específicos

**A)** Determinar a prevalência das diferentes espécies de *Candida* sp. em portadores do HIV bem como em pacientes com a doença AIDS manifesta e em indivíduos imunocompetentes;

**B)** descrever as variáveis epidemiológicas associadas à presença dessa levedura na população em estudo;

**C)** estabelecer o perfil de sensibilidade antifúngica desses isolados às seguintes drogas: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol;

**D)** avaliar diferentes metodologias de triagem fenotípica de *Candida dubliniensis*.

## ***2. CASUÍSTICA E MÉTODO***

---



## 2. CASUÍSTICA E MÉTODO

### 2.1. Casuística

#### 2.1.1. Critérios de inclusão e exclusão

Constituíram o grupo em estudo, após a assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (**apêndice 1**), cem (100) indivíduos portadores do HIV Tipo 1 e/ou doentes com AIDS manifesta\*, aleatoriamente recrutados, apresentando ou não candidíase orofaríngea e capazes de informar os dados que constam na Ficha epidemiológica (**apêndice 2**). Desse modo, foram excluídos aqueles pacientes internados, em estado de consciência alterado e ainda aqueles em regime de precaução respiratória.

Esses primeiros cem indivíduos pertenciam a qualquer uma das categorias clínicas de AIDS e possuíam anticorpos anti-HIV detectados por ELISA e confirmados por Western-blot. Esses indivíduos constituíram o grupo de pacientes.

Além desses, foram incluídos no estudo, para constituir o grupo controle, cem (100) indivíduos saudáveis, pareados por idade, sexo e etnia ao primeiro grupo. Esses foram recrutados entre os funcionários, docentes e alunos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e do Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP).

\* **indivíduos portadores do HIV Tipo 1** = pacientes assintomáticos, recrutados em regime de tratamento ambulatorial  
**doentes com AIDS manifesta** = pacientes sintomáticos, recrutados durante internação

### **2.1.2. Aspectos éticos**

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 nº5386/2002 (**apêndice 3**).

Todos os sujeitos da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido sendo que os registros de prontuário ou quaisquer outras informações e/ou dados que os identificassem foram preservados.

### **2.2. Desenho do estudo**

No período de agosto de 2004 a maio de 2005, foram abordados os indivíduos soropositivos para o HIV, atendidos no ambulatório de DSTs do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto – SP (50) ou internados no setor de Doenças Infecciosas e Parasitárias do mesmo hospital (50). Paralelamente, seguiu-se o recrutamento, a coleta e a entrevista com os indivíduos do grupo controle.

Para cada paciente, foi preenchida a ficha epidemiológica compreendendo dados demográficos, epidemiológicos e clínicos, obtidos em entrevista e/ou junto aos prontuários de cada paciente.

Para julgamento do quesito etnia foi considerada a avaliação visual da cor da pele além da cor e tipo dos cabelos. Ademais, foram pesquisados quanto à origem étnica os pais e avós do sujeito da pesquisa. Foram

considerados mestiços aqueles com ascendentes classificados em duas ou mais etnias.

Para definição do abuso de bebidas alcoólicas foi pesquisado o consumo de bebidas alcoólicas nos 12 meses precedentes à coleta. O abuso foi considerado presente quando o consumo foi igual ou superior a 30 gramas/álcool/dia, <sup>(126)</sup> correspondendo a duas garrafas de cerveja ou três copos de vinho ou duas doses de bebida destilada ou aguardente e estimado pelo conteúdo alcoólico de cada tipo. <sup>(126)</sup>

Os experimentos microbiológicos foram desenvolvidos no laboratório de pesquisa Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo e no Laboratório de Pesquisas Micológicas (Lapemi) da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

### **2.3. Coleta de amostras**

A coleta de material da cavidade oral dos pacientes foi realizada durante visita ao setor de internação ou durante as consultas ambulatoriais.

As amostras foram coletadas com swab estéril umedecido em água destilada estéril, previamente preparado em câmara de fluxo laminar. 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 tubo próprio para transporte e imediatamente encaminhados ao Centro de Investigação de Microrganismos.

## 2.4. Isolamento e identificação das leveduras

### 2.4.1. Isolamento das leveduras

O material obtido a partir da cavidade oral, de cada sujeito da pesquisa, foi semeado com o próprio swab de coleta em duas placas de Petri: uma contendo o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrosado<sup>®</sup> (Biobrás) e a outra, o BBL Mycosel Agar<sup>®</sup> (Oxoid). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por até 72 horas, tendo sido acompanhado o crescimento de colônias a cada 24 horas. <sup>(49)</sup>

Foram selecionadas para identificação todas as colônias com aspecto macromorfológico compatível àquele de *Candida* sp. Desse modo, foram escolhidas as colônias globosas, ovaladas ou oval-alongadas, medindo de 3 a 7 µm por 3 a 14 µm e evidenciando cor branca ou branco-amarelada, podendo ou não exibir bordas filamentosas. <sup>(23)</sup>

Com o objetivo de distinguir colônias bacterianas de fúngicas, todas as cepas foram analisadas sob microscopia óptica (400X). <sup>(28)</sup>

### 2.4.2. Identificação das leveduras

#### 2.4.2.1. Reisolamento e identificação presuntiva das espécies de *Candida* sp.

As colônias obtidas foram ressuspendidas em tubo com água destilada estéril e ressemeadas, pela técnica do esgotamento, em meio CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> (CHROMagar *Candida* Microbiology, Biomerieux Paris, França). Em

seguida, as placas foram incubadas a 30°C, por cinco dias, tendo sido acompanhado, diariamente, o crescimento de colônias a partir de 48 horas. Todas as colônias de cores e/ou tonalidades distintas foram submetidas, separadamente, aos demais procedimentos de identificação. <sup>(59)</sup>

#### **2.4.2.2. Prova do tubo germinativo**

Com a finalidade de triar *C.albicans* e *C. dubliniensis* das demais leveduras as colônias provenientes do CHROMagar Candida<sup>®</sup> foram, separadamente, inoculadas em tubo contendo 0,5 mL de soro humano. A seguir, esse tubo foi incubado a 37°C em banho maria, por três horas. A presença do tubo germinativo foi observada através de visualização em microscópico óptico (1000X). <sup>(71)</sup>

#### **2.4.2.3. Prova do microcultivo**

A fim de se analisar o perfil micromorfológico das leveduras, todos os isolados foram semeados em placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio Agar Corn Meal CM103<sup>®</sup> (Oxoid) acrescido de Tween 80 P.S. <sup>®</sup> (Vetec).

Cada amostra foi semeada com o auxílio de agulha de níquel-cromo, em três estrias paralelas, posteriormente cobertas com lamínula previamente flambada. Então, as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 48 a 96 horas, seguindo-se a observação diária em microscópio óptico (100X e 400X). <sup>(28)</sup>

#### **2.4.2.4. Avaliação do perfil bioquímico**

Todos os isolados foram submetidos à análise do perfil bioquímico de assimilação e/ou fermentação de carboidratos por meio do auxanograma e do zimograma. Para tanto, foram preparados inóculos em água estéril, com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, para cada cepa isolada. <sup>(71, 72, 73, 74, 75)</sup>

Para a realização do auxanograma, uma alíquota de 2 mL do inóculo foi então adicionada a uma placa de Petri contendo 40 mL de ágar base carbono fundido e resfriado (45 a 50°C). Em seguida, procedeu-se a agitação para homogeneizar o inóculo no meio. Após solidificação, foram adicionados os discos impregnados com os açúcares celbiose, melbiose, xilose e dulcitol (Cefar<sup>®</sup>) além dos discos com sacarose, glicose, maltose, rafnose, lactose, inositol e galactose (Cecon<sup>®</sup>). Por fim, foi também depositada uma alíquota do açúcar trealose em pó (Becton<sup>®</sup>). As placas foram então deixadas em temperatura ambiente por 24 a 96 horas. A leitura das placas para verificação da assimilação dos diferentes açúcares foi realizada a cada 24 horas. Paralelamente, uma alíquota de 1 mL da mesma solução do inóculo foi adicionada a uma placa de Petri contendo 20 mL de agar para assimilação de nitrogênio (meio N) fundido e resfriado (45 a 50°C), seguindo-se de agitação. Após solidificação, foram adicionadas, de maneira equidistante, uma alíquota das fontes de nitrogênio: peptona (Biobrás) e nitrato de potássio. Essas placas foram incubadas a 30°C em estufa bacteriológica e a posterior leitura das placas para verificação da assimilação foi realizada durante 24 a 96 horas, a cada 24 horas. <sup>(71)</sup>

Para a realização do zimograma, novamente, uma alíquota de 200 µL da suspensão de levedura a ser testada foi inoculada em um dos seis tubos contendo 4 mL de caldo de fermentação extrato de levedura peptona (Biobrás) acrescidos, cada um deles, de 1 mL da solução de um dos carboidratos a serem utilizados (2%) e um tubo de Durhan invertido. Os carboidratos utilizados foram: dextrose, sacarose, lactose, galactose, maltose e trealose. <sup>(71)</sup> Esses tubos foram incubados a 30°C por até 28 dias sendo a primeira leitura realizada após 48 horas e, subsequentemente, a cada cinco dias, agitando-se os tubos para verificação da produção de gás. <sup>(71)</sup>

Aquelas leveduras cujo perfil bioquímico obtido após o auxanograma e o zimograma não permitiu a identificação da espécie foram submetidos à análise do perfil bioquímico pelo método comercial API ID32C AUX (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), segundo instruções do fabricante. <sup>(72, 127)</sup>

## **2.5. Triagem fenotípica de *C. dubliniensis***

A identificação de *C. dubliniensis* foi realizada por um conjunto de análises que incluíram testes clássicos e testes fenotípicos específicos.

### **2.5.1. Testes clássicos**

Dentre os testes clássicos, que foram anteriormente referidos no item 2.4.2.1. (Reisolamento e identificação presuntiva das espécies de *Candida* sp.) foram considerados: a prova do microcultivo (clamidósporos em “triplets”), <sup>(28)</sup> o aspecto da colônia em meio CHROMagar *Candida*® (colônias verdes escuras)

<sup>(59)</sup> e a avaliação do perfil bioquímico (assimilação de xilose e  $\alpha$ -metil-D-glucopiranosido). <sup>(71, 73, 74, 75)</sup>

### 2.5.2. Testes específicos

As análises fenotípicas específicas para triagem de *C. dubliniensis* incluíram os testes de tolerância às temperaturas de 42°C e de 45°C, formação de franjas de hifas em agar Niger e em agar Girassol, tolerância ao agar Sabouraud hipertônico (NaCl 6,5%) e opacificação em meio com Tween 80. Esses testes são descritos abaixo.

#### 2.5.2.1. Teste de tolerância à temperatura de 42°C <sup>(2, 5,49)</sup>

Com a finalidade de verificar a capacidade de crescimento das leveduras a 42°C, todas as cepas previamente identificadas com *C. albicans* foram repicadas e posteriormente semeadas em placa contendo Agar Sabouraud Dextrosado<sup>®</sup>. As placas foram então incubadas em estufa bacteriológica a 42°C e a leitura foi realizada após 48 horas de incubação. <sup>(2, 5,49)</sup> A cada experimento, cepas padrão de *C. albicans* e de *C. dubliniensis* também foram incubadas, como referência para o padrão de crescimento. Isolados que não exibiram crescimento foram considerados suspeitos de *C. dubliniensis*, enquanto que os isolados que exibiram crescimento foram considerados como *C. albicans*.



### 2.5.2.2. Teste de tolerância à temperatura de 45°C<sup>(8, 61)</sup>

Para triar leveduras capazes de crescimento a 45°C, todas as cepas previamente identificadas com *C. albicans* foram repicadas e posteriormente semeadas em placa com Agar Sabouraud Dextrosado<sup>®</sup> (Biobrás). As placas foram então incubadas em estufa bacteriológica a 45°C e a leitura realizada após 48 horas. Cepas padrão de *C. albicans* e de *C. dubliniensis* foram paralelamente incubadas, como controle de crescimento. Isolados que não exibiram crescimento foram considerados suspeitos de *C. dubliniensis*, enquanto aqueles que exibiram crescimento foram considerados *C. albicans*.<sup>(8, 61)</sup>

### 2.5.2.3. Formação de franjas de hifas em agar Niger<sup>(62, 128)</sup>

Para investigação da formação ou não de borda rugosa acompanhada da presença de clamidósporos abundantes, cada cepa previamente identificada como *C. albicans* foi repicada e posteriormente semeada em placa contendo agar Niger. Em seguida, procedeu-se a incubação em estufa bacteriológica a 30°C por 48 horas com posterior leitura em microscopia óptica (200X). Isolados que exibiram a formação de borda rugosa com clamidósporos abundantes foram considerados suspeitos de *C. dubliniensis*, enquanto aqueles que não exibiram borda rugosa ou que exibiram borda rugosa com poucos clamidósporos foram considerados *C. albicans*.<sup>(62, 128)</sup>

### 2.5.2.4. Formação de franjas de hifas em agar Girassol<sup>(58)</sup>

Pela mesma finalidade que o teste anterior, as cepas previamente identificadas como *C. albicans* foram repicadas e posteriormente semeadas em

placa contendo agar Girassol. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C e a leitura em microscopia óptica (200X), realizada após 48 horas de incubação. Isolados que exibiram a formação de borda rugosa com clamidósporos abundantes foram considerados suspeitos de *C. dubliniensis*. Já aqueles que não exibiram borda rugosa ou que exibiram borda rugosa com poucos clamidósporos foram considerados *C. albicans*.<sup>(58)</sup>

#### **2.5.2.5. Teste de tolerância ao agar Sabouraud hipertônico (NaCl 6,5%)<sup>(64)</sup>**

Para pesquisa da capacidade de crescimento das leveduras em Agar Sabouraud Hipertônico, as cepas previamente identificadas como *C. albicans* foram repicadas e posteriormente semeadas, em estrias, em placa de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrosado<sup>®</sup> (Biobrás) acrescido de NaCl a 6,5%. Procedeu-se, então, a incubação em estufa bacteriológica a 30°C com observação após 48 horas. Cepas padrão de *C. albicans* e de *C. dubliniensis* foram paralelamente incubadas como referência para o padrão de crescimento. Isolados que não exibiram crescimento foram consideradas suspeitos de *C. dubliniensis*.<sup>(64)</sup>

#### **2.5.2.6. Teste de opacificação em agar com Tween 80<sup>(80)</sup>**

Com a finalidade de verificar a formação de halo opaco (lipolítico) ao redor das colônias, todas as cepas previamente identificadas como *C. albicans* foram repicadas. Posteriormente, foram preparados inóculos das mesmas em água estéril, ajustados de acordo com a turbidez do tubo 3 da escala de

McFarlad. Uma alíquota de 10 µL dessas soluções foi então depositada em câmara de fluxo laminar, em pontos eqüidistantes da placa com meio contendo Tween 80. Após evaporação da fase líquida, as mesmas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C, por 48 horas, seguindo-se então a leitura. Cepas padrão de *C. albicans* e de *C. dubliniensis* também foram incluídas como referência para a formação do halo. Isolados que não exibiram halo de opacidade ao redor da colônia foram considerados suspeitos de *C. dubliniensis* enquanto aqueles que exibiram halo opaco ao redor da colônia foram identificados como *C. albicans*.<sup>(80)</sup>

## **2.6. Armazenamento das cepas**

### **2.6.1. Formação da micoteca**

Com o objetivo de estocar as amostras obtidas para as análises subseqüentes deste estudo, todas as cepas foram mantidas em tubos de ensaio de 125 x 10 mm, com tampa de rosca, contendo aproximadamente 5 mL de Agar Sabouraud Dextrosado<sup>®</sup> (Biobrás) e incubadas em estufa bacteriológica a 30°C. A cada dois meses essas cepas foram repicadas em câmara de fluxo laminar.

### **2.6.2. Congelamento**

Em adição, as cepas isoladas foram também repicadas em tubos para criopreservação de 1,5 mL, com tampa de rosca, contendo meio de congelamento para fungos. Cada cepa foi congelada em triplicata tendo antes

permanecido por uma hora em temperatura ambiente para adaptação. Posteriormente, dois desses foram armazenados em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  e um outro em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.7. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

A suscetibilidade antifúngica das cepas de *Candida* sp. isoladas foi avaliada pelo método da difusão em disco, de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M-44P pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS).<sup>(129)</sup>

Ademais, os isolados de *C. albicans* e de *C. dubliniensis* tiveram seu perfil de sensibilidade antifúngica ao fluconazol avaliado também pelo teste de microdiluição em caldo, de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-2A pelo NCCLS.<sup>(114)</sup>

### 2.7.1. Método da difusão em disco<sup>(129)</sup>

Para a execução desse teste foi preparada uma suspensão da levedura em solução salina 0,85% com turvação equivalente ao tubo 0.5 da escala de McFarland. Seguiu-se, então, a semeadura em placa contendo Agar Mueller-Hinton (Difco) acrescido de azul de metileno (Synth) e dextrose (Chemco). Após evaporação da fase líquida foram aplicados discos (Cecon<sup>®</sup>) com as seguintes drogas: fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B. Essas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a uma temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$  por até 72 horas, sendo a medida do halo de inibição efetuada após 24h. A

definição dos parâmetros de resistência, sensibilidade intermediária e sensibilidade foram definidos segundo critérios do fornecedor (Cecon – **Quadro 1**).

**Quadro 1.** Critérios de susceptibilidade aos antifúngicos testados

suscetibilidade	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	≤ 10
Resistente	<14	≤ 10	≤ 20	

### 2.7.2. Microdiluição <sup>(114)</sup>

Setenta e seis cepas de *C. albicans* e três de *C. dubliniensis*, isoladas dos pacientes soropositivos e doentes com AIDS (três cepas de *C. albicans* não puderam ser repicadas e testadas), além das nove cepas de *C. albicans* isoladas no grupo controle, foram avaliadas quanto a perfil de sensibilidade ao antifúngico fluconazol (Pfizer Incorporated, New York, NY, EUA) através da microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M27-2A (NCCLS). <sup>(114)</sup>

Além dos isolados clínicos, foi incluída nos ensaios, uma cepa-controle, para a validação do controle de qualidade na verificação da perfeita atividade do antifúngico, uma vez que era previamente conhecida a concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol para este microrganismo. <sup>(114, 130)</sup>

Foi utilizado o meio líquido RPMI-1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, EUA) com L-glutamina, 20g/L de glicose, sem bicarbonato de sódio e tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) 0,165M, pH 7,0.

A partir de um cultivo de 24 a 48 horas da levedura a ser testada, foi preparada uma suspensão inicial, em tubo de ensaio, à 530nm com transmitância ajustada para 90% em espectrofotômetro, equivalendo a uma suspensão com  $1 \times 10^6$  células/mL. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas, em meio RPMI-1640, a partir da suspensão inicial, para obtenção de inóculo final, contendo  $0,5 \times 10^2$  células/mL.

O antifúngico fluconazol foi diluído, previamente aos testes, em dez diferentes concentrações seriadas de 1,25 a 640  $\mu\text{g/mL}$ . As dez diferentes concentrações do antifúngico foram diluídas a 1:5 em RPMI-1640 e alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  destas concentrações foram dispensadas seqüencialmente nas placas de microtitulação (Corning Inc. Costar), preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez.

Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do inóculo final foi adicionado a cada poço das placas de microtitulação contendo as dez diferentes concentrações dos antifúngicos diluídos em meio RPMI, chegando-se à concentração final desejada de antifúngico e inóculo. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 35°C, por 48 horas.

A menor concentração capaz de induzir proeminente inibição (em torno de 80%) do crescimento da levedura testada, em relação ao poço controle, foi identificada como a CIM para o fluconazol (**Quadro 2**).<sup>(114)</sup>

**Quadro 2.** Critérios de susceptibilidade ao fluconazol

SUSCETIBILIDADE	CIM Fluconazol ( $\mu\text{g/mL}$ )
Sensível	$\leq$ oito
S-DD*	16 e 32
Resistente	$\geq$ 64

\* S-DD = sensível dependendo da dose

## 2.8. Análises estatísticas

Os dados foram processados e analisados no programa de estatística MINITAB versão 12.22. Para a análise dos resultados, foram utilizados testes não paramétricos (teste do qui-quadrado de Pearson, teste exato de Fisher e teste de Mann-Whitney), considerando a natureza das variáveis estudadas.

O teste do qui-quadrado de Pearson foi utilizado para verificar a relação de dependência entre duas variáveis dicotômicas, seguindo o princípio da comparação entre frequências observadas na amostra e frequências esperadas, caso houvesse relação de independência entre as duas variáveis. O teste exato de Fisher foi utilizado para as tabelas do tipo 2 x 2, quando alguma frequência esperada fosse inferior a cinco. Já o teste de Mann-Whitney foi empregado para comparação de variáveis quantitativas visando estudar se apresentavam distribuição semelhante, tomando a mediana como referência.

Para avaliação do grau de discordância entre os testes de triagem fenotípica para *C. dubliniensis* e, também, para os testes de avaliação do perfil de sensibilidade antifúngica foi aplicado o teste de McNemar.<sup>(131)</sup> Além desses, para validação dos mesmos, foram calculados os seguintes parâmetros: sensibilidade, especificidade e eficácia.<sup>(132)</sup>

Para todos os testes estatísticos o nível de significância adotado foi de  $\alpha < 0,05$ .

### **3. RESULTADOS**

---



### 3. RESULTADOS

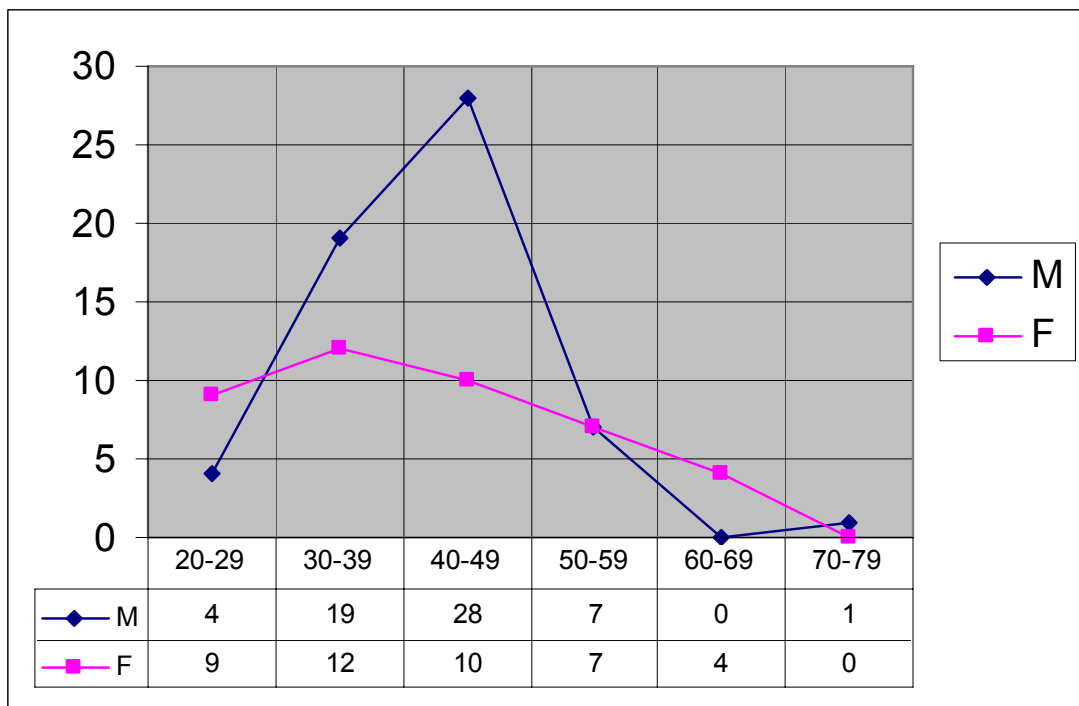
#### 3.1. População estudada

##### 3.1.1. Pacientes

No momento da coleta, cinqüenta pacientes estiveram internados correspondendo aos doentes com AIDS manifesta deste estudo. Desses, aproximadamente a metade já estava internada há até sete dias e a outra metade há oito dias ou mais ( $\bar{X} = 10,96$  dias), sendo que o tempo de internação variou de um a sessenta dias. Os demais pacientes (50) foram recrutados no ambulatório de Doenças Infecto-parasitárias do Hospital de Base.

A média de idade foi de 40,86 anos ( $\sigma = 10,19$  anos), variando de 21 a 70 anos, sendo que a maioria (60%) pertence ao sexo masculino. A maior parte dos homens encontra-se na faixa etária de 40 a 49 anos enquanto que a maioria das mulheres naquela de 30 a 39 anos. Em ambos os sexos, poucos indivíduos ocupam a faixa etária de 70 a 79 anos (**Figura 3**). Quanto à etnia, 64% eram caucasóides, 21% mestiços, 13% negróides e 2% orientais.

Em relação à procedência, 62% reside em São José do Rio Preto, 33% em outras cidades da Região Noroeste Paulista e a minoria (5%) em cidades do Sul do Estado de Minas Gerais. Oitenta e sete pacientes moram na zona urbana, dois em zona semi-urbana, oito deles na periferia e apenas três em zona rural.



**Figura 3.** Distribuição dos pacientes soropositivos para HIV e doentes com AIDS de acordo com idade e sexo.

Em entrevista, foi também pesquisado o consumo de álcool e 14% dos pacientes afirmou consumir bebida alcoólica de maneira abusiva enquanto que, quando questionado o uso de drogas injetáveis, aproximadamente a mesma porcentagem (13%) referiu tal prática.

Em se tratando da saúde bucal, 79% referiu utilizar apenas escova de dente e pasta dental, enquanto 16% o uso de escova, pasta e fio dental. O restante usa escova dental com produtos diversos (ex: sabão em pó, água sanitária, sabonete). Já quanto à frequência da higiene bucal, apenas 43% a faz de modo satisfatório (três vezes por dia ou mais), enquanto 47% a realiza duas vezes ao dia e os demais (10%) de maneira insatisfatória (uma vez ao dia ou menos). Por fim, desses, 49% possui prótese dentária.

O tempo médio de diagnóstico positivo para o HIV foi de 7,18 anos, variando de um dia a 19 anos. A principal forma de contaminação referida foi relação sexual (56%), seguida do uso drogas injetáveis (9%). Trinta e cinco por cento dos pacientes não souberam ou optaram por não responder a essa pergunta.

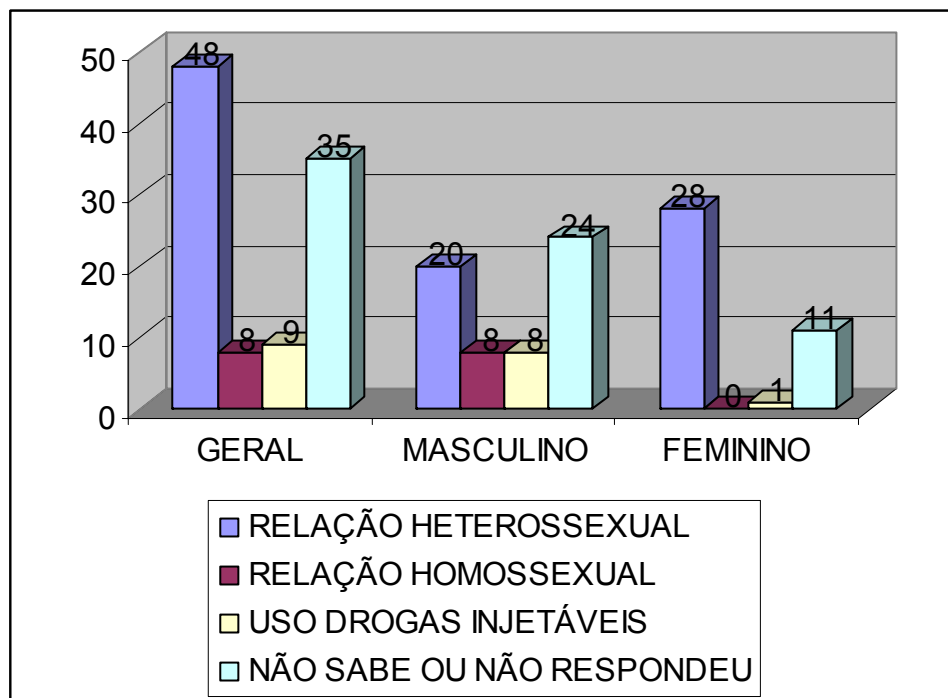
Entretanto, o perfil de contaminação pelo HIV mostrou-se distinto quando considerado o gênero. Foi verificada uma diferença significativa em relação ao contágio por relação sexual ( $p = 0,0014$ ) e diferenças importantes em relação às demais formas de contaminação. Entre os pacientes do sexo masculino 46,66% relatou ter se contaminado por relação sexual (sendo 33,33% e 13,33%, respectivamente, por relação heterossexual e homossexual) e 13,33% referiu o uso de drogas injetáveis. Por fim, 40% não soube ou optou por não responder a essa pergunta. Já

em relação ao sexo feminino, 70% relatou ter se contaminado por relação sexual, 2,5% referiu ter se contaminado com o uso de drogas injetáveis e 27,5% não souberam ou optaram por não responder a essa pergunta (**Figura 4**).

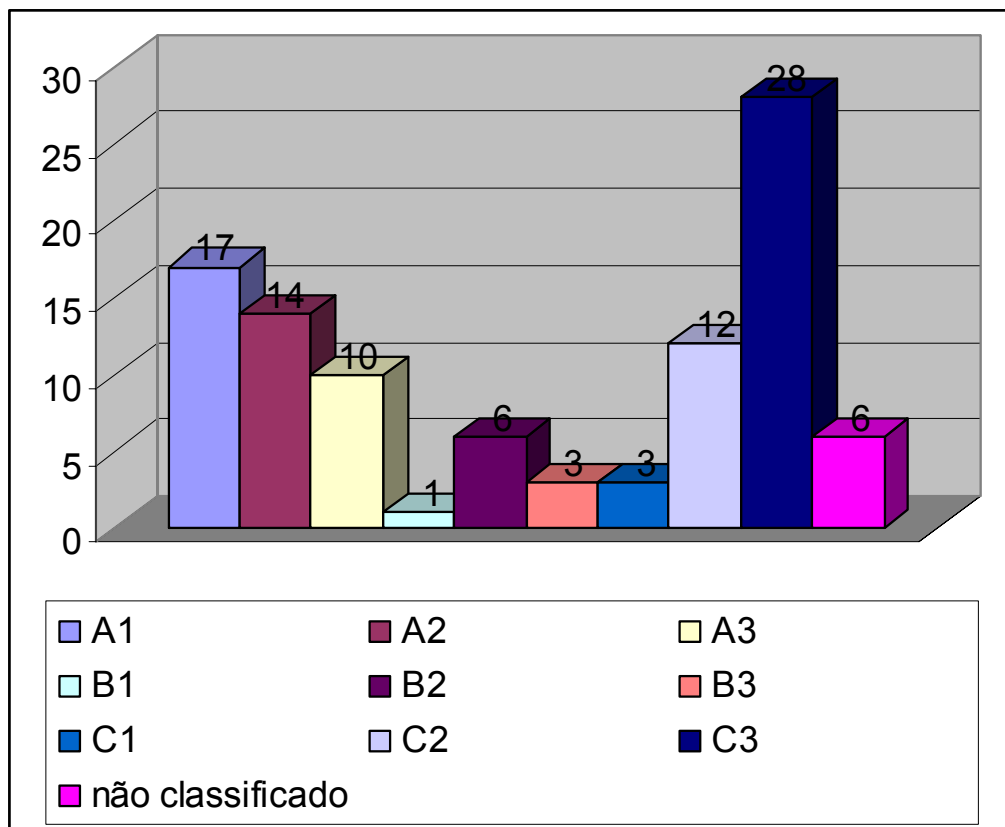
O histórico médico-hospitalar mostrou que 21 pacientes estiveram previamente internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), 24 sofreram transfusão de hemoderivados e 19 deles passaram por procedimentos invasivos em ambiente hospitalar. Apenas um paciente realizou quimioterapia.

Segundo a classificação do CDC de 1987, revisada em janeiro de 1993, <sup>(133)</sup> a maioria do grupo estudado (28%) encontra-se na categoria clínica C3, seguida das seguintes categorias: A1, A2, C2, A3, B2, C1, B3 e B1, em diferentes freqüências. Os prontuários incompletos impediram a classificação de 6% do grupo estudado (**Figura 5**).

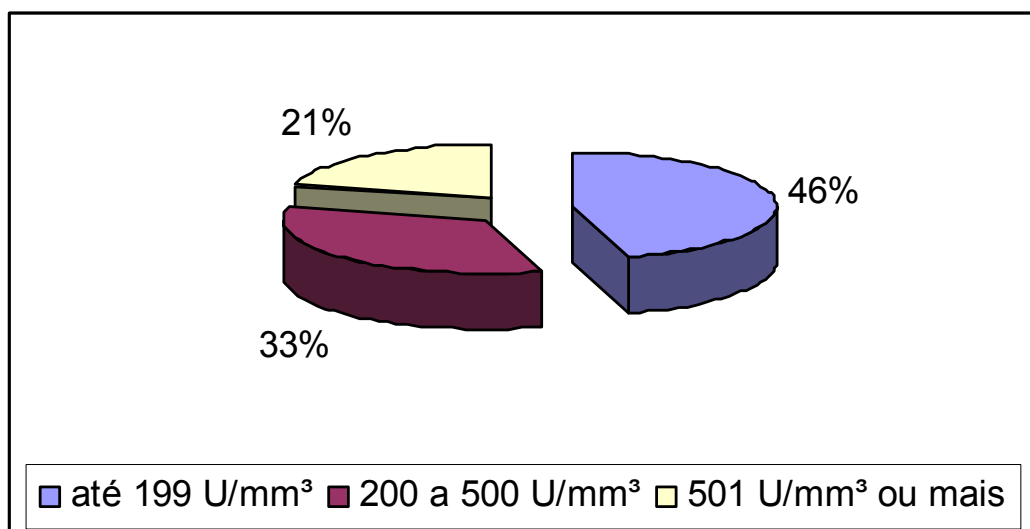
A pesquisa do status imunológico revelou que a contagem de células TCD4<sup>+</sup> variou de 11 a 951 U/mm<sup>3</sup>, com  $\bar{X} = 296,34$  U/mm<sup>3</sup> e  $\sigma = 253$ , segundo o exame mais recente do prontuário. Ainda nesse mesmo parâmetro, aproximadamente a metade possuía contagem inferior a 199 U/mm<sup>3</sup>, sendo que em 33% deles a contagem esteve entre 200 e 500 U/mm<sup>3</sup> e em 21% deles, acima de 501 U/mm<sup>3</sup> ( $\bar{X} = 131.263$  U/mm<sup>3</sup> e  $\sigma = 332.754$  U/mm<sup>3</sup>) (**Figura 6**).



**Figura 4.** Distribuição segundo o gênero dos indivíduos soropositivos para HIV e doentes de AIDS e de acordo com a forma de contaminação pelo HIV.



**Figura 5.** Classificação dos pacientes estudados nas diferentes categorias clínicas, de acordo com a classificação descrita no documento do CDC de 1993. <sup>(134)</sup>

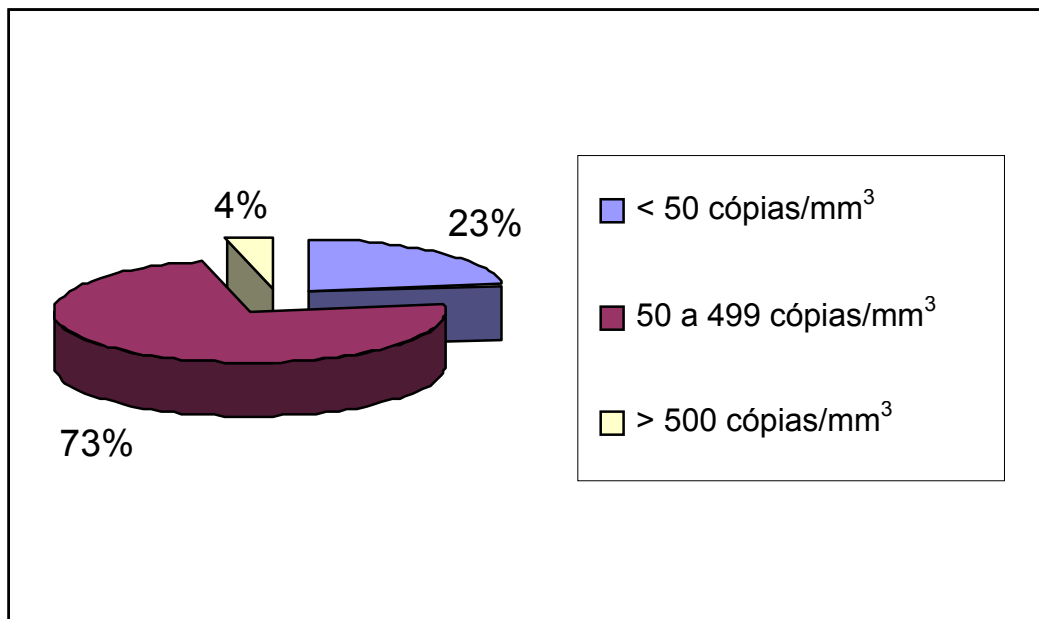


**Figura 6.** Distribuição dos pacientes soropositivos para HIV e doentes com AIDS de acordo com a contagem de células TCD4<sup>+</sup>.

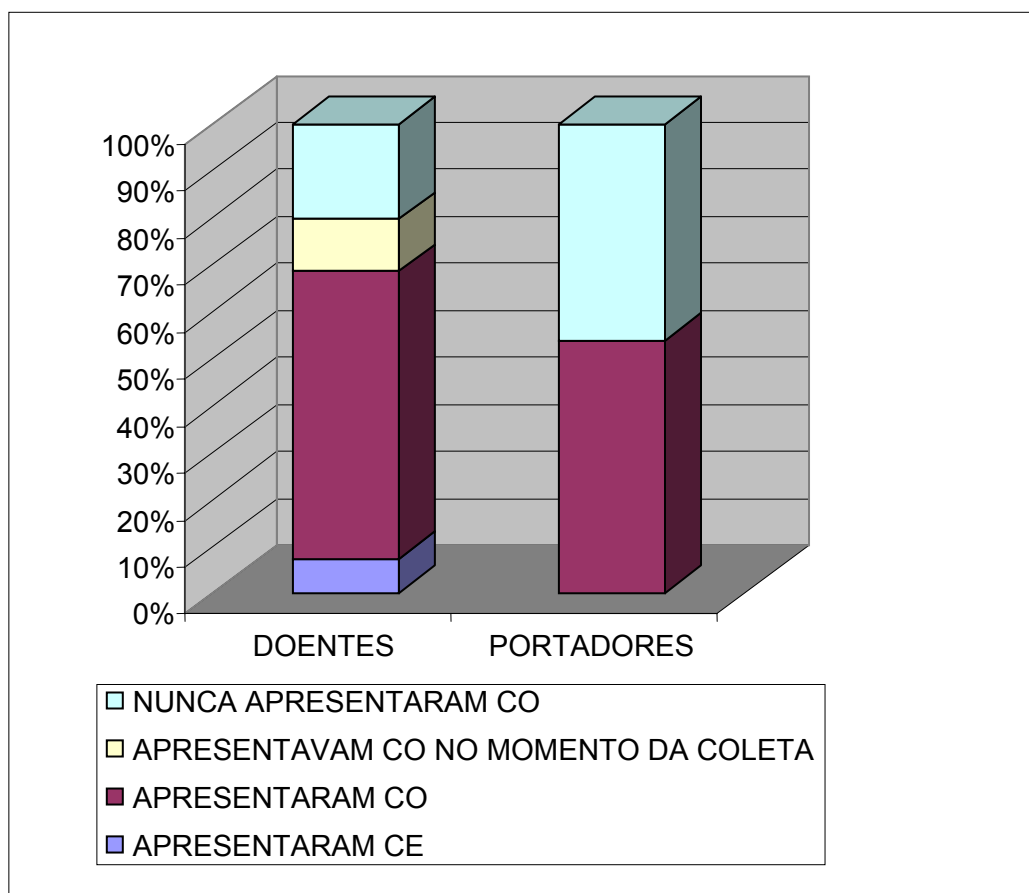
O resultado referente à contagem de cópias do HIV revelou que a carga viral em 23% dos pacientes foi indetectável (menor que 50 cópias/mm<sup>3</sup>), em 72% deles foi de 50 a 499.999 cópias/mm<sup>3</sup> e em apenas 4% foi de 500 mil cópias ou mais (**Figura 7**).

Quanto à infecção pregressa por *Candida* sp., 66% dos doentes com AIDS manifesta referiu pelo menos um episódio prévio de candidíase orofaríngea (CO) enquanto que, entre os portadores, essa porcentagem foi menor (54%). Quatro pacientes tiveram um único episódio de candidíase esofágica (CE), no ano anterior à coleta. No grupo em estudo, 34% dos indivíduos nunca apresentou nenhum episódio dessa infecção. Por fim, seis pacientes mostraram sinais clínicos de CO no momento da coleta, representando 12% dos doentes com AIDS manifesta (**Figura 8**).

Em relação à ocorrência de comorbidades, um quarto da amostra portava doenças crônicas tais como hepatite C (21%), hipertensão (4%), gota úrica (2%) e hanseníase (1%). Considerando o período de 12 meses anteriores à coleta, 67% dos indivíduos pesquisados apresentou outras patologias, destacando-se a neurotoxoplasmose (17%), a hepatite B (13%) e a pneumonia (13%), seguidas pelas seguintes afecções: pneumocistose (11%), tuberculose pulmonar (10%), herpes zoster (10%), herpes simples (9%), candidíase oral (9%), tuberculose extra-pulmonar (9%), neurocriptococose (4%), histoplasmose (4%), candidíase esofágica (4%), citomegalovirose (3%), toxoplasmose oftálmica, sepse, meningite herpética, epilepsia, criptosporidiose e criptococose (2%) (**Figura 9**).

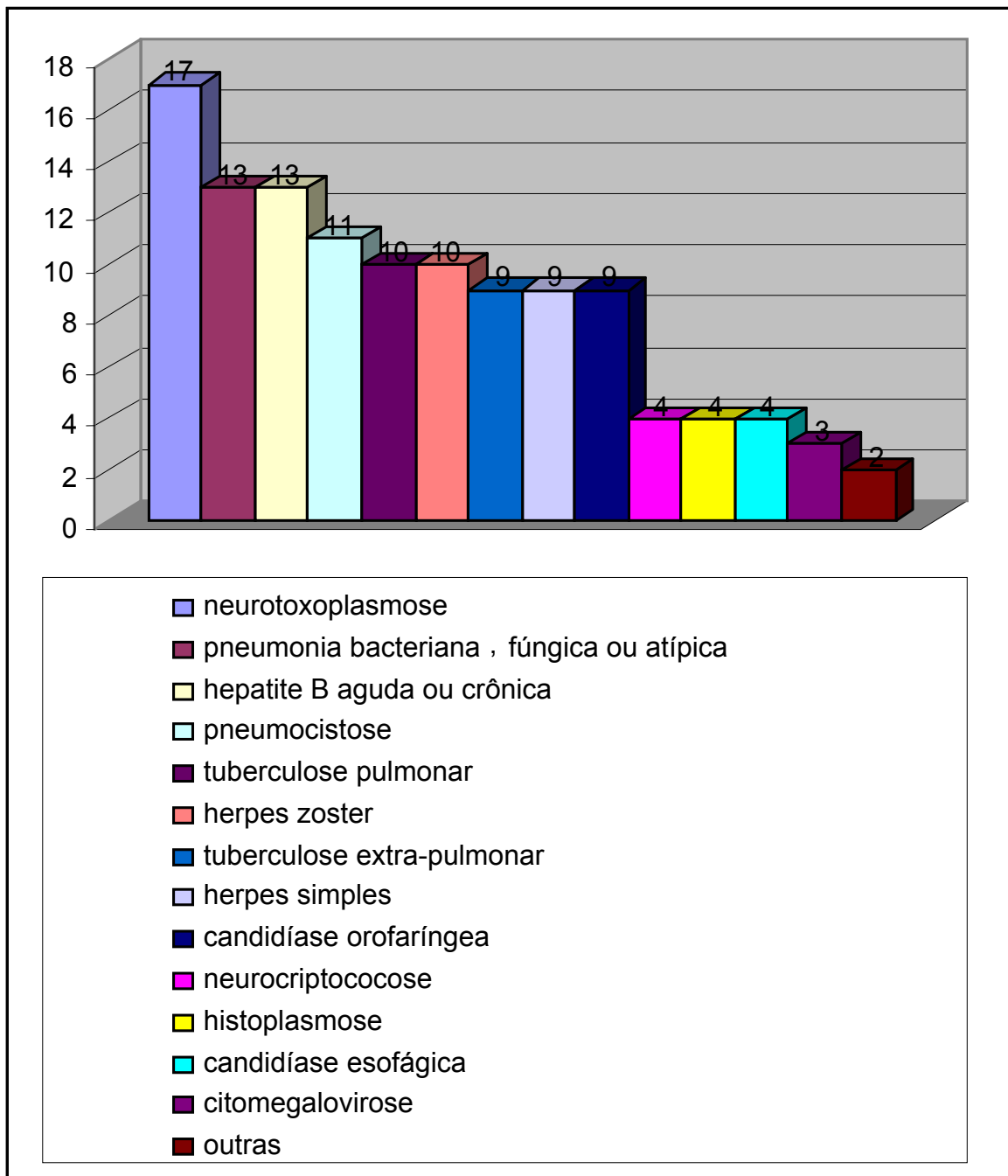


**Figura 7.** Porcentagem dos pacientes soropositivos para HIV e doentes com AIDS de acordo com a contagem de cópias do HIV.



**Figura 8.** Distribuição do número de pacientes portadores do HIV e doentes com AIDS de acordo com a manifestação de candidíase orofaríngea (CO) ou candidíase esofágica (CE).



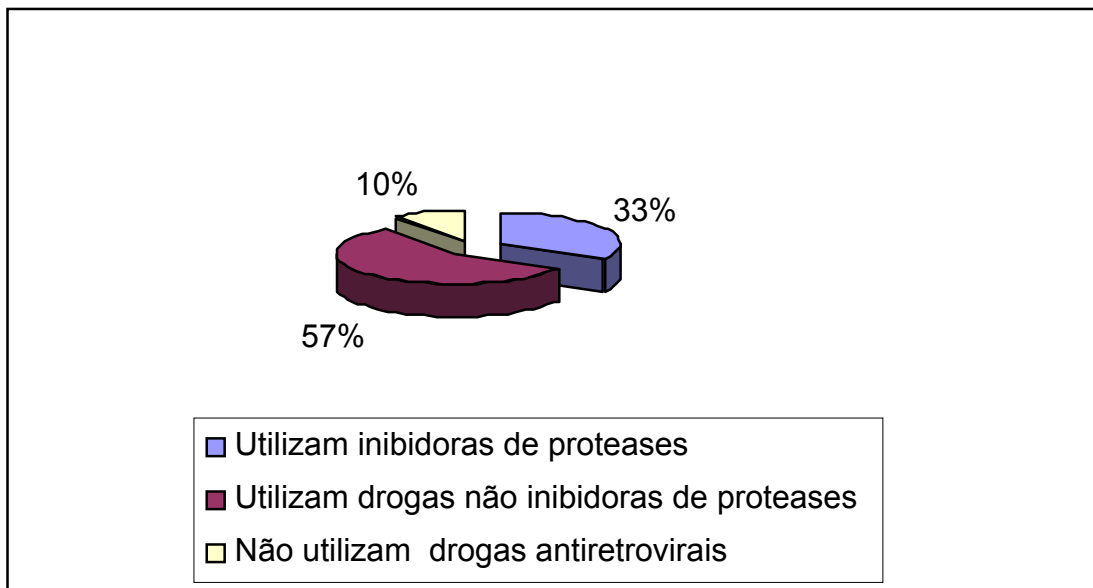


**Figura 9.** Distribuição do número de pacientes portadores do HIV e doentes com AIDS por comorbidades apresentadas nos últimos 12 meses anteriores à inclusão neste estudo.

A partir do prontuário médico foi possível verificar que 60% dos pacientes foram submetidos à terapia antibacteriana sendo que, desses, 58% por terapia antibacteriana de amplo espectro.

Drogas antifúngicas foram prescritas a 32% dos indivíduos e aproximadamente metade desses fez uso de azóis (6% cetoconazol, 6% fluconazol, 3% fluconazol + itraconazol, 2% fluconazol + cetoconazol e 1% itraconazol). Outros vinte e cinco pacientes: 13% dos pacientes fizeram uso nistatina, 5% pentamidina, 3% nistatina + pentoxifilina, 2% nistatina + anfotericina B e 2% utilizaram anfotericina B. Ainda, 9% dos pacientes utilizou a combinação entre azóis e não azóis (dois pacientes fizeram uso de cetoconazol + nistatina, um de fluconazol + pentoxifilina, um de nistatina + pentoxifilina, um de cetoconazol + fluconazol + nistatina, um cetoconazol + nistatina + pentoxifilina, um de fluconazol + anfotericina B + nistatina enquanto que outro de cetoconazol + fluconazol + nistatina + pentoxifilina).

Já em relação à terapia antiretroviral, 90% do grupo em estudo faz uso dessa classe de medicamentos sendo que, desses, 73% se encontram em tratamento há mais de um ano. Os demais (10%) não fazem uso dessa classe de medicamentos. Em relação à categoria das drogas antiretrovirais utilizadas, aproximadamente 37% faz uso de algum inibidor de proteases **(Figura 10)**.



**Figura 10.** Distribuição dos pacientes soropositivos para o HIV e doentes com AIDS de acordo com o uso e tipo de terapia antiretroviral.

### 3.1.2. Grupo controle

A média de idade dos indivíduos do grupo controle foi de 40,82 anos ( $\sigma= 10,68$  anos), variando de 18 a 67 anos, a maioria (60%) do sexo masculino. Grande parte dos homens ocupa a faixa etária de 40 a 49 anos, enquanto que a maioria das mulheres tem idades entre 30 a 39 anos. A minoria, para ambos os sexos, pertence à faixa etária de 70 a 79 anos. A classificação étnica revelou que 64% são caucasóides, 21% mestiços, 13% negróides, e 2% orientais.

Quanto à procedência, 78% reside em São José do Rio Preto e o restante em outras cidades da região Noroeste Paulista, todos na zona urbana.

Em relação aos aspectos sociais, 2% dos pacientes afirmou consumir bebida alcoólica de maneira abusiva (30g/álcool/dia), porém nenhum deles referiu o uso de drogas injetáveis.

A pesquisa dos hábitos de higiene bucal mostrou que aproximadamente metade dos pacientes utiliza escova e pasta dental enquanto 43% a escova de dente acrescida do fio dental. A minoria (5%) usa escova, pasta de dentes e fio dental, além de algum outro enxaguatório bucal (Lysterine<sup>®</sup>, Cepacol<sup>®</sup>, Oral B<sup>®</sup>, Periogard<sup>®</sup>). A grande maioria (89%) realizava higiene bucal com frequência considerada satisfatória (três vezes por dia ou mais). No total, 16% fazia uso de prótese dentária.

Nenhum dos indivíduos desse grupo referiu ocorrência de infecção prévia por *Candida* sp.

Em relação à terapia prévia com antifúngicos e antiretrovirais nenhum indivíduo desse grupo relatou ter sido submetido a esses tipos de tratamento.

### **3.1.3. Comparação entre os grupos estudados**

A comparação entre os grupos estudados mostrou um alto grau de associação entre as variáveis idade ( $r = 0,96$ ), sexo ( $r = 1,00$ ) e etnia ( $r = 1,00$ ).

Entretanto, foram observadas diferenças significantes nos seguintes parâmetros: saúde bucal, consumo abusivo de álcool, uso de drogas, prevalência de doenças crônicas e comorbidades, ocorrência de candidíase orofaríngea, episódios de transfusão de sangue e terapia prévia com antimicrobianos.

De um modo geral, um número maior de pacientes possuía prótese dentária (valor  $p < 0,005$ ) enquanto que os indivíduos do grupo controle realizaram melhor sua higiene bucal (valor  $p < 0,005$ ).

Ainda, no grupo de pacientes, foi verificada maior prevalência de consumo abusivo do álcool (valor  $p = 0,0002$ ). O mesmo pode ser evidenciado em relação ao uso de drogas (valor  $p = 0,0003$ ).

Os mesmos resultados foram observados quando comparada à prevalência de doenças crônicas, comorbidades, ocorrência de candidíase orofaríngea e episódios de transfusão de sangue (valor  $p < 0,005$ ).

Por fim, o uso de terapia prévia com antibacterianos, antifúngicos e antiretrovirais foi maior nos portadores do HIV e doentes com AIDS do que nos indivíduos do grupo controle (valor  $p < 0,005$ ).

### 3.2. Prevalência de *Candida* sp.

#### 3.2.1. Pacientes

Foram obtidas 107 cepas de *Candida* sp. a partir dos 87 pacientes que estiveram colonizados e/ou infectados\*. Dessas, 10 (9,3%) foram identificadas como *C. glabrata*, 18 (16,8%) como *C. tropicalis* e 79 (73,8%) inicialmente tipadas como *C. albicans*.

Posteriormente, por um conjunto de parâmetros que envolveram tanto a avaliação morfológica quanto bioquímica, com o uso de testes clássicos (prova do microcultivo e coloração das colônias) e de outros descritos especificamente para diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* (coloração das colônias no meio CHROMagar Candida, tolerância à temperatura de 42°C e de 45°C, formação do halo de opacidade em meio com Tween 80, tolerância ao agar Sabouraud hipertônico, auxanograma com xilose e  $\alpha$ -metil-D- glucopiranosídeo e formação de franjas de hifas em agar Niger e em agar Girassol), foi realizada a triagem fenotípica de *C. dubliniensis* (**Quadro 3**).

\* **Colonização** = cultura positiva de *Candida* sp. sem sinais clínicos de candidíase

**Infecção** = cultura positiva de *Candida* sp. associada a presença de sinais clínicos de candidíase

**Quadro 3.** Resultados dos testes efetuados para triagem fenotípica de *C. dubliniensis* nos portadores do HIV/doentes com AIDS. Onde: (+) *C. dubliniensis* (CD); (-) *C. albicans* (CA); microcultivo (MIC); CHROMagar Candida® (CMC); tolerância à temperatura de 42°C (T42°C) e a 45°C (T45°C); formação de halo de opacidade em agar Tween 80 (HAT); tolerância ao agar Sabouraud hipertônico (TSH); formação de franjas de hifas em agar Niger (FAN) e em agar Girassol (FAG); auxanograma (AUX) e NT = não testada

Nº.	MIC	CMC	T42°C	T45°C	HAT	TSH	FAN/ FAG/AUX	IDENTIFICAÇÃO
02	-	-	-	-	-	+	-	CA
03	-	-	+	-	-	+	-	CA
04	-	-	-	-	-	+	-	CA
05	-	-	-	-	-	+	-	CA
06	-	-	-	-	-	+	-	CA
07	-	-	-	-	-	+	-	CA
08	+	+	+	-	-	+	+	CD
10	-	-	-	-	-	+	-	CA
12	-	-	-	-	-	+	-	CA
13	-	-	+	-	-	-	-	CA
14	-	-	-	-	-	-	-	CA
17	-	-	-	+	-	+	-	CA
18	-	-	-	+	-	+	-	CA
19	-	-	-	+	-	+	-	CA
20	-	-	-	-	-	-	-	CA
21	+	-	-	-	-	+	-	CA
22	-	-	-	-	-	-	-	CA
27	+	+	-	-	-	-	-	CA
28	+	+	-	-	-	+	-	CA
29	+	+	-	-	+	-	+	CD
31	+	-	-	-	-	+	-	CA
32	-	-	-	+	+	+	-	CA
33	+	-	-	+	-	+	-	CA
34	-	-	-	+	-	+	-	CA
36	-	-	-	+	+	+	-	CA
37	-	-	-	+	-	+	-	CA
39	-	+	+	-	NT	+	-	CA
40	-	-	-	-	-	+	-	CA
41	+	+	-	-	-	+	-	CA
42	+	-	-	+	-	+	-	CA
43	-	-	-	+	-	+	-	CA
46	-	-	-	-	-	-	-	CA
47	+	-	-	+	-	+	-	CA
48	-	-	-	-	-	-	-	CA
50	-	-	-	+	-	+	-	CA
51	-	-	-	-	-	+	-	CA

Quadro 3. (continuação)

Nº.	MIC	CMC	T42°C	T45°C	HAT	TSH	FAN/ FAG/AUX	IDENTIFICAÇÃO
52	-	-	-	-	+	+	-	CA
55	-	-	-	+	+	+	-	CA
56	-	-	-	-	+	+	-	CA
58	+	-	+	+	NT*	+	-	CA
59	-	-	-	-	-	+	-	CA
60	+	+	-	-	NT*	-	+	CD
63	-	-	-	-	NT*	+	-	CA
64	-	+	-	-	NT*	+	-	CA
65	-	-	-	-	+	+	-	CA
66	-	-	-	-	+	+	-	CA
69	-	-	-	-	+	-	-	CA
70	-	-	-	-	+	-	-	CA
71	-	-	-	+	-	+	-	CA
72	-	-	-	-	-	+	-	CA
73	-	-	-	+	-	+	-	CA
74	-	-	-	-	-	+	-	CA
75	-	-	-	-	-	+	-	CA
76	-	-	+	-	-	+	-	CA
77	-	-	+	-	+	-	-	CA
78	-	-	+	-	-	+	-	CA
79	-	-	-	-	-	+	-	CA
80	-	-	-	-	+	-	-	CA
81	+	-	-	-	+	-	-	CA
82	-	-	-	-	-	+	-	CA
83	-	-	-	-	+	-	-	CA
85	-	-	-	+	+	-	-	CA
86	-	-	-	+	+	-	-	CA
87	-	-	-	+	+	-	-	CA
89	-	-	-	-	+	-	-	CA
90	-	-	-	-	-	+	-	CA
92	-	-	+	-	-	+	-	CA
95	+	-	-	-	-	+	-	CA
96	-	-	-	-	+	-	-	CA
97	-	-	-	-	-	+	-	CA
98	-	-	-	-	+	-	-	CA
99	-	-	-	-	-	+	-	CA
100	-	-	-	-	-	+	-	CA
101	-	-	-	-	+	-	-	CA
102	-	-	-	-	+	-	-	CA
103	-	-	-	-	-	+	-	CA

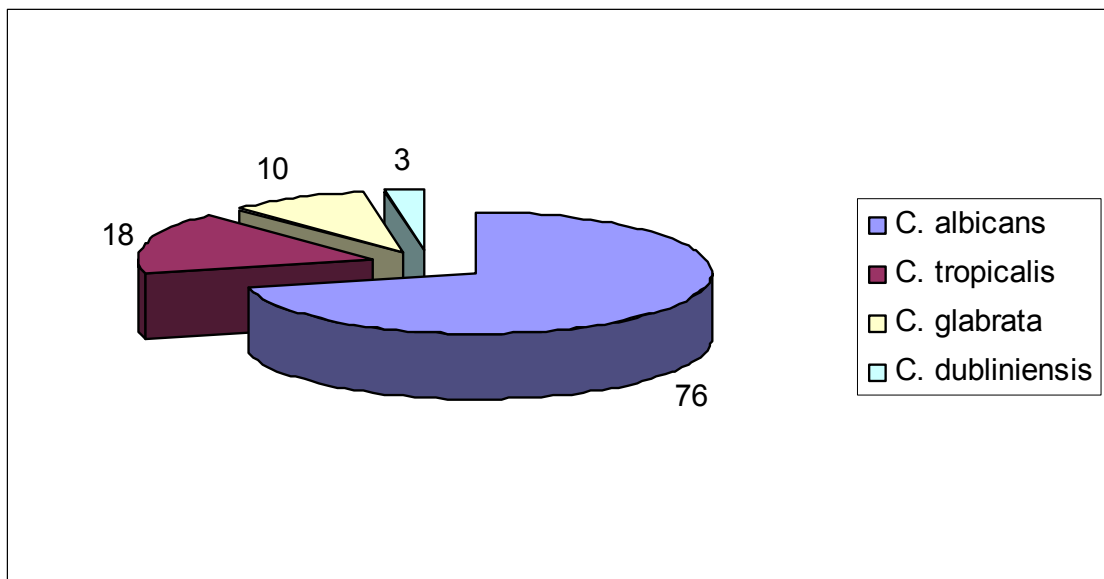


Desse modo, três cepas (4,1%), em 73 inicialmente tipadas como *C. albicans*, apresentaram perfil fenotípico compatível com *C. dubliniensis*. Outras três cepas de *C. albicans* não puderam ser repicadas e, portanto, não foram submetidas à triagem para *C. dubliniensis* (**Figura 11**). Essas amostras foram isoladas da mucosa orofaríngea de dois homens com a doença AIDS manifesta e um outro portador de HIV. Todos são usuários de prótese dentária e já apresentaram pelo menos um episódio prévio de candidíase orofaríngea. Em relação à etnia, um foi classificado como mestiço (ascendência caucasóide e negróide) e os outros dois, como caucasóides. Apenas um deles relatou o uso abusivo de álcool.

Desse modo, após a análise fenotípica, foi possível constatar que uma parcela considerável das cepas isoladas pertence ao grupo de espécies não-*albicans* (29%).

Dos 87 pacientes cuja cultura foi positiva para o crescimento de *Candida* sp., setenta e três (72,41%) estiveram colonizados por uma única espécie: cinquenta e três (60,91%) por *C. albicans*, quatro (4,59%) por *C. glabrata*, três deles (3,45%) apresentaram *C. tropicalis* e outros três (3,45%) estiveram colonizados por *C. dubliniensis*.

Adicionalmente, a partir do material obtido da mucosa orofaríngea de 19 pacientes (21,83%) foi possível o isolamento de mais de uma espécie de *Candida* sp, caracterizando a presença de colonização mista. Desses, treze pacientes (15%) estiveram colonizados tanto por *C. albicans* como por *C. tropicalis*, enquanto que cinco deles (5,74%) apresentaram *C. albicans* e *C. glabrata* (**Figura 12**).



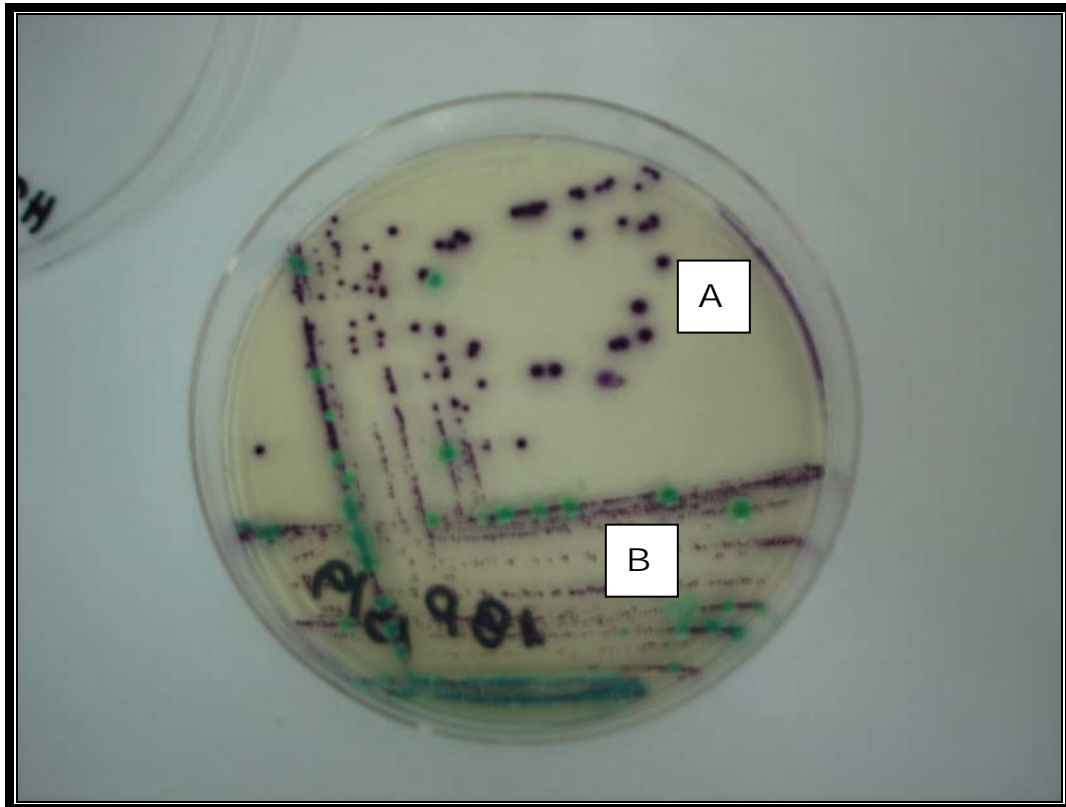
**Figura 11.** Número de cepas das diferentes espécies de *Candida* sp. isoladas da cavidade oral de 87 pacientes soropositivos para o HIV e doentes com AIDS.

Para aqueles pacientes que manifestavam sinais clínicos de candidíase orofaríngea (6,89%), quatro deles estiveram infectados apenas por *C. albicans*, enquanto que um paciente portava apenas *C. tropicalis*. Por fim, um dos portadores de candidíase orofaríngea esteve colonizado/infectado por três espécies de *Candida* sp (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*).

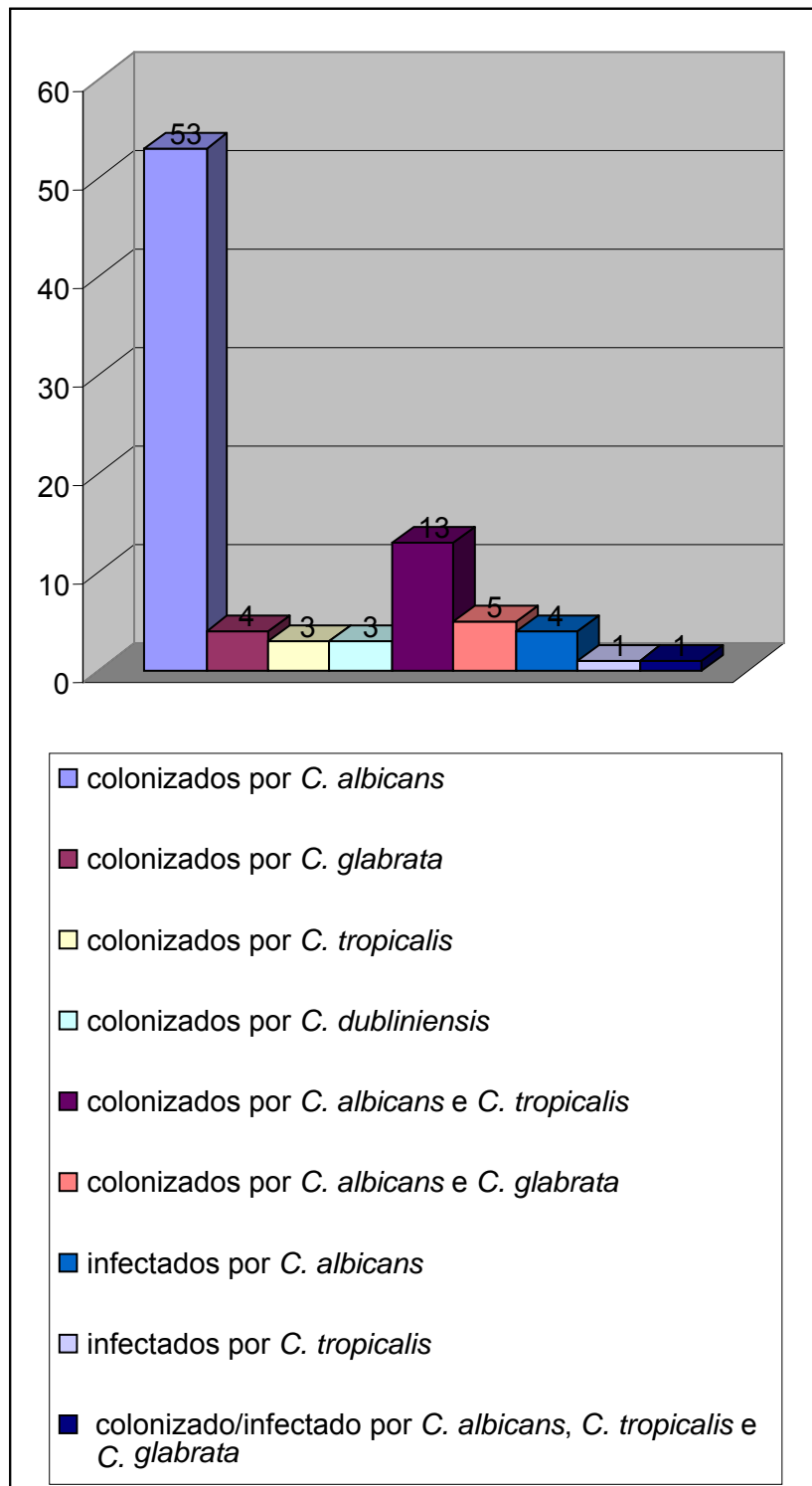
### **3.2.1.1. Portadores do HIV versus doentes com AIDS**

Quando considerados somente os portadores do HIV, a grande maioria (82%) esteve colonizada por *Candida* sp. em sua microbiota oral, sendo 6% dessas, colonizações mistas. Entretanto, nenhum deles apresentava sinais clínicos de candidíase orofaríngea (**Figura 13**).

Já no grupo dos doentes com AIDS, 80% esteve colonizado por *Candida* sp. No entanto, 12 pacientes (24%) apresentaram colonização mista e ainda, 12% apresentava candidíase orofaríngea no momento da coleta (**Figura 13**).



**Figura 12.** Cultura em CHROMagar Candida® evidenciando a coloração das colônias de *C. glabrata* (A - roxas) e de *Candida albicans* (B - verdes) obtidas a partir da mucosa orofaríngea de paciente que apresentou colonização mista.



**Figura 13.** Número de portadores do HIV e doentes com AIDS que tiveram sua mucosa oral colonizada/infectada, de modo simples ou em associação, pelas diferentes espécies de *Candida* sp. isoladas.

### 3.2.1.2. Pacientes colonizados por *C. dubliniensis*

**Paciente 1:** A primeira cepa identificada como *C. dubliniensis* foi à de número 08, isolada a partir da mucosa oral do paciente E.S.S., morador da zona rural da cidade de Engenheiro Schimidt - SP. O paciente, de 49 anos, mestiço, encontrava-se internado há 10 dias, no Setor de Doenças Infecção-parasitárias (DIP) do Hospital de Base e apresentava a doença AIDS manifesta. O diagnóstico positivo para o HIV foi realizado há quatro anos e o paciente não referiu a forma de contaminação. É usuário de prótese dentária e sua higiene bucal é insatisfatória. Apresentou episódios prévios de candidíase. Por sua vez, não é usuário de drogas injetáveis e não referiu uso abusivo de álcool. E.S.S. nunca esteve internado na UTI e foi classificado pela equipe médica, segundo os critérios do CDC,<sup>(134)</sup> na categoria clínica C2. Mostrou, em sua avaliação mais recente, valores de TCD4<sup>+</sup> de 256 U/mm<sup>3</sup> e TCD8<sup>+</sup> de 963 U/mm<sup>3</sup> além de contagem da carga viral de 61.458 cópias do HIV/mm<sup>3</sup>. Não foi observada referência ao uso de antibacterianos e antifúngicos no último ano anterior à coleta. Entretanto, o mesmo está sob terapia antiretroviral com Atazanavir<sup>®</sup> e Bivir<sup>®</sup>, nenhum desses pertencentes à classe de inibidores de proteases. Como comorbidade, o paciente apresentou histoplasmose. Em relação ao perfil de sensibilidade aos antifúngicos a cepa isolada desse paciente foi resistente apenas à anfotericina B (**Quadro 4**).

**Quadro 4.** variáveis demográficas e clínico-epidemiológicas dos três pacientes colonizados por *C. dubliniensis*

VARIÁVEIS	PACIENTE 1	PACIENTE 2	PACIENTE 3
Sexo	masculino	masculino	masculino
Idade	49	46	37
Etnia	mestiço	caucasóide	Caucasóide
Área de residência	zona rural	zona urbana	zona urbana
Usuário prótese dentária	sim	sim	Sim
Higiene bucal	escova e pasta dental	escova e pasta dental	escova e pasta dental
Freqüência higiene bucal	uma vez/dia	quatro vezes/dia	duas vezes/dia
Usuário drogas injetáveis	não	não	Não
Abuso de álcool	não	não	Sim
Episódio prévio de candidíase	já manifestou	já manifestou	já manifestou
comorbidades	histoplasmose, pneumonia	NC	hepatite C, valvulopatia, neoplasia bucal
Categoria clínica (CDC)	C2	A2	A3
T-CD4+	256	334	191
Carga Viral	61.458	indetectável	128.321
Antibioticoterapia*	não	não	Sim
Antifungicoterapia*	não	sim	Não
Terapia antiretroviral	sim	sim	Sim
contaminação pelo HIV	não referiu	relação heterossexual	relação heterossexual
Tempo diagnóstico	4 anos	6 anos	5 anos

\* Segundo pesquisa em prontuário do período de um ano anterior a coleta; NC= não consta no prontuário médico.

**Paciente 2:** A segunda amostra identificada como *C. dubliniensis* foi à de número 29, isolada a partir da mucosa oral do paciente A.M.F., morador da zona urbana da cidade de São José do Rio Preto. O paciente, de 46 anos, caucasóide, foi recrutado no ambulatório de DIP do Hospital de Base e é portador do vírus HIV. O diagnóstico positivo para esse vírus foi realizado há seis anos e o paciente referiu contaminação via relação sexual. É usuário de prótese dentária e realiza sua higiene bucal de maneira satisfatória. Por sua vez, não é usuário de drogas injetáveis nem faz uso abusivo de álcool. Ademais, não constava em seu prontuário registro de episódios de candidíase orofaríngea ou internação prévia em UTI. Foi classificado pela equipe médica, durante a avaliação mais recente, na categoria clínica A2. A contagem de linfócitos TCD4+ foi de 334 U/mm<sup>3</sup>, de linfócitos TCD8+ de 1496 U/mm<sup>3</sup> e a contagem da carga viral, indetectável. No último ano, não fez uso de antibiótico, entretanto, utilizou fluconazol. Quanto à terapia antiretroviral, faz uso das drogas Kaletra<sup>®</sup> e Biovir<sup>®</sup> há um ano, sendo a primeira um inibidor de proteases. Ainda, nenhuma comorbidade foi verificada em seu prontuário. Em relação ao perfil de sensibilidade antifúngica, a cepa isolada desse paciente foi sensível a todos os antifúngicos testados (**Quadro 4**).

**Paciente 3:** Por fim, a terceira amostra de *C. dubliniensis* foi à de número 60, isolada a partir do paciente M.V., morador da zona urbana da cidade de São Paulo, Vila de Guaianazes. O paciente, de 37 anos, caucasóide, doente com AIDS manifesta, foi convidado a participar do estudo no décimo quarto dia de internação no setor de DIP do Hospital de



Base. O diagnóstico do HIV foi realizado há cinco anos e a via de contaminação foi a relação sexual. É usuário de prótese dentária e realiza sua higiene bucal de maneira insatisfatória, Não é usuário de drogas injetáveis, entretanto relatou fazer uso abusivo de álcool. Já apresentou episódios de candidíase, e nunca precisou de internação na UTI. Foi classificado pela equipe médica na categoria clínica A3, com níveis de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e linfócitos TCD8<sup>+</sup> de 191 U/mm<sup>3</sup> e de 2000 U/mm<sup>3</sup>, respectivamente. A última contagem de cópias do HIV/mm<sup>3</sup> obtida em seu prontuário foi de 128.321 cópias/mm<sup>3</sup>. Foi o único dentre os indivíduos colonizados por *C. dubliniensis* a fazer uso de antibacterianos de amplo espectro nos últimos 12 meses antes da coleta (Caritromicina e Sulfametoxazol + trimetopin). Entretanto, não utilizou antifúngico nesse mesmo período. Já em relação à terapia antiretroviral, faz uso de Nevirapina<sup>®</sup> e Biovir<sup>®</sup> há quase um ano, nenhum desses pertencentes à classe de inibidores de proteases. Como comorbidades, apresentou hepatite C, valvuloplastia e neoplasia de boca. Já frente aos testes de sensibilidade, a cepa isolada desse paciente foi sensível a todos os antifúngicos testados (**Quadro 4**).

### 3.2.2. Grupo Controle

Em se tratando dos indivíduos saudáveis, que compõem o grupo controle, foram obtidas doze cepas de *Candida* sp., todas como colonização única. Nenhum desses indivíduos apresentou, até a inclusão

neste estudo, sinais de candidíase orofaríngea. Dentre esses, a maioria (55,55%) é do sexo masculino, com média de idade de 42,77 anos, variando de 23 a 64 anos ( $\sigma = 13,98$ ).

Cinquenta e cinco por cento dos indivíduos saudáveis cuja cultura de *Candida* sp. foi positiva, faz uso de algum tipo de prótese dentária (ponte móvel e/ou fixa, dentadura) e a maioria (66,66%) realiza sua higiene bucal de maneira satisfatória (3 vezes por dia).

Nenhum desses pacientes necessitou de internação em UTI ou fez uso de antibacterianos e antifúngicos nos últimos 12 meses. Também não referiram uso de álcool ou drogas. Dois desses voluntários (22,22%) são diabéticos.

Por fim, após a execução dos testes de identificação, todas as leveduras isoladas a partir dos mesmos foram identificadas como *C. albicans* (**Quadro 5**).

### **3.2.3. Comparação entre colonização/infecção nos portadores do HIV e doentes com AIDS manifesta e grupo controle**

A prevalência de *Candida* sp. foi maior nos pacientes do que nos indivíduos do grupo controle (valor  $p < 0,005$ ). Assim, em relação às espécies de *Candida*, os pacientes também são colonizados em maior frequência por *C. albicans* (valor  $p < 0,005$ ), por *C. tropicalis* (valor  $p < 0,005$ ), por *C. glabrata* (valor  $p < 0,001$ ) e também por *C. dubliniensis* (valor  $p = 0,074$ ), que os indivíduos controle. Em adição, os pacientes com AIDS



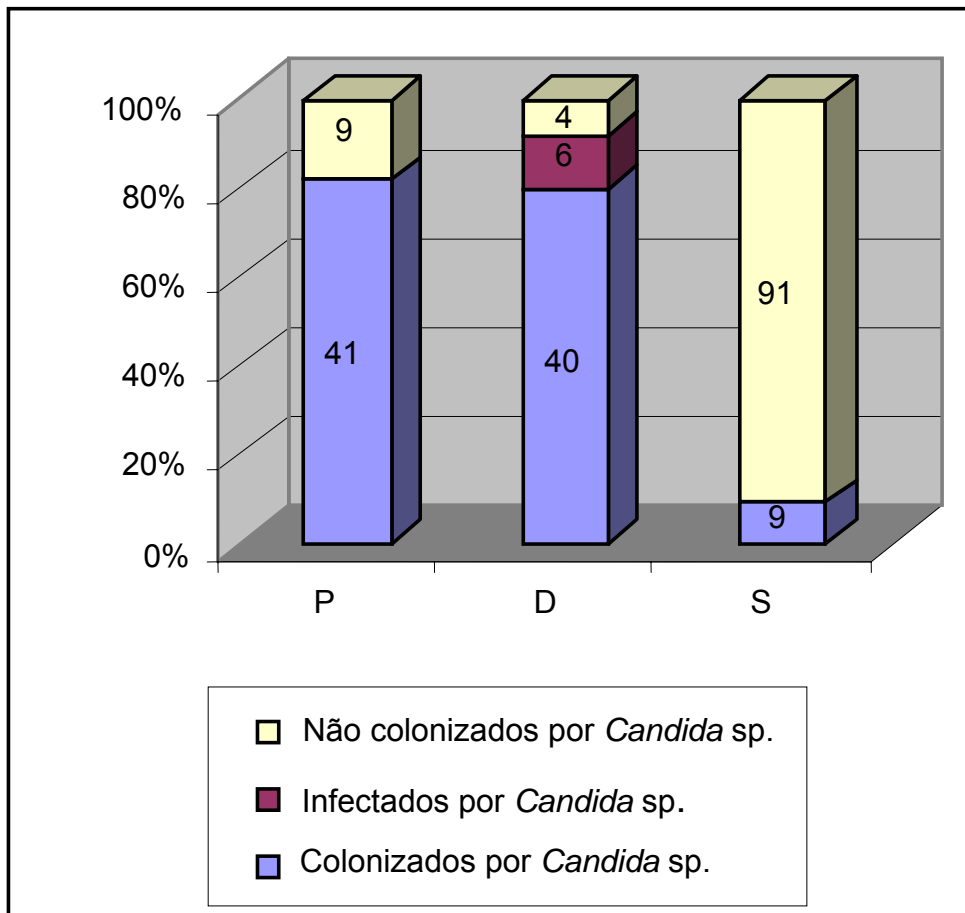
manifesta apresentaram maior prevalência de colonização por *C. tropicalis* que os portadores do HIV (valor  $p = 0,037$ ).

O grupo de doentes de AIDS apresentou colonização/infecção preferencial por *Candida* “não-albicans” (34%) quando comparado ao grupo de portadores do HIV (22%), revelando um valor  $p = 0,0328$ . Nenhum dos indivíduos do grupo controle apresentou colonização por *Candida* “não-albicans”. Por essa razão, foi evidenciada uma colonização preferencial por *Candida* “não-albicans” nos pacientes (tanto nos portadores quanto nos doentes) quando comparados aos indivíduos saudáveis (valor  $p < 0,005$ ). Do mesmo modo, foi verificada uma maior prevalência de candidíase orofaríngea nos indivíduos com AIDS manifesta do que naqueles saudáveis (valor  $p = 0,0025$ ). A comparação entre a prevalência de colonização e infecção por *Candida* sp. nos doentes e nos indivíduos saudáveis está apresentada na **Figura 14**.

### **3.3. Perfil de sensibilidade antifúngica dos isolados às seguintes drogas: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol**

#### **3.3.1. Difusão em Disco**

Por meio do teste de difusão em disco as cepas isoladas tiveram seu perfil de sensibilidade antifúngica avaliado frente às seguintes drogas: fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B.



**Figura 14.** Prevalência de colonização e infecção por *Candida* sp. nos portadores do HIV (P), nos doentes com AIDS (D) e nos indivíduos saudáveis (S).

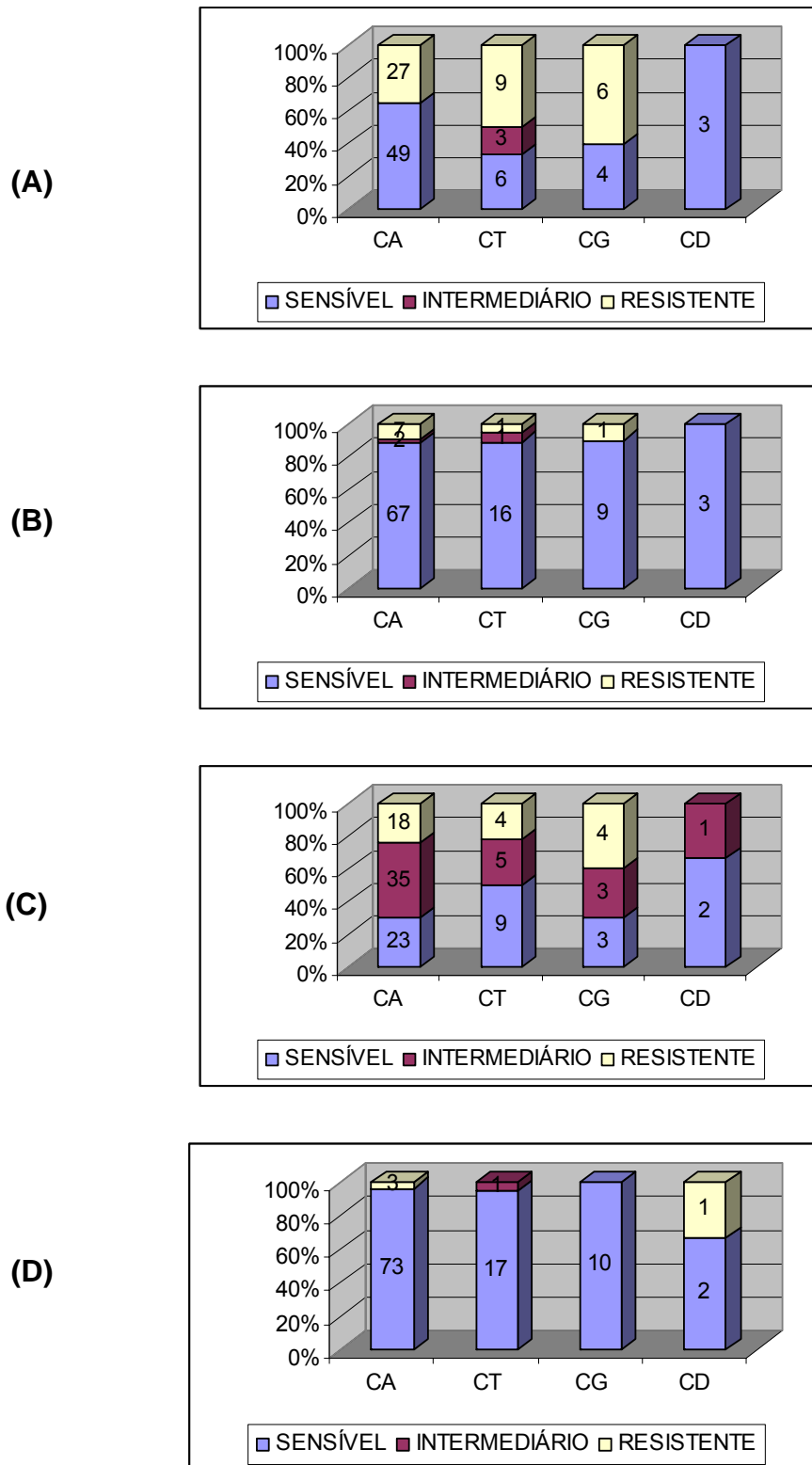
### 3.3.1.1. Pacientes

Após o teste de sensibilidade antifúngica por disco difusão, foi possível determinar que dentre as cepas de *C. albicans* isoladas, 35,5% foi resistente ao fluconazol, 23% ao itraconazol, 9% ao cetoconazol e 4% à anfotericina-B.

Dentre as 18 cepas de *C. tropicalis* isoladas, metade foi resistente ao fluconazol, 23% ao itraconazol, e uma única cepa (5,5%) ao cetoconazol. Esse último resultado repetiu-se para a anfotericina-B (**Figura 15**).

Já em relação às três amostras de *C. dubliniensis*, uma única cepa (33,33%) foi resistente ao fluconazol e sensível aos demais antifúngicos testados. As outras duas cepas foram sensíveis a todas as drogas testadas (**Figura 15**).

Por fim, das 10 cepas de *C. glabrata* isoladas, 60% mostrou resistência ao fluconazol, 40% ao itraconazol e apenas uma (10%) ao cetoconazol. Todas foram sensíveis à anfotericina-B (**Figura 15**).



**Figura 15)** Perfil de sensibilidade das cepas de *C. albicans* (CA), *C. tropicalis* (CT), *C. glabrata* (CG) e *C. dubliniensis* (CD) frente aos antifúngicos fluconazol (A), itraconazol (B), cetoconazol (C) e anfotericina B (D).

### **3.3.1.2. Grupo Controle**

A avaliação da sensibilidade antifúngica, por meio de difusão em disco, revelou que a totalidade das cepas isoladas a partir dos pacientes saudáveis é sensível a todos os antifúngicos testados.

### **3.3.1.3. Comparação entre os perfis de sensibilidade antifúngica dos grupos estudados**

Apesar de haverem diferenças significativas em relação ao perfil de sensibilidade antifúngica das cepas isoladas nos indivíduos saudáveis (100% das cepas foram sensíveis a todos os antifúngicos testados) e nos pacientes (de 4 a 35,5% das cepas foram resistentes a pelo menos um antifúngico) foram determinadas diferenças significantes somente em relação ao fluconazol (valor  $p = 0,0039$ ). Isto é, não foi possível demonstrar que as cepas isoladas nos pacientes são mais resistentes aos antifúngicos itraconazol (valor  $p = 0,06$ ), cetoconazol (valor  $p = 0,50$ ) e anfotericina B (valor  $p = 0,98$ ).

### **3.3.2. Microdiluição**

O teste de sensibilidade antifúngica ao fluconazol, através da metodologia da microdiluição, foi realizado em 71 cepas de *C. albicans* e em três de *C. dubliniensis*, todas isoladas a partir da mucosa oral dos pacientes. Oito cepas de *C. albicans* isoladas a partir dos indivíduos saudáveis também foram testadas. Cinco cepas de *C. albicans* isoladas a



partir dos pacientes e uma isolada em indivíduos do grupo controle não puderam ser repicadas, e portanto, não foram testadas.

### 3.3.2.1. Pacientes

A **Tabela 1** mostra os resultados obtidos após o teste de sensibilidade antifúngica, onde as cepas de *C. albicans* isoladas a partir da mucosa oral dos pacientes evidenciaram perfis de sensibilidade cuja concentração inibitória mínima (CIM) variou de de 0,25 a > 65 µg/mL. A concentração de 0,25µg/mL foi capaz de inibir a maioria das cepas (54,54%), seguida das concentrações 0,5µg/mL(15,6%), 1,0µg/mL (7,8%), 64µg/mL (7,8%), 2,0µg/mL (6,5%), 16,0µg/mL (3,9%), 4µg/mL (1,3%) e 8µg/mL (1,3%).

Já as CIMs necessárias para inibição do crescimento das cepas de *Candida dubliniensis* foram de 0,5 a 4,0µg/mL. Menores, portanto, que aquelas obtidas para *C. albicans* (**Tabela 1**).

Dessa maneira, aproximadamente 10% das cepas de *C. albicans* foi resistente ao fluconazol enquanto que 3,89% foi sensível dependendo da dose. Já em relação às cepas de *C. dubliniensis*, todas foram sensíveis.

A concentração inibitória mínima para 50% das cepas (CIM<sub>50</sub>) de *C. albicans* foi de 0,25 µg/mL enquanto que a concentração inibitória mínima para 90% das cepas (CIM<sub>90</sub>) foi de 16,00 µg/mL. Já para as cepas de *C. dubliniensis* os valores de CIM<sub>50</sub> de CIM<sub>90</sub> foram, respectivamente, de 1,00 µg/mL e 4,00 µg/mL.

**Tabela 1.** Suscetibilidade de *C. albicans* e *Candida dubliniensis* a ação fungistática do fluconazol, expressa por meio da CIM.

Onde : \* cepas sensíveis, \*\* cepas sensível dependendo da dose, \*\*\* cepas resistentes.

Espécie	Fluconazol								
	nº. e % de cepas sensíveis à concentração de (µg/mL)								
CIM	0.25*	0.5*	1*	2*	4*	8*	16**	64***	> 64***
<i>C. albicans</i> (n=77)	42 (54.5%)	12 (15.6%)	6 (7.8%)	5 (6.5%)	1 (1.3%)	1 (1.3%)	3 (3.9%)	6 (7.8%)	1 (1.3%)
<i>C. dubliniensis</i> (n=03)	0	1 (33.33%)	1 (33.33%)	0	1 (33.33%)	0	0	0	0

### 3.3.2.2. Grupo Controle

A totalidade das cepas de *C. albicans* isoladas a partir da mucosa oral dos indivíduos saudáveis evidenciaram perfis de sensibilidade cuja concentração inibitória mínima (CIM) foi de 0,25µg/mL. Portanto, as mesmas são sensíveis ao fluconazol.

### 3.3.2.3. Comparação entre sensibilidade antifúngica das cepas isoladas nos grupos estudados

Os resultados obtidos pelo método da disco difusão não permitiram a determinação de diferenças significantes em relação à sensibilidade antifúngica das cepas isoladas nos pacientes e no grupo controle. Entretanto, o método da microdiluição mostrou que cepas isoladas a partir da mucosa oral dos indivíduos saudáveis são mais sensíveis ao fluconazol

do que aquelas isoladas a partir da mucosa oral dos pacientes (valor  $p=0,006$ ).

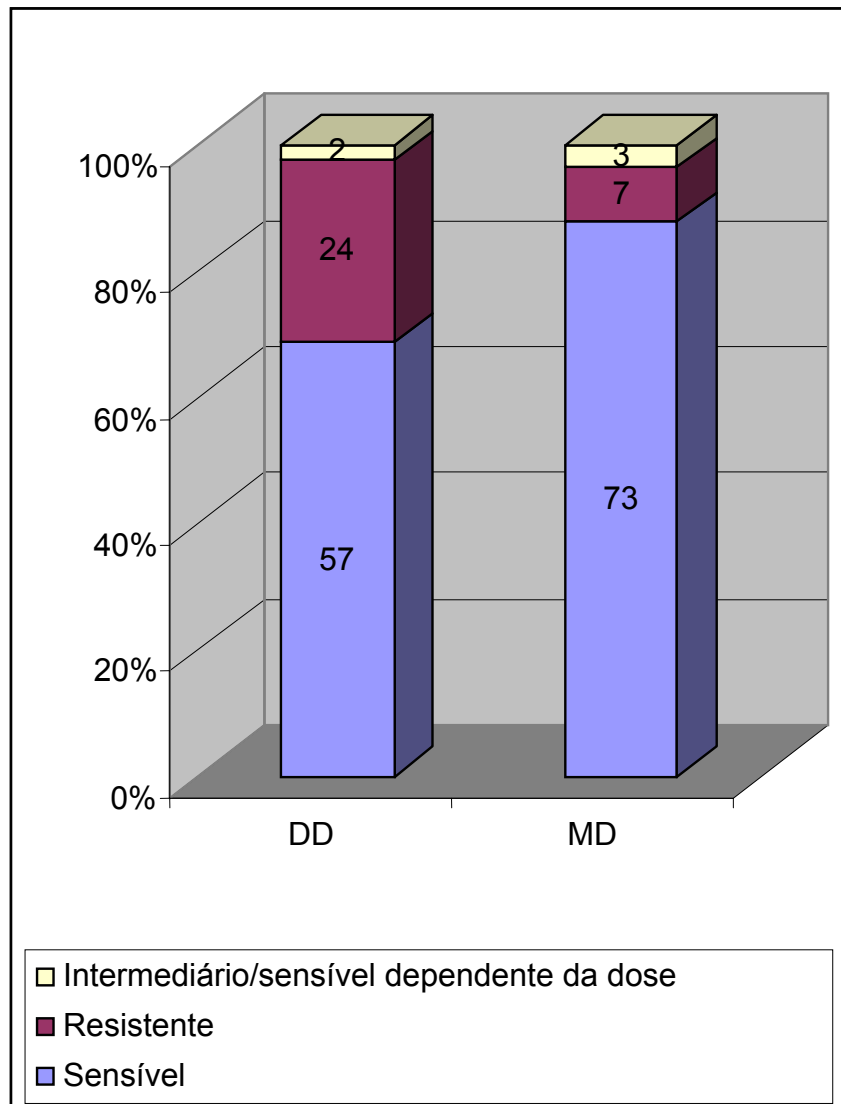
### **3.3.3. Comparação entre os métodos de Difusão em Disco e Microdiluição**

A comparação entre os métodos de determinação do perfil de sensibilidade aos antifúngicos testados permitiu a constatação de que 73,5% das cepas avaliadas apresentaram o mesmo resultado em ambos. A totalidade das cepas isoladas de indivíduos saudáveis ( $n=8$ ) teve o mesmo resultado em ambos os testes. Por outro lado, a concordância entre os mesmos para as cepas de *C.albicans* isoladas dos pacientes foi verificada em aproximadamente metade (55,84%). Apenas uma cepa de *C.dublinsiensis* apresentou o mesmo resultado em ambos os testes (**Quadro 6, Figura 16**).

Dados os resultados discordantes, foram efetuados os cálculos dos parâmetros de sensibilidade, especificidade e eficácia do método da difusão em disco, considerando-se o método da microdiluição como “gold standard”. Além disso, a fim de se avaliar o grau de discordância entre esses testes calculou-se o valor  $p$  para os pares discordantes (**Tabela 2**).

**Quadro 6.** Resultados dos testes Disco Difusão (DD) e de Microdiluição (MD) das amostras de *C. albicans* e de *C. dubliniensis*

AMOSTRA	DD	MD	AMOSTRA	DD	MD
02P	S	S	70P	S	S
03P	S	S	71P	R	S
04P	R	S	73P	R	S
05P	I	SDD	74P	S	S
06P	S	S	75P	S	S
07P	I	SDD	76P	S	S
10P	S	R	77P	S	S
12P	S	S	79P	S	S
13P	S	S	80P	R	S
14P	S	S	81P	S	S
17P	S	S	82P	S	S
18P	S	S	83P	S	S
19P	S	S	85P	S	S
20P	S	R	86P	R	S
21P	S	S	87P	S	S
22P	R	S	89P	S	S
27P	R	S	90P	S	S
28P	S	S	92P	S	S
31P	S	S	95P	S	R
32P	R	R	96P	S	S
33P	R	S	97P	S	S
34P	R	S	98P	S	S
36P	R	S	99P	R	SDD
37P	R	S	100P	S	S
40P	R	R	101P	R	S
41P	S	S	102P	R	S
42P	R	S	103P	R	S
43P	S	S	08P	R	S
46P	S	S	29P	S	S
47P	R	R	60P	S	S
48P	S	S	03C	S	S
50P	R	S	07C	S	S
52P	R	S	09C	S	S
55P	S	S	14C	S	S
56P	S	S	16C	S	S
58P	S	S	24C	S	S
63P	R	R	32C	S	S
64P	S	S	57C	S	S
65P	S	S	60C	S	S
66P	S	S	72C	S	S
69P	R	S	78C	S	S
			99C	S	S



**Figura 16.** Perfil de sensibilidade antifúngica das cepas avaliadas por disco difusão (DD) e por microdiluição (MD).

**Tabela 2.** Porcentagem de sensibilidade, especificidade, eficácia e valor p do método de disco difusão

PARÂMETROS	DISCO DIFUSÃO
<b>SENSIBILIDADE (%)</b>	75
<b>ESPECIFICIDADE (%)</b>	62,5
<b>EFICÁCIA (%)</b>	65
<b>valor p</b>	0,0014

### 3.4. *Candida* sp. versus aspectos clínico-epidemiológicos

As variáveis clínico-epidemiológicas estudadas foram consideradas quanto à sua possível associação como fatores de risco para a colonização e/ou infecção por *Candida* sp. bem como para a modulação de seu perfil de sensibilidade antifúngica.

Quanto aos parâmetros idade, sexo, tempo de internação ou internação prévia em UTI não foi possível correlacioná-los com a frequência de colonização e/ou infecção por *Candida* sp.

Do mesmo modo, a avaliação do isolamento preferencial dessa levedura frente as diferentes etnias representadas neste estudo não foi significativa (valor  $p= 0,6203$ ). A porcentagem de colonização/infecção por *Candida* sp. nas diferentes etnias que compõem o grupo paciente foi a seguinte: 100% de colonização/infecção nos pacientes orientais, seguidos de 95,45% nos mestiços, 84,61% nos negróides e, por fim, 84,37% nos indivíduos caucasóides.

Novamente, não foi evidenciado aumento na frequência de isolamento de cepas de *Candida* sp. nos pacientes que referiram uso abusivo de álcool (valor  $p = 0,6869$ ). Contudo, nesse mesmo grupo, há uma tendência à colonização preferencial por *Candida tropicalis* (valor  $p = 0,094$ ). Além disso, foi observado isolamento preferencial de *Candida albicans* nos indivíduos que fazem uso de prótese dentária e naqueles diabéticos (valor  $p = 0,003$ ).

Foi possível obter ainda uma relação positiva entre colonização por *Candida* sp. e a carga viral e outra negativa entre colonização e contagem de células TCD4<sup>+</sup>. A contagem de cópias do HIV/mm<sup>3</sup> foi maior no grupo colonizado por *C. albicans* (valor p= 0,046) e por *C. tropicalis* (valor p= 0,0065) e, ainda, nos pacientes colonizados por *Candida* “não-albicans” (valor p= 0,036). Por sua vez, a contagem de células TCD4<sup>+</sup> foi menor nos pacientes colonizados por *Candida* sp. (valor p= 0,0181) e ainda quando consideradas as espécies *C. albicans* (valor p= 0,0174) e *C. tropicalis* (valor p= 0,0207).

Em relação à viremia, há evidências de que a carga viral seja mais elevada nos pacientes que apresentaram colonização/infecção por *Candida tropicalis* (valor p= 0,084) e *Candida glabrata* (valor p =0,036) ou ainda pelas leveduras denominadas “não-albicans” (valor p= 0,027).

Além disso, quando comparado o grupo de pacientes portadores do HIV e o grupo de doentes com AIDS foi observado que a maioria dos que apresentou colonização/infecção, tanto mista (68,42%) quanto por espécies “não-albicans” (65,51%), pertencia ao segundo grupo. Entretanto, não foram observadas diferenças significantes que comprovem que os doentes com AIDS manifesta têm maiores chances de apresentar tanto colonização/infecção mista (valor p= 0,1266) quanto por espécies “não-albicans” (valor p= 0,1262).

Quando considerado o uso de antiretrovirais como um todo, não foi evidenciada associação significativa quanto aos parâmetros colonização/infecção ou ocorrência de *Candida* “não-albicans”.

---

Interessantemente, naqueles pacientes sob uso de antiretrovirais da classe dos inibidores de proteases (IPs) foi detectado isolamento preferencial de uma única espécie, sendo essa *C. albicans*, em detrimento das demais (valor  $p= 0,0269$ ). Isso porque dentre os 19 pacientes que apresentaram colonização/infecção mista, e que fazem uso dessa terapia, apenas três (15,78%) apresentaram colonização mista. O mesmo resultado foi obtido quanto ao isolamento de espécies “não-*albicans*” já que apenas 30% dos pacientes que apresentaram colonização/infecção por espécies “não-*albicans*”, esteve sob uso IPs (valor  $p= 0,0269$ ).

No entanto, foram observadas diferenças importantes quanto à prevalência das diferentes espécies de *Candida* isoladas a partir da cavidade oral dos pacientes segundo a prescrição prévia de terapia medicamentosa (**Tabela 3**).

Em relação ao uso prévio de antifúngicos, 32 pacientes foram submetidos à terapia antifúngica até um ano antes da coleta do material. A partir das amostras coletadas dos mesmos foi possível isolar 39 cepas de *Candida* sp.. Já as amostras provenientes de 58 pacientes que receberam terapia antimicrobiana de amplo espectro, no mesmo período, permitiram o isolamento de 68 cepas de *Candida* sp. Em adição, dos 32 pacientes que estavam sob terapia antiretroviral com inibidores de proteases foi possível isolar 31 cepas, sendo que em quatro desses não houve crescimento fúngico algum.



**Tabela 3:** Número de cepas das diferentes espécies de *Candida* sp. isoladas a partir da cavidade oral dos pacientes soropositivos para o HIV de acordo com o uso prévio de terapia antiretroviral, antifúngica e antibacteriana

TERAPIA	SOB TERAPIA	Nº pacientes	Cepas	ESPÉCIE			
				<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
				n=3	n= 76	n=18	n=10
Antiretroviral	sim	90	93	3	66	14	9
	não	10	14	0	10	4	1
	Inibidor de proteases	33	29	1	20	3	5
	Não inibidor de proteases	67	78	2	56	15	5
Antifúngica	sim	32	39	1	25	10	3
	não	68	68	2	51	8	7
	Azóis	18	22	1	13	7	1
	Não azóis	82	85	2	63	3	9
Antibacteriana	sim	60	70	1	48	14	7
	não	40	37	2	63	3	9
	Ampla espectro	58	68	1	46	14	7
	Não ampla espectro	42	39	2	30	4	3

Assim, neste estudo, o uso prévio de antifúngicos favoreceu a colonização/infecção por *C. tropicalis* (valor  $p= 0,018$ ), contudo o mesmo não foi observado em relação à *Candida albicans* (valor  $p= 0,705$ ), *Candida glabrata* (valor  $p= 0,886$ ) ou mesmo no grupo *Candida* “não-albicans” (valor  $p= 0,105$ ).

Dentre os antifúngicos, a classe que mais favoreceu a colonização/infecção por *C. tropicalis* foram os azóis (valor  $p= 0,011$ ). Contudo, o mesmo não ocorreu em relação à *Candida albicans* (valor  $p= 0,888$ ) e *Candida glabrata* (valor  $p= 0,488$ ). Adicionalmente, parece haver uma tendência para o favorecimento da colonização por espécies “não-albicans” (valor  $p= 0,080$ ) entre os indivíduos em terapia por azóis.

As cepas obtidas a partir da maioria dos pacientes que não fizeram uso prévio de antifúngicos, quando comparadas àquelas isoladas dos pacientes que fizeram uso dessa terapia, foram mais sensíveis a essa classe de medicamentos (valor  $p= 0,015$ ). Em se tratando de ausência de tratamento com antifúngicos, o mesmo pode ser afirmado em relação aos azóis (fluconazol - valor  $p<0,0005$ ; cetoconazol - valor  $p= 0,011$ ; itraconazol - valor  $p= 0,015$ ).

Em adição, não foi evidenciado que o uso abusivo de álcool favoreça a colonização/infecção de espécies resistentes aos antifúngicos testados (valor  $p>0,05$ ).

Na **Tabela 4**, estão relacionados o uso prévio de medicamentos e a porcentagem de cepas resistentes aos antifúngicos, obtidas a partir da mucosa oral da população estudada.

**Tabela 4.** Distribuição das espécies de *Candida* sp. e perfil de sensibilidade aos antifúngicos avaliados, de acordo a história medicamentosa pregressa.

MEDICAMENTO	SOB TERAPIA/ TIPO	CEPAS RESISTÊNTES AOS ANTIFÚNGICOS				
		Cepas n=107	Fluco (%)	Itra (%)	Anfo-B (%)	Ceto (%)
Antiretrovirais	sim	93	41,9	25,8	4,3	8,6
	não	14	28,6	14,3	-	7,1
	Inibidores de proteases	31	34,5	20,7	-	10,3
	Não Inibidores de proteases	78	42,3	25,6	5,1	7,7
Antifúngicos	sim	39	35,9	20,5	-	7,7
	não	68	42,6	30,9	5,9	8,8
	Azóis	22	31,8	27,3	-	4,5
	Não azóis	85	41,2	23,5	4,7	9,4
Antibacterianos	sim	68	35,7	24,3	1,4	5,7
	não	37	48,6	24,3	8,1	13,5
	Ampla espectro	68	33,8	23,5	1,5	5,9
	Não ampla espectro	39	51,3	25,6	7,7	12,8
<b>Total</b>	107		40,2	24,3	3,7	8,4

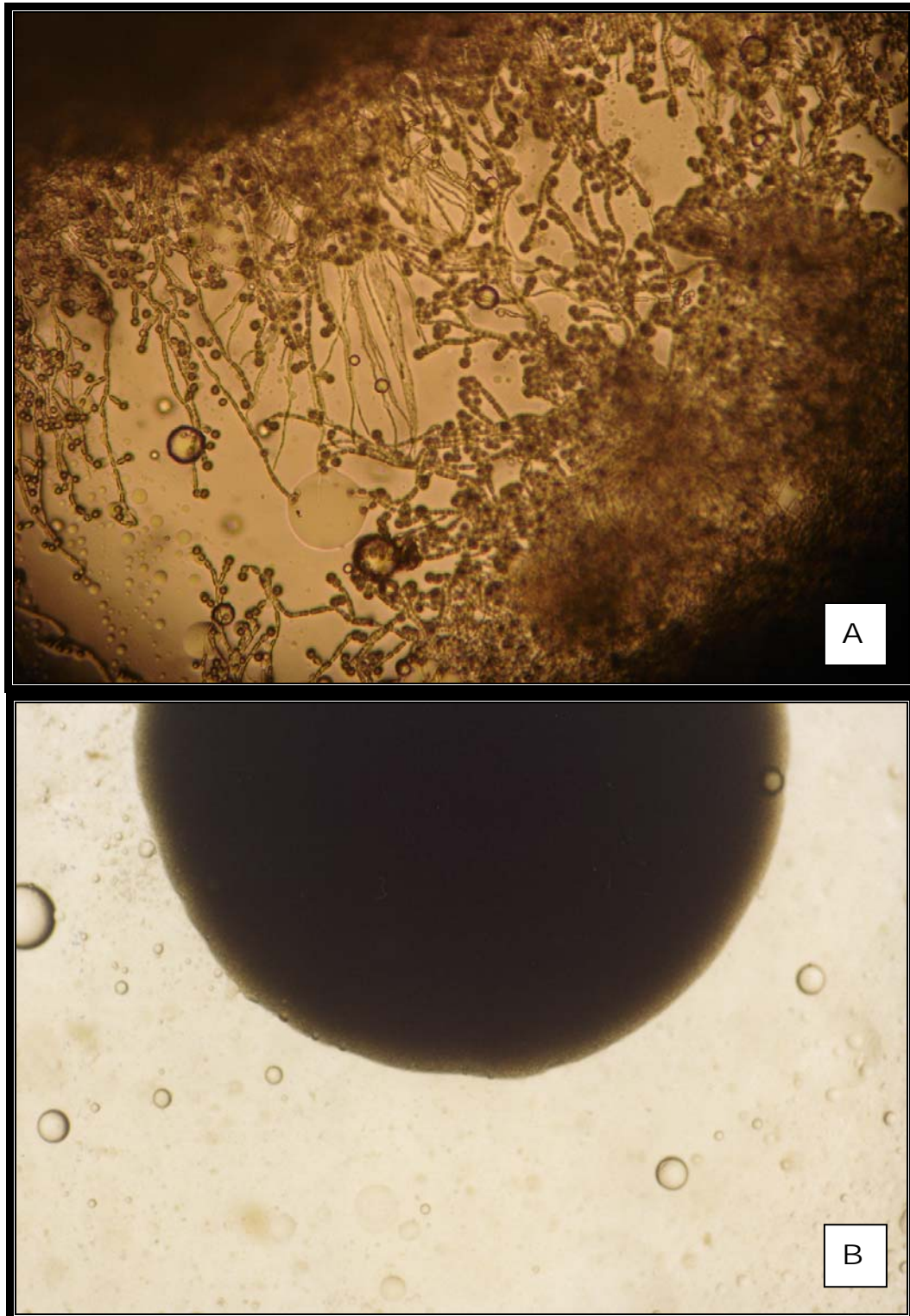
Onde: Fluco= fluconazol; Itra= itraconazol; Anfo-B= anfotericina-B; Ceto= cetoconazol

### 3.5. Avaliação da metodologia de triagem fenotípica de *Candida*

#### *dubliniensis*

O teste de formação de franjas de hifas em agar Niger (**Figura 17**) foi considerado “gold standard” para cálculo dos parâmetros de sensibilidade, especificidade e eficácia dos demais métodos de triagem fenotípica para *C. dubliniensis*: microcultivo (**Figura 18**), coloração em CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> (**Figura 19**), tolerância à temperatura de 42°C e 45°C, formação de halo de opacidade em agar com Tween 80 (**Figura 20**), tolerância ao agar Sabouraud hipertônico (NaCl 6,5%), formação de franjas de hifas em agar Girassol, e auxanograma com xilose e  $\alpha$ -metil-D-glucopiranoside.

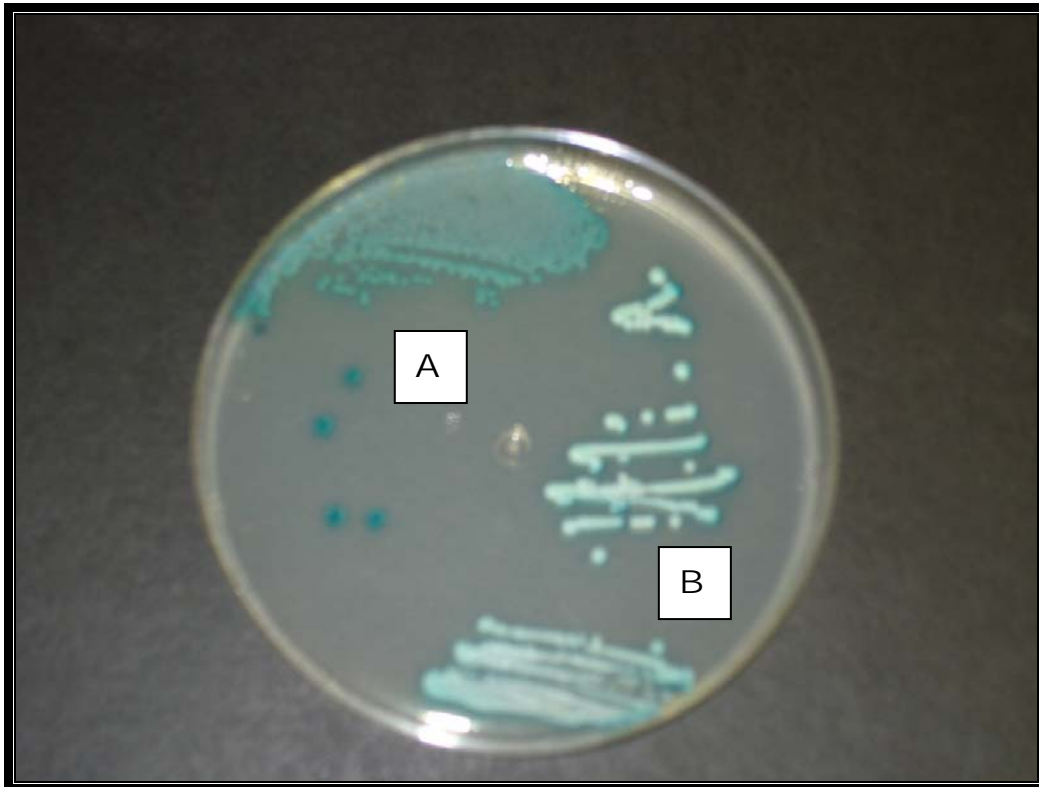
Os testes de maior sensibilidade foram o de formação de franjas de hifas em agar girassol, o auxanograma com xilose e  $\alpha$ -metil-D-glucopiranoside, a coloração em CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> e o microcultivo (100%) seguidos pelo teste de opacificação em agar com Tween 80 (50%), tolerância ao agar Sabouraud hipertônico e teste de tolerância à temperatura de 42°C (33,33%). Por fim, o teste de tolerância à temperatura de 45°C apresentou 0% de sensibilidade. Em relação à especificidade, os melhores testes foram o de formação de franjas de hifas em agar girassol e o auxanograma (100%) seguidos pelos testes de tolerância à temperatura de 42°C (90%), microcultivo (93,75%), coloração em CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> (86,25%), tolerância à temperatura de 45°C (76,25%), formação do halo de opacificação em agar com Tween 80 (72%) e, ainda, tolerância ao agar Sabouraud hipertônico (38,75%).



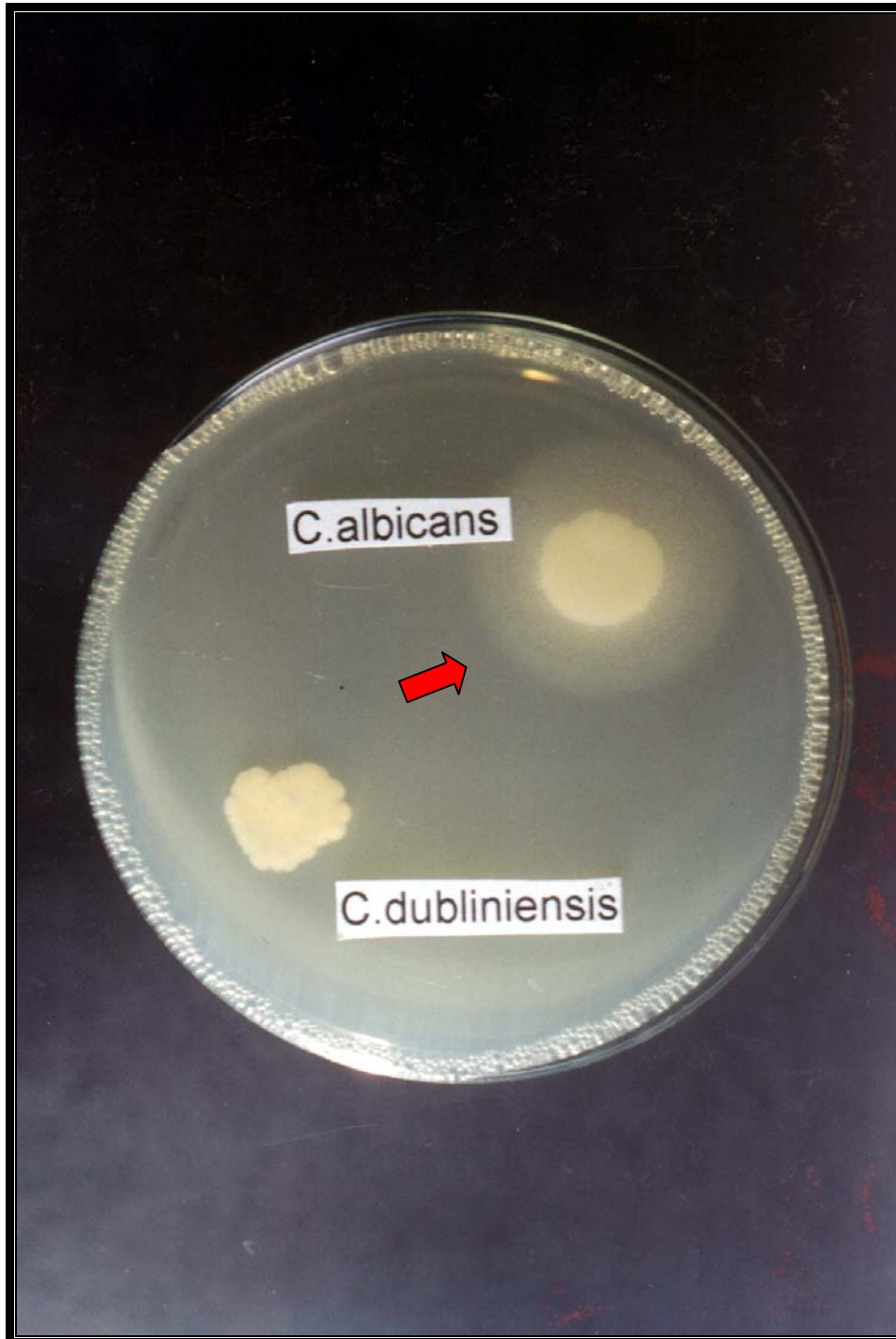
**Figura 17.** Aspecto microscópico das culturas em agar Niger de *Candida dubliniensis* (A) evidenciando bordas rugosas e *Candida albicans* (B), evidenciando bordas lisas (100X).



**Figura 18.** Aspecto micromorfológico de *Candida dubliniensis* (A) e de *Candida albicans* (B) em agar fubá com Tween 80 (microcultivo) evidenciando clamidósporos em “triplets” (seta vermelha) e clamidósporos únicos (setas pretas).



**Figura 19.** Placa de Petri com meio CHROMagar Candida® evidenciando a coloração das colônias de *C. dubliniensis* (A – verdes escuras) e de *Candida albicans* (B – verdes mais claras).



**Figura 20.** Cultura de *Candida dubliniensis* e de *Candida albicans* em placa de Petri com agar com Tween 80, mostrando halo de opacidade (seta).



Por sua vez, os testes mais eficientes foram o de formação de franjas de hifas em agar Girassol, o auxanograma, a coloração em CHROMagar Candida<sup>®</sup> e o microcultivo (84%) seguidos pelos testes de tolerância à temperatura de 42°C e ao agar Sabouraud hipertônico (81,33%), a tolerância à temperatura de 45°C (80%) e a formação do halo de opacificação em agar com Tween 80 (76,5%) (**Tabela 5**).

Adicionalmente, com o objetivo de avaliar grau de discordância entre os testes, foram calculados os valores de p para os pares discordantes (Falsos Positivos e Falsos Negativos) nos testes fenotípicos realizados (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Porcentagem de sensibilidade, especificidade, eficácia e valores de p para os pares discordantes dos métodos de triagem fenotípica para *C. dubliniensis* em comparação com o teste de formação de franjas de hifas em agar Niger (“gold standard”).

MÉTODO DE TRIAGEM FENOTÍPICA	SENSIBILIDADE (%)	ESPECIFICIDADE (%)	EFICÁCIA (%)	valor p
Auxanograma com xilose e $\alpha$ -metil-D-glucopiranosido/ Formação de franjas de hifas em agar Girassol	100	100	84	< 0,5
CHROMagar Candida®	100	86,25	84	0,0736
Microcultivo	100	93,75	84	0,0026
Teste de opacificação em meio com Tween 80	50	72	76,5	0,0002
Teste de tolerância à temperatura de 45°C	0	76,25	80	0,0014
Teste de tolerância à temperatura de 42°C	33,33	90	81,33	0,1824
Teste de tolerância ao agar Sabouraud hipertônico (NaCl 6,5%)	33,33	38,75	81,33	0,0000

## **4. DISCUSSÃO**

---

#### 4. DISCUSSÃO

É fato conhecido que as espécies de *Candida* sp. são amplamente difundidas geograficamente, <sup>(4)</sup> e há considerável informação sobre a colonização/infecção por essas leveduras em pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS. <sup>(4, 50, 134, 135, 136)</sup> Contudo, apenas alguns consideraram as possíveis variáveis epidemiológicas associadas à presença das mesmas, além da análise de seu perfil de sensibilidade antifúngica e bem poucos trataram da emergência de *C. dubliniensis* no nosso país. <sup>(19, 54, 81, 137,138)</sup>

Neste estudo, foi pesquisada a prevalência das espécies de *Candida* sp. isoladas a partir da mucosa oral de pacientes soropositivos para o HIV e de seu grupo controle, com ênfase na triagem fenotípica de *Candida dubliniensis*. Foram investigadas ainda as possíveis variáveis epidemiológicas associadas à presença dessas leveduras na população em estudo, bem como o perfil de sensibilidade antifúngica das cepas isoladas. De acordo com o extenso levantamento bibliográfico realizado, este é um estudo inédito na região Noroeste Paulista.

No Brasil, a AIDS é considerada sub-epidemia tendo atingido de forma intensa, no início da década de 80, os indivíduos que receberam transfusão de sangue e hemoderivados, usuários de drogas injetáveis e homossexuais masculinos. Mais recentemente, a incidência da doença mantém-se, ainda, em patamares elevados (19,2 casos ‰ habitantes), basicamente devido à persistência da tendência de crescimento entre as mulheres. <sup>(1)</sup>

Dados nacionais mostram também um declínio no número de pacientes portadores de AIDS na faixa etária entre 13 e 29 anos, em ambos os sexos,

---

acompanhado do crescimento nas faixas posteriores, principalmente entre 40 e 59 anos. Observou-se, também, para o sexo masculino, estabilidade na proporção de casos devido ao aumento da transmissão homo/bissexual e elevação da proporção heterossexual, compensando a redução importante e persistente dos casos em usuários de drogas injetáveis. Já entre as mulheres, foi observada, após 1998, uma tendência à estabilidade na faixa entre 13 a 24 anos, com constante crescimento nas demais faixas etárias. <sup>(1)</sup>

Quando considerado o fator etnia, novamente são obtidos números crescentes, de modo constante, na incidência de AIDS nas categorias de raça/cor “preta” e “parda”, em ambos os sexos, entre 1998 e 2004. <sup>(1)</sup>

Desse modo, a população soropositiva para o HIV e de portadores de AIDS aqui reportada pode ser considerada representativa dos pacientes que residem em outras áreas do Brasil uma vez que a mesma refletiu todos os principais parâmetros demográficos nacionais, bem como americanos e europeus. <sup>(139, 140)</sup>

Apesar do fato da maioria dos pacientes aqui recrutados pertencer à etnia caucasóide, a prevalência de mestiços e de negróides verificada segue o perfil crescente de contaminação nos mesmos, quando comparada aos números da década de 80, quando a prevalência de casos de AIDS nesses grupamentos era menor que 10% do total de indivíduos infectados. <sup>(10)</sup>

Neste trabalho, o grupo controle foi recrutado por pareamento entre sexo, idade e etnia dos pacientes. Assim, os grupos estudados apresentaram alto grau de associação entre essas variáveis sendo, portanto as correlações

significantes obtidas nesta pesquisa resultantes das diferenças entre doentes (pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS) e indivíduos saudáveis.

Oitenta e sete por cento dos pacientes soropositivos para o HIV e/ou doentes com AIDS manifesta apresentaram colonização/infecção por *Candida* sp. e a maioria (60%) apresentou pelo menos um episódio prévio de candidíase orofaríngea. Já entre os indivíduos do grupo controle, a prevalência foi menor (9%) com ausência absoluta de candidíase orofaríngea.

Os achados obtidos quanto à prevalência de *Candida* sp. na mucosa oral de indivíduos saudáveis e pacientes seguem àquelas reportadas em outras populações, que referem espécies de *Candida* sp. fazendo parte da microbiota normal da orofaringe em 5 a 50% dos adultos saudáveis, em forma de colonização assintomática. <sup>(14, 17, 47)</sup> Já nos pacientes soropositivos para o HIV, essas taxas variam de 24 a 90%, <sup>(26, 28, 32)</sup> em virtude da progressiva deficiência do sistema imunológico e da elevação da carga viral, que tornam esses pacientes mais suscetíveis ao aumento da colonização oral. De fato, alguns fatores podem influenciar a frequência de colonização por essas leveduras, entre eles, a quantidade e pH da saliva, a imunossupressão, o uso de prótese dentária, o diabetes e o câncer. <sup>(19, 23, 141)</sup>

A prevalência das diferentes espécies de *Candida* sp. nos pacientes avaliados também se assemelha àquela encontrada na literatura. No entanto, não foram isoladas as espécies *Candida krusei*, *Candida rugosa*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida humicola* e *Candida lusitaniae*. A ausência de isolamento de tais espécies é esperada visto que as mesmas

ocorrem em freqüências muito baixas que variam de 0,2 a 3%, de modo geral. (50, 134, 135, 137, 141,142)

Interessantemente, a prevalência de espécies “não-albicans” (29%) foi maior do que a observada tanto nos trabalhos realizados em outros países, cujas prevalências variaram entre 3 a 22%, (38, 50, 141, 142) quanto no Brasil onde a prevalência variou de 7 a 20%. (134, 137, 138) Em um único estudo, (144) foi obtida prevalência de 78% de *Candida* “não-albicans” em pacientes soropositivos para o HIV espanhóis. Contudo, esse estudo continha amostras isoladas não apenas da mucosa orofaríngea como também do trato urinário, vias respiratórias, lesões de pele e unha e trato genital, o que explica o número encontrado. (144)

O uso de antifúngicos, em especial do fluconazol, pode ser responsável pela seleção de espécies “não-albicans”, em especial *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. krusei*, naturalmente menos sensíveis aos azóis. (81,134)

Sabe-se que *Candida dubliniensis* é uma espécie “não-albicans” emergente. Por essa razão, levantamentos epidemiológicos de isolamento e identificação dessa espécie são cruciais para compreensão de sua importância médica tanto em pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS como para indivíduos saudáveis. (2,81)

Esse trabalho é, provavelmente, o primeiro a descrever o isolamento da levedura *C. dubliniensis* na região Noroeste paulista. A prevalência de *C. dubliniensis* verificada em nosso trabalho (2,8%) é menor do que a descrita em pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS de países europeus como Irlanda (11 a 32%), (52,145) Alemanha (30%), (136) Turquia (11,4%) (146, 147) e

Arábia Saudita (6% em média),<sup>(148, 149)</sup> da África (12%),<sup>(150)</sup> bem como dos EUA (12,55% em média),<sup>(50, 151, 152, 153, 154)</sup> além de países da América Latina como Argentina (13%)<sup>(155)</sup> e Venezuela (4%)<sup>(156)</sup>, sendo inferior apenas que a prevalência da Itália (1,5%)<sup>(157)</sup>. Entretanto, se assemelha àquela descrita em trabalhos realizados nesses pacientes em outras regiões do Brasil (0,5 a 2,8%)<sup>(19, 54, 81, 134, 138, 158)</sup> à exceção de um trabalho realizado no estado do Rio Grande do Norte onde essa prevalência foi de 6%.<sup>(137)</sup> Neste último estudo, o grupo estudado era de crianças soropositivas para o HIV apresentando carga viral elevada e contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> baixa, o que sugere que crianças sejam mais suscetíveis à colonização/infecção por essa levedura que os adultos<sup>(137)</sup> (**Anexo 1**).

Sendo assim pode ser inferido que a prevalência de *C. dubliniensis* é maior nos países localizados no Hemisfério Norte quando comparada àquela dos países da América Latina.

É difícil explicar a baixa frequência de *C. dubliniensis* em pacientes positivos para o HIV/ doentes com AIDS brasileiros em relação às demais populações. Sabe-se que a emergência dessa espécie é atribuída à diminuição da imunidade e/ou ao uso de drogas antifúngicas.<sup>(81)</sup>

Por essa razão, é possível que a baixa frequência de pacientes previamente submetidos a tratamentos com antifúngicos, principalmente da classe dos azóis e em especial com o fluconazol, tenha contribuído, uma vez que em outros estudos a maioria dos pacientes havia recebido tratamento antifúngico prévio.<sup>(38, 48, 90, 147)</sup>



A classificação quanto à etnia, mais especificamente a categoria caucasóide, foi referida como predisponente para a colonização/infecção por *C. dubliniensis* em países africanos. <sup>(159)</sup> Contudo, tal achado não foi verificado nesta pesquisa, possivelmente dado ao pequeno número de indivíduos pertencentes a essas etnias compondo o grupo em estudo.

Além disso, nesta pesquisa, a prevalência de *Candida tropicalis* (18%) foi maior do que as anteriormente referidas (1 a 7%) <sup>(50, 137, 138,143)</sup> o mesmo tendo sido verificado em relação à prevalência de *C. glabrata* (10%), já que a literatura refere prevalência dessa espécie variando de 0,2% a 6%. <sup>(50, 134, 138, 137, 143)</sup>

De fato, outros autores referiram que, dentre as espécies “não-albicans” isoladas com maior frequência nos casos de candidíase orofaríngea em pacientes soropositivos para o HIV/ doentes com AIDS estão *C. tropicalis* e *C. glabrata*. <sup>(160, 161)</sup>

As espécies “não-albicans” aqui isoladas ocorreram em maior frequência, como esperado, nos pacientes que não fazem uso de terapia antiretroviral, naqueles com níveis de TCD4<sup>+</sup> baixos e/ou com carga viral elevada, além daqueles expostos, por longo período, aos antifúngicos. De fato, afirma-se que a prevalência dessas espécies aumenta com o declínio imunológico, com o aumento da carga viral e com a exposição a drogas antifúngicas. <sup>(32, 45, 162, 163, 164, 165)</sup>

Assim, o isolamento de espécies “não-albicans” é menor nos pacientes em uso de terapia antiretroviral de alto impacto (HAART). <sup>(166, 167, 168, 169)</sup> Neste

estudo, o mesmo resultado pode ser verificado em relação ao uso de Inibidores de proteases (IPS).

Interessantemente, encontra-se descrita na literatura a ação dos IPs como redutoras da secreção da enzima aspartil proteinase de *C. albicans* (SAP), semelhante a proteinase do HIV, e que constitui um dos principais fatores de virulência dessa levedura. <sup>(11, 164, 170, 171, 172, 173, 174)</sup> Os antiretrovirais dessa classe inativam uma protease do HIV, induzindo a formação de partículas virais imaturas e não infecciosas. <sup>(11)</sup> A proteinase do HIV e a aspartil proteinase de *C. albicans* pertencem à mesma classe de enzimas e são inibidas, igualmente, inibidas pela pepstatina. <sup>(170)</sup> Pode ser verificado ainda, tanto “in vivo” <sup>(170)</sup> quanto “in vitro”, <sup>(11)</sup> que os IPs não apenas inibem a produção e atividade das SAPs como o fazem de modo dose-dependente.

Diferentes espécies reconhecidamente patogênicas de *Candida* possuem genes que codificam as SAP, entre elas *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. *C. tropicalis* possui quatro genes para SAP, enquanto que *C. parapsilosis* tem, ao menos, dois desses genes. Sugere-se, ainda, que *C. dubliniensis* possua ao menos nove desses genes. Assim, é altamente provável que a produção dessas proteinases desempenhe ação direta sobre a virulência deste fungo visto que espécies de *Candida* sp. de menor virulência ou não patogênicas não produzem quantidades significativas dessas enzimas. <sup>(175)</sup>

Além disso, a queda da prevalência dessas espécies na cavidade bucal dos pacientes com AIDS pode ser explicada pela redução da pressão seletiva dos azóis sobre essas espécies, uma vez que após o início do uso da HAART

houve queda pronunciada do número de infecções oportunistas com conseqüente redução do uso de antifúngicos. <sup>(47, 176)</sup>

A colonização por *Candida* “não-*albicans*” preocupa já que a manifestação de resistência pós tratamento empírico em casos de candidíase orofaríngea manifestadas por essas espécies, pode ocorrer mais rapidamente, com a possibilidade de ausência de resposta ou de recidiva nos estágios mais avançados da doença. <sup>(26)</sup> Sendo assim, a importância do isolamento e identificação de *Candida* sp. justifica-se visto que algumas espécies são naturalmente menos sensíveis aos azóis, além da possível sensibilidade parcial ou total insensibilidade à terapia antifúngica. <sup>(32, 160, 177)</sup>

Em adição, neste estudo, o uso do CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> propiciou a identificação de uma alta taxa de colonização/infecção mista (21,83%), tendo sido identificadas associações entre *Candida albicans* e *C. tropicalis*, entre *C. albicans* e *C. glabrata* e ainda, um caso de coinfeção por *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Casos de colonização ou infecção por mais de uma espécie dessa levedura na cavidade oral de pacientes com AIDS tem sido relatados <sup>(68, 69, 178)</sup> sendo a maior taxa de 18%. No Brasil, Milan *et al* em 2001, obtiveram taxa de 8,6% desse fenômeno, tendo sido isoladas, conjuntamente, as mesmas combinações entre espécies. <sup>(19)</sup>

Entretanto, a sorotipagem das cepas de *C. albicans*, que é dividida antigenicamente nos sorotipos A e B, não foi realizada nesta pesquisa. A distribuição desses sorotipos é bastante variável, no entanto estudos demonstram aumento da prevalência do sorotipo B em pacientes soropositivos para o HIV, <sup>(135, 179)</sup> bem como variabilidade genotípica ao longo do tempo além

---

da possibilidade de coinfeção por subtipos distintos de *C. albicans*, à semelhança da ocorrência de coinfeção por espécies. <sup>(180)</sup> Sendo assim, a taxa de colonização/infecção mista mensurada neste trabalho, apesar de alta, pode estar subestimada.

Como esperado, no grupo controle a prevalência de *Candida* sp. (9%) foi muito inferior àquela dos pacientes (87%), sendo possível ainda o isolamento apenas de *C. albicans*.

Uma associação importante foi a maior prevalência de *Candida* sp. entre usuários de prótese dentária. Tanto pacientes quanto indivíduos do grupo controle que usam algum tipo de prótese dentária apresentaram maior colonização/infecção por essas leveduras. Esse fato se dá devido a mecanismos de patogenicidade de *Candida* sp. que facilitam sua aderência às próteses de resina acrílica. <sup>(181, 182)</sup>

O mesmo fenômeno ocorreu em relação aos indivíduos diabéticos que fizeram parte do grupo controle, corroborando os dados da literatura. <sup>(141, 183, 184)</sup> Adicionalmente, pode ser observado um aumento da frequência colonização/infecção por *Candida* sp. nos diabéticos usuários de prótese dentária. <sup>(185)</sup> Realmente, a frequência da colonização/infecção por *Candida* sp. nesses indivíduos pode ser influenciada por diversos fatores tais como: uso de prótese dentária, <sup>(185)</sup> frequência de higiene oral <sup>(151)</sup> e produção das enzimas do ciclo do glioxalato. <sup>(186, 187)</sup> Tal observação deve mais amplamente ser divulgada aos demais profissionais de saúde que lidam com os pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS, especialmente odontólogos, visando à prevenção dessa ocorrência.

---

Relatos de caso de candidíase orofaríngea resistente ao fluconazol começaram a ser reportados na década de 90, após o uso deste antifúngico em esquemas terapêuticos ou profiláticos em pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS. <sup>(87)</sup> Desse modo, a emergente resistência as droga antifúngicas é atribuída, em especial, ao uso prolongado e à terapia empírica e inapropriada dessa classe de medicamentos, resultando em dificuldades no tratamento do paciente. <sup>(188)</sup>

Conforme esperado, as cepas isoladas no presente estudo, a partir da mucosa oral dos pacientes, são mais resistentes ao fluconazol do que aquelas isoladas nos indivíduos do grupo controle, o que corrobora os dados da literatura que refere imunossupressão avançada e exposição aos azóis como importantes fatores de risco para o desenvolvimento de resistência. <sup>(32, 189)</sup> Entretanto, não foi possível demonstrar o mesmo para o itraconazol, o cetoconazol e a anfotericina B, provavelmente pela baixa exposição prévia a esses antifúngicos visto que o fluconazol é prescrito com maior freqüência.

Confirmando o exposto acima, a maioria das cepas isoladas a partir dos pacientes que não fizeram uso prévio de antifúngicos foram mais sensíveis a essa classe de medicamentos. Foi possível ainda verificar que 100% das cepas isoladas a partir do grupo controle foram sensíveis a todos os antifúngicos testados o que seria esperado, já que nenhum desses indivíduos referiu uso prévio de drogas antifúngicas. <sup>(32, 188, 189)</sup>

Ainda na nossa casuística, aproximadamente a metade dos pacientes utiliza HAART tendo sido 32% deles expostos à terapia prévia com azóis.

Comparados os dados aqui obtidos aos perfis de sensibilidade antifúngica obtidos na era pré-HAART, foi observada, conforme esperado, menor taxa de resistência. <sup>(134,166)</sup>

Contudo, as taxas de resistência das cepas de *C. albicans*, obtidas neste estudo (35,5% ao fluconazol, 23% ao itraconazol, 9% ao cetoconazol e 4% à anfotericina B), foram maiores do que aquelas previamente descritas na era pós-HAART, com taxas médias de 2,8 a 12,7% <sup>(135, 190)</sup> de resistência aos azóis e de 0% para anfotericina B, para esses mesmos pacientes. O mesmo pôde ser verificado quanto ao perfil de resistência das cepas de *C. tropicalis* (50% resistente ao fluconazol, 23% ao itraconazol, 5,5% ao cetoconazol e 5,5% à anfotericina B) já que a taxa média de cepas resistentes encontradas na literatura foi de 0,7 a 14,3%. <sup>(135, 190)</sup>

Resultados semelhantes também foram encontrados para as cepas de *Candida glabrata* (60% resistente ao fluconazol, 40% ao itraconazol, 10% ao cetoconazol) uma vez que relatos prévios mostram padrões de resistência ao fluconazol, ao itraconazol e ao cetoconazol variando, respectivamente, de 0 a 11%, <sup>(135, 190)</sup> de 9,7 a 33,3 % <sup>(160, 135)</sup> e de 7,5 a 16,7 %. <sup>(160, 135)</sup> No entanto, o perfil de sensibilidade à anfotericina B das cepas de *C. glabrata* aqui isoladas, se assemelha aos obtidos nos demais estudos, uma vez que todas as cepas mostraram-se sensíveis a essa droga. <sup>(124, 160, 135)</sup>

Já para cepas de *C. dubliniensis*, nossos resultados (todas sensíveis e com valores de CIMs de 0,5 a 4,0 µg/mL) se assemelham àqueles da literatura que refere taxas de resistência ao fluconazol variando de 0 a 24% <sup>(19, 191)</sup> exibindo valores de CIMs de < 0,06µg/mL > 64 µg/mL. <sup>(147, 192, 193)</sup>

Pôde ser verificado, ainda, que a menor CIM para as cepas de *Candida dubliniensis* (0,5 µg/mL) foi maior do que esse mesmo parâmetro para as cepas de *Candida albicans* (0,25 µg/mL). Entretanto, o maior valor de CIM para as cepas de *Candida dubliniensis* (4,0 µg/mL) foi menor do que o valor correspondente para cepas de *Candida albicans* (65,0 µg/mL).<sup>(147, 193)</sup> Esse fato é esperado, visto que cepas de *C. albicans* estão em maior frequência e, além disso, estão expostas às drogas antifúngicas há mais tempo visto que *C. dubliniensis* é espécie emergente.<sup>(49, 194)</sup> Assim, tomando em conta a já bem documentada rapidez no desenvolvimento de resistência de *C. dubliniensis* quando exposta ao fluconazol<sup>(2, 49, 195)</sup> podemos sugerir que as cepas dessa levedura, isoladas a partir de pacientes soropositivos para o HIV/doentes com AIDS da região Noroeste Paulista, ainda não estão manifestando tal fenômeno. Essa observação reforça a necessidade de identificação acurada de *Candida* sp. bem como da realização do antifungigrama, anteriormente à administração da terapia antifúngica empírica nos casos de portadores de candidíase orofaríngea no grupo de pacientes estudados.

Comparados os dados aqui obtidos aos perfis de sensibilidade antifúngica obtidos na era pré-HAART, foi observada, conforme esperado, menor taxa de resistência.<sup>(183)</sup>

O maior número de cepas resistentes, aqui obtido, quando comparado aos perfis de sensibilidade anteriormente referidos também na era pós-HAART pode ser elucidado por duas hipóteses. A primeira sugere a existência de falhas no preenchimento dos prontuários médicos subestimando a terapia prévia com antifúngicos. Já na segunda o número de cepas resistentes pode

---

estar sobreestimado devido às diferenças entre as metodologias utilizadas, pois é conhecido o fato de que a disco difusão, método utilizado nesse estudo, gera um maior número de resultados resistentes do que a microdiluição, método utilizado nos demais trabalhos. <sup>(116, 117, 196)</sup>

A fim de se comparar métodos para a determinação da sensibilidade antifúngica, foram realizados os testes da microdiluição (“gold standard”) e o de disco difusão. A comparação entre os perfis de sensibilidade antifúngica ao fluconazol obtidos através dos mesmos mostrou 73,5% de concordância. Esse valor foi inferior àqueles previamente relatados (89% em média). <sup>(144, 188, 194, 195)</sup>

A principal discrepância foi observada quando o método referência forneceu resultado “sensível” enquanto que a leitura do halo de inibição foi considerada “resistente”. No entanto, alguns autores conferem o resultado oposto como de maior gravidade já que, na rotina laboratorial um resultado falso positivo prejudica e/ou dificulta o tratamento do paciente, pondo em risco sua sobrevivência. <sup>(116, 117, 196)</sup> Foram encontradas também discrepâncias quando a microdiluição resultou em sensível dependente da dose e a difusão em disco em sensível ou em resistente. Tais variações são também referidas na literatura como de menor importância e, portanto, aceitáveis dadas às limitações do procedimento. <sup>(116, 117, 196)</sup> O fenômeno considerado grave, <sup>(116, 117, 96)</sup> ou seja, resistente no método de referência, mas interpretado como sensível em meio sólido, não foi observado neste estudo.

Apesar das limitações detectadas quanto aos resultados discrepantes, o método da disco difusão apresentou ótima sensibilidade, boa especificidade e eficácia e valor p significativo, corroborando dados prévios que relatam a sua



boa correlação com a microdiluição. <sup>(181)</sup> Portanto, o método da disco difusão é o teste mais prático e econômico para ser empregado na rotina laboratorial. <sup>(120, 123, 124, 135, 196, 197)</sup>

Pelo exposto acima pode ser proposto que o perfil de sensibilidade antifúngica ao fluconazol seja testado inicialmente pelo método da disco difusão seguido pela confirmação dos resultados sensível dependente da dose por microdiluição, por se tratar de um método quantitativo, a fim de se otimizar a terapêutica antifúngica ao paciente. <sup>(188)</sup>

A fim de se implementar a triagem fenotípica de *C. dubliniensis*, no Centro de Investigação de Microorganismos, foram testadas e avaliadas diversas metodologias. Para fins estatísticos, os resultados foram comparados ao método de formação de franjas de hifas em agar Niger, considerado “gold standard”. <sup>(62, 194)</sup>

A diferença entre as culturas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* em **agar Niger** foi publicada no ano de 1999, <sup>(188)</sup> quando se observou que *C. albicans* apresenta nesse meio de cultura colônias lisas enquanto que *C. dubliniensis*, rugosas com clamidósporos abundantes. Esse teste foi posteriormente validado <sup>(62, 194)</sup> como um método simples, rápido e eficaz para distinção dessas duas espécies já que 97,7% das cepas de *Candida dubliniensis* são capazes de exibir tal perfil micromorfológico, nessa condição. No entanto, estudo posterior verificou que números menores, de aproximadamente 90%, dessas cepas podem apresentar tais características quando cultivadas em agar Niger.

<sup>(196)</sup>

Tal observação pode ser resultante de incubação em temperaturas mais baixas, sendo possível que a temperatura de incubação das placas seja um fator que interfira nos resultados finais conferindo taxas de sensibilidade e especificidade inferiores. <sup>(128)</sup>

Segundo os dados aqui obtidos esse método apresentou ótima sensibilidade, eficácia e eficiência, de modo que nossos resultados se assemelham aos primeiramente reportados. <sup>(58, 62, 157, 196)</sup> Adicionalmente, foi rápido, de baixo custo sendo a visualização das franjas de hifas abundantes mais fácil do que aquela obtida por cultivo em agar Girassol. Dessa forma, esse teste representa um importante avanço que permite, em associação com outras metodologias, a triagem fenotípica adequada entre cepas de *C. albicans* e de *C. dubliniensis*. <sup>(157, 197)</sup>

As cepas de *C. dubliniensis* aqui identificadas formaram **franjas de hifas em agar Girassol**, enquanto que cepas de *C. albicans* exibiram franjas lisas. <sup>(2, 62, 145, 197)</sup> Assim, o teste de formação de franjas de hifas em agar Girassol apresentou ótima sensibilidade, eficácia e eficiência. Seu custo é baixo, o tempo de execução é curto e a visualização micromorfológica, relativamente fácil.

Neste trabalho, a **avaliação da assimilação dos carboidratos xilose e  $\alpha$ -metil-D-glucopiranoside** apresentou ótima sensibilidade, especificidade e eficiência, resultados estes que se assemelham aos descritos na literatura. <sup>(49, 73)</sup> Esse mesmo perfil de assimilação bioquímica é referido por muitos autores como sendo um dos mais confiáveis métodos fenotípicos de identificação presuntiva de *Candida dubliniensis*. <sup>(2, 70, 72, 74, 75, 145, 197, 198)</sup> Entretanto, o

carboidrato  $\alpha$ -metil-D-glucopiranoside não é facilmente encontrado para aquisição no mercado, estando disponível em sistemas comerciais de avaliação do perfil bioquímico que apresentam custo muito elevado, o que inviabiliza o uso desse teste na rotina laboratorial.

Outra característica fenotípica que permite a diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* é a distinção na apresentação de clamidósporos, que pode ser verificada pelo método clássico de **microcultivo**. Deste modo, cepas de *C. dubliniensis* são capazes de exibir clamidósporos terminais em pares ou “triplets” quando cultivadas em agar Fubá com Tween 80. <sup>(49)</sup>

Em nossa avaliação, apesar desse teste ter mostrado 100% de sensibilidade, 93,75% de especificidade e valor p significativo, aliado ao seu baixo custo, a visualização das diferenças entre os clamidósporos não é fácil, visto que não são todas as cepas de *C. dubliniensis* que apresentam clamidósporos em “tríples” abundantes. Desse modo, para um bom resultado, toda a placa deve ser criteriosamente investigada o que exige tempo e pessoal treinado, limitação essa que deve ser reconhecida.

Neste trabalho o teste de **coloração das colônias em CHROMagar Candida<sup>®</sup>** mostrou 100% de sensibilidade, 86,25% de especificidade e valor p não significativo, quando comparado aos resultados obtidos através do teste “gold standard” para triagem fenotípica de *C. dubliniensis*. O resultado de sensibilidade, aqui encontrado, se assemelha ao encontrado por Yucesoy *et al* (2003), <sup>(199)</sup> entretanto, a especificidade, foi menor.

Esse meio evidencia, macroscopicamente, colônias verdes para *C. albicans* que se apresentam globosas, ovaladas ou oval-alongadas, brilhantes

e exibindo bordas e superfícies lisas. Já as colônias de *C. dubliniensis* se apresentam com tonalidade verde-escura, opacas, exibindo tanto bordas quanto superfícies filamentosas. Além disso, essas últimas são mais secas que as colônias de *C. albicans*.

Contudo, a tonalidade das colônias pode variar de acordo com a temperatura e tempo de incubação das placas.<sup>(63)</sup> A temperatura de incubação ideal para uma identificação inequívoca entre essas espécies é a de 37°C, tendo sido referidos resultados discrepantes quando a incubação ocorre em temperatura inferior. De fato, nessas condições colônias de *C. albicans* exibiram coloração rosa escuro o que, na rotina laboratorial, poderia conduzir a identificação presuntiva errônea.<sup>(63, 200)</sup> Para resolução desse problema, a fim de facilitar a diferenciação entre essas duas espécies foi proposta a suplementação desse meio com agar Fubá.<sup>(201)</sup>

A despeito das limitações referidas, as vantagens desse teste referem-se à facilidade de execução, a rapidez (resultados em até 72 horas) e a boa reprodutibilidade inter-laboratorial.<sup>(202)</sup> O custo elevado do meio é uma das desvantagens, além da dificuldade na visualização da diferença na tonalidade da cor verde entre as colônias de *C. albicans* e *C. dubliniensis* (mais escuras), o que requer treinamento.

A inabilidade de **crescimento** das cepas de *Candida dubliniensis* a 42°C foi primeiramente descrita por Sullivan, *et al*, (1995)<sup>(49)</sup> e a partir de então muitos trabalhos tem buscado a confirmação desse como recurso diagnóstico.<sup>(2, 61, 90, 145)</sup> Entretanto, muitos deles concluíram que algumas cepas dessa espécie são capazes de crescer nessa condição.<sup>(53, 61)</sup>

A execução desse teste é fácil, os resultados são rápidos, a reprodutibilidade é alta e o custo para execução é baixo. Apesar disso, no presente estudo, esse teste apresentou baixa sensibilidade e valor p significativo com boa especificidade. Pode, dessa forma, fornecer tanto resultado falso positivo quanto falso negativo que, provavelmente, se justificam pela variabilidade genética entre cepas de uma mesma espécie.

Quanto à execução e custo, o **teste de crescimento a 45°C** é similar ao anterior. Entretanto, no presente estudo, apesar da boa especificidade demonstrada, seu valor p não significativo, aliado à baixíssima sensibilidade conduzem a conclusão de que tal método foi incapaz de discriminar os verdadeiros positivos. No entanto, outros autores obtiveram resultados similares aos nossos e, portanto, afirmaram que esse teste não é capaz de distinguir *C. albicans* de *C. dubliniensis*.<sup>(73, 154, 157)</sup>

Esses dados discordam dos encontrados na literatura que afirmam que a habilidade de crescimento a 45°C é um método simples, barato e confiável para diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, sendo mais eficaz que a habilidade de crescimento a 42°C.<sup>(61, 153)</sup>

Adicionalmente, foi avaliado o **teste de tolerância ao agar Sabouraud hipertônico**. Esse recurso diagnóstico foi proposto em 2001,<sup>(64)</sup> quando se verificou que a totalidade das cepas de *C. albicans* exibe crescimento nesse meio enquanto que as cepas de *C. dubliniensis* são incapazes de fazê-lo.<sup>(36, 64)</sup> Os resultados aqui obtidos não corroboram tal observação, visto que algumas cepas de *C. albicans* não puderam ser cultivadas nesse meio.

Por essa razão, é possível concluir que nem todas as cepas evidenciam o mesmo padrão de crescimento nesse meio, sugerindo a existência de variabilidade genética entre as mesmas. <sup>(203, 204)</sup> De fato, estudos recentes mostram que algumas cepas de *C. albicans* possuem estratégias de defesa quando expostas a variadas concentrações de NaCl. Tais mecanismos ocorrem via presença de co-transportadores de  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ , codificados pelo gene CNH1 e da enzima  $\text{Na}^+$ -ATPase, cuja produção é estimulada pelo gene ENA1-4. <sup>(203, 204)</sup>

Por fim, após avaliação estatística, o teste de tolerância ao agar Sabouraud Hipertônico apresentou baixa sensibilidade e eficácia, entretanto boa eficiência e valor p significativo. Dessa forma, dada a possibilidade de resultado falso positivo e falso negativo, fica comprometida sua recomendação para a rotina diagnóstica a despeito de sua rapidez, economia e boa reprodutibilidade.

Por último, foi avaliado o **teste de opacificação em agar com Tween 80**. Baseando-se na observação de que as espécies de *Candida* apresentam diferentes padrões lipolíticos, procurou-se desenvolver um meio capaz de demonstrar essas diferenças promovendo a diferenciação e identificação das espécies. Desse modo, o agar com Tween 80 foi desenvolvido para verificação da capacidade lipolítica, via secreção de esterases, de várias espécies de *Candida*. <sup>(53)</sup>

Após sucessivas experimentações, foi comprovado que a totalidade das cepas de *C. albicans* evidencia, nesse meio, halo de opacidade ao redor das colônias, resultante de sua atividade lipolítica enquanto as cepas de *C.*

*dublinsiensis* não evidenciam halo algum. <sup>(80)</sup> O mesmo resultado foi obtido em um estudo realizado no Brasil, comprovando que as cepas brasileiras de *C. dublinsiensis* evidenciam o mesmo padrão lipolítico das cepas de outros países. <sup>(36)</sup>

Estudo anterior afirmou que o teste de opacificação em agar com Tween 80 é de fácil execução e leitura. <sup>(36)</sup> Contudo, no presente estudo, apesar dessa atividade lipolítica ter sido comprovada, muitas cepas de *C. albicans* não evidenciaram halo de inibição nítido, dificultando a leitura dos resultados.

Adicionalmente, a avaliação estatística mostrou que esse teste apresenta sensibilidade regular, boa especificidade e eficiência, além de valor p significativo. Sendo assim, pode fornecer resultados falso positivo e falso negativo, o que compromete sua confiabilidade.

Por fim, apesar da rapidez e economia, a execução do teste de opacificação em agar com Tween 80 é mais laboriosa que a dos demais testes avaliados.

Após a avaliação dos resultados obtidos, é possível propor que a triagem fenotípica de *C. dublinsiensis* deve ser realizada pela avaliação tanto da coloração quanto do aspecto das colônias em CHROMagar Candida<sup>®</sup> seguido da pesquisa de formação de franjas de hifas em agar Niger .

Como opção única, somente os métodos genotípicos permitem a identificação inequívoca entre *C. dublinsiensis* e *C. albicans*. <sup>(73, 78, 94, 97)</sup> Entretanto, os métodos moleculares estão restritos aos laboratórios de pesquisa e, frequentemente, não são adotados na rotina laboratorial devido ao

custo elevado além da necessidade de equipamento apropriado e de pessoal treinado.

A alta prevalência de espécies “não-albicans”, incluindo *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* aqui verificada ressalta a importância da identificação fenotípica bem como da realização dos testes de sensibilidade antifúngica para as cepas de *Candida* sp. isoladas da mucosa orofaríngea na população soropositiva para o HIV/doentes com AIDS. Tais abordagens permitem a otimização do tratamento de candidíase orofaríngea bem como a prevenção de recidivas, ocorrência tão comum nesse grupo.



## **5. CONCLUSÕES**

---

## 5. CONCLUSÕES

As seguintes conclusões puderam ser obtidas para os portadores do HIV/doentes com AIDS da região do Noroeste Paulista e seu grupo controle:

- I. A prevalência de *Candida* sp. é influenciada por fatores imunológicos, pela carga viral, pela exposição prévia a antifúngicos, pelo uso de prótese dentária, pela frequência da higiene bucal e pelo diabetes;
- II. o uso de inibidores de proteases reduz o número de espécies de *Candida* sp. na cavidade orofaríngea favorecendo a colonização simples por *Candida albicans*;
- III. as cepas isoladas da mucosa oral dos pacientes são mais resistentes aos antifúngicos que aquelas isoladas no mesmo sítio anatômico do grupo controle;
- IV. as espécies de *Candida* “não-*albicans*” são mais resistentes aos antifúngicos azóis e à anfotericina B que os isolados de *C. albicans*;

- V. *C. albicans* é a única espécie isolada da mucosa orofaríngea de indivíduos saudáveis;
- VI. a prevalência de colonização/infecção por *Candida* sp. nos pacientes é elevada;
- VII. nos pacientes a prevalência de *Candida* “não-*albicans*” é elevada, sendo que a de *C. dubliniensis* é similar àquela observada em outras regiões do Brasil.
- VIII. a triagem fenotípica de *C. dubliniensis* deve ser realizada pelos seguintes métodos: coloração e aspecto das colônias em CHROMagar *Candida*® seguido da pesquisa de formação de franjas de hifas em agar Niger .

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministério da Saúde. DST-AIDS/ Área Técnica/ Epidemiologia/ AIDS. <http://www.aids.gov/data/Pages/LUMISD3352823PTBRIE.htm>.
2. 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.
3. Hazen KC. New and Emerging pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 1995 8(4): 462-78.
4. 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.
5. 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.
6. Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC and Gow NAR. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology.* 1998; 144: 829-838.

7. Cardenes CD, Carrilo AJ, Arias A, Roguiques-Alvarez C, Torres-Lana A, Sierra A et al. Comparison of Albicans ID2® Agar plate with the germ tube for presuntive identification of *Candida albicans*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2002; 42: 181-185.
8. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Jr, Merz WG, Baqui AAMA, Kelley JI, and Meiller TF. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected individuals. J. Clin.Microbiol. 2000; 38:2423-2426.
9. Marins JRP, Jamalww LF, Chen S, Hudes ES, Barbosa AJ, Barros MBA, Chequer P, et al. Sobrevivência atual dos pacientes com aids no Brasil. Evidência dos resultados de um esforço nacional. Boletim Epidemiológico – AIDS. 2002; ano XV nº01; [http://www.aids.gov.br/final/dados/bol\\_aids1.htm](http://www.aids.gov.br/final/dados/bol_aids1.htm).
10. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico - Aids e DST. Ano II nº01 – 01ª a 26ª semanas epidemiológicas, Novembro. 2005.
11. Korting HS, Schaller M, Eder G, Hamm G, Böhmer U, Hube B. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(8):2038-42.

12. Park AW, Yaacob HB. Pathogenic microbes of the oral environment. *J Nihon Univ Sch Dent* 1994; 36(1):1-33.
13. Adhesion of candida species to human buccal epithelial cells following brief exposure to nystatin. *Oral Microbiol Immunol.* 1999 Dec;14(6):358-63.
14. Candido RC, Azevedo RVP, Ito II. Yeasts: the prevalence in the oral cavity of individuals with or without denture. *Rev Odontol UNICID* 1995;7(1):27-33.
15. Samaranayake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73(2):171-80.
16. Challacombe SJ. Immunologic aspects of oral candidiasis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol* 1994; 78(2):202-10.
17. Lynch DP. Oral candidiasis: history, classification, and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78(2):189-93.
18. Candido RC, Azevedo RVP, Ito II. Yeasts: the prevalence in the oral cavity of individuals with or without denture. *Rev Odontol UNICID* 1995; 7(1):27-33.
19. Milan EP, Laet Sant' A P, Azevedo ASM, Sullivan DJ, Coleman DC, Lewi D, et al. 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.

20. Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol* 1980; 25(1):1-10.

21. Gupta E, Vajpayee M, Xess I, Seth P . Oral candidiasis in HIV-infected patients and its relation to CD4 + counts: an adjunct clinical marker of HIV disease progression. *Trop Doct*. 2006 Apr;36(2):127.

22. Fonseca JB. Candidíase: Aspectos de interesse odontológico. *Candidíase*. ed. CS Lacaz. São Paulo, Edusp. P. 130-146, 1980.

23. Odds FC, Nuffel LV, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10):2869-73.

24. Powderly WG, Finkelstein DM, Feinberg J, Frame P, He W, Van der Horst C, Koletar SL, Eyster ME, Carey J, Waskin H. A randomized trial comparing fluconazole with clotrimazole troches for the prevention of fungal infections in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995; 332(11): 700-5.

25. Datry A. Candidose digestive et infection VIH: actualités cliniques et thérapeutiques. *J Mycol Méd* 1992;2(1):5-14.



26. Pappas AA, Ray TL. Cutaneous and disseminated skin manifestations of candidiasis. In: Elewski BE, ed. *Cutaneous Fungal Infections*. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Science; 1998. p.91-117.
27. Patton LL, McKaig RG, Strauss R, Rogers D, Eron JJ. 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; 89(3):299-304.
28. 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. p.35-113.
29. Veronese R, Focaccia A, Lomar AV. HIV/AIDS: etiologia, patogenia e patologia clínica: tratamento e prevenção. Ed. Atheneu, São Paulo, 1999.
30. 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* 5:1339-1343, 1991.
31. Schiodt M, Pindborg JJ. AIDS and the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg* 16:16:1-14, 1987.

32. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edward JE. Diretrizes para o Tratamento de Candidíase. Clin Infect Dis. 2004; 38: 161-189.
33. Informações e Atualização [Manual] São Paulo: Editores Científicos.
34. Lacaz CS, Porto, E, Martins, CJE, Heins-vaccari EM, Melo TN. Tratado de Microbiologia Médica, 9 ed: Editora Sarvier; 2002.
35. Polacow VO, Scagliusi FB, Furtado LSM, Carré ML, Pereira GM, Avileis CG et al. Alterações do estado nutricional e dietoterapia na infecção por HIV. Ver Brás Clin 2004; 19(2): 79-85.
36. Linares CED. Aspecto do comportamento fenotípico e da suscetibilidade a antifúngicos em *Candida dubliniensis* [dissertação]. Santa Maria (RS): UFSM; 2002.
37. Powderly WG, Gallant JE, Ghannoum MA, Mayer KH, Navarro EE, Perfect, JR. Oropharyngeal candidiasis in patients with HIV: suggested guidelines for therapy. AIDS Res Hum Retroviruses 1999; 15(18):1619-23.
38. Kolokotronis A, Kioses V, Antoniadis D, Mandraveli K, Doutsos I, Papanayotou P. Immunologic status in patients infected with HIV with oral candidiasis and hairy leukoplakia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994; 78(1):41-6.

39. Jacobson MA, French M. Altered natural history of AIDS-related opportunistic infections in the era of potent combination antiretroviral therapy. *AIDS* 1998; 12 Suppl A: S157-63.

40. Navazesh M, Mulligan R, Pogoda J, Greenspan D, Alves M, Phelan J, Greenspan J, Slots J. The effect of HAART on salivary microbiota in the Women's Interagency HIV Study (WIHS). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Dec;100(6):701-8. Epub 2005 Jan 25.

41. Michelet C, Arvieux C, François C, Besnier JM, Rogez JP, Breux JP, Souala F, Allavena C, Raffi F, Garre M, Cartier F. Opportunistic infections occurring during highly active antiretroviral treatment. *AIDS* 1998; 12(14):1815-21.

42. Moore R, Chaisson RE. Natural history of HIV infection in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13(14):1933-42.

43. Gaitan-Cepeda LA, Martinez-Gonzalez M, Ceballos-Salobrena A. Oral candidosis as a clinical marker of immune failure in patients with HIV/AIDS on HAART. *AIDS Patient Care STDS.* 2005 Feb;19(2):70-7.

44. Cassone A, De Bernardis F, Torosantucci A, Tacconelli E, Tumbarello M, Cauda R. In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *J Infect Dis* 1999; 180(2):448-53.

45. Margiotta V, Campisi G, Mancuso S, Accurso V, Abbadessa V. HIV infection: oral lesions, CD4<sup>+</sup> cell count and viral load in an Italian study population. *J Oral Pathol Med* 1999; 28(4):173-7.

46. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998. 11:382-402.

47. Milan EP. Avaliação fenotípica e genotípica de leveduras isoladas da cavidade oral de pacientes com AIDS [dissertação]. São Paulo (SP): UNIFESP; 2001.

48. Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S, Gee S, Pinjon E, McCartan B, Shanley DB, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: an update. *Rev Iberoam Micol* 1999;16(2):72-6

49. 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 candidiasis in HIV-infected individuals. *Microbiology*. 1995; 141:1507-1521.

50. Vargas GK, Joly S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40:341-350.

51. 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.
52. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. J Clin Microbiol. 1998;36(2):329-34.
53. Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Goossens H. Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997;16(4):296-300.
54. Mariano PL, Milan EP, Matta DA, Colombo AL. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian Yest Stock Collection. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003; 98 (4): 533-538
55. Schorling SR, Kortinga HC, Froschb M, Muhlschlegel FA. The Role of *Candida dubliniensis* in Oral Candidiasis in human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. Crit Rev Microbiol. 2000;26(1):59-68.
56. Kirkpatrick WR, Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Patterson TF. Growth competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under broth and biofilm growing conditions. J Clin Microbiol. 2000; 38(2):902-4.

57. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol. 2001;39(9):3234-40
58. Staib F, Arasteh K. Chlamyospore formation on Staib agar. Observations made before *Candida dubliniensis* was described. Mycoses. 2001; 44: 23-27.
59. 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.
60. Hoppe JE, Frey P. Evaluation of six commercial tests and germ-tube test. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999; 18(3):188-91.
61. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1998; 36(7):2093-5.
62. Al Mosaid A, Sullivan DJ, Coleman D. Differentiation of *Candida Dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's Agar. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(10):4787-4789
63. Odds CF, Davidson A. "Room temperature" use of CHROMagar *Candida*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000; 38(3):147- 150.

64. Alves SH, Milan EP, Sant'Ana PL, Oliveira LO, Santurio JM, Colombo AL. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 43(1): 85-86.
65. Pfaller M, Houston A, Coffmann S. Application for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J. Clin. Microbiol*. 1996; 34:58-61.
66. Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New Chromogenic Agar Medium for the Identification of *Candida* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(7):3622-7.
67. Fox R, Neal KR, Leen CL, Ellis ME, Mendal BK. Fluconazole resistant *Candida* in AIDS. *J Infect* 1991; 22(2):201-4.
68. Newman SL, Flanigan TP, Fisher A, Rinaldi MG, Stein M, Vigilante K. Clinically significant mucosal candidiasis resistant to fluconazole treatment in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1994; 19(4):684-6.
69. Dronda F, Alonso-Sanz M, Laguna F, Chaves F, Martínez-Suárez JV, Rodríguez-Tudela JL, González-López 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(6):446-52

70. Jabra-Rizk MA, Brenner TM, Romagnoli M, Baqui AAMA, Merz WG, Falkler WA Jr, et al T. Evaluation of a reformulated CHROMagar Candida. J. Clin.Microbiol. 2001; 39:2015-2016.

71. Sidrin JJC, Rocha MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. 1 ed: Editora Guanabara Koogan, 2004.

72. Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye AA, Salkin IF, Geimer M., et al. Rapid Identification of *Candida dubliniensis* with Commercial Yeast Identification Systems. J. Clin.Microbiol. 1999; 37(11) : 3533-3539.

73. Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan, DJ, Coleman D C, et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC systems. J. Clin. Microbiol. 1999; 37:3804-3808.

74. Alves SH, Horta JÁ, Milan EP, Scheid LA, Vainstein MH, Santurio JM, Colombo AL. Carbohydrate assimilation profiles of brazilian *Candida dubliniensis* isolates based on ID 32C Sistem. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 2005; 47(2): 109-

75. Salkin IF, Pruitt WR, Padhye AA, Sullivan D, Coleman D, Pincus DH. Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical



isolates of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. J Clin Microbiol. 1998; 36(5):1467.

76. Bautista-Munoz C, Boldo XM, Villa-Tanaca L, Hernandez-Rodriguez. Identification of *Cândida* spp. By Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Direct PCR Methods. J. Clin.Microbiol. 2003, 41(1) : 414-420.

77. Diaz- Guerra TM, Martinez-Suarez, Laguna F, Rodriguez-Tudela JL. Comparison of Four Molecular Typing Methods for Evaluating Genetic Diversity among *Candida albicans* Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients with Oral Candidiasis. J. Clin.Microbiol. 1997, 35(4) : 856-861.

78. Guee SF, Joly S, Soll DR, Jaques FG, Meis M, Verweiji PE. Identification of Four Distinct Genotypes of *Candida dubliniensis* and Detection of Microevolution In Vitro and In Vivo. J. Clin.Microbiol. 2002; 40(2): 556-574.

79. Yucesoy M, Esen Nuran, Yulug N. Use of chromogenic tube and methyl blue-sabouraud agar for the identification of *Candida albicans* strains. Kobe J Med Sci. 2001; 47(4):161-7.

80. Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. J. Clin.Microbiol. 2000; 38: 4626-4628.

81. 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):165-8.
82. Boerling P, Boerlin-Petzold F, Durussel C, Addo M, Pagani JL, Chave JF, et al. Cluster of Oral Atypical *Candida albicans* Isolates in a group of Human Immunodeficiency Virus-Positive Drug Users. *J. Clin. Microbiol*. 1995; 1129-1135.
83. Fetter A, Partisani M, Koenig H, Kremer M, Lang JM. Asymptomatic oral *Candida albicans* carriage in HIV-infection: frequency and predisposing factors. *J Oral Pathol Med* 1993; 22(2):57-9.
84. Tumbarello M, Tacconelli E, Caldarola G, Morace G, Cauda R, Ortona L. Fluconazole resistant oral candidiasis in HIV-infected patients. *Oral Dis* 1997; 3 Suppl 1:S110-2.
85. Hunter KD, Gibson J, Lockhart PB, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(5):558-64.
86. Magald S, Mata-Essayag S, Capriles CH, Perez C, Colella MT, Olaizola C. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *Int J Infect Dis*. 2004; 8(1):39-45.

87. Fichtenbaum CJ, Koletar S, Yiannoutsos C, Holland F, Pottage J, Cohn SE, Walawander A, Frame P, Feinberg J, Saag M, Van der Horst C, Powderly WG. Refractory mucosal candidiasis in advanced human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 2000; 30(5):749-56.

88. Revankar SG, Dib OP, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Fothergill AW, Rinaldi MG, Redding SW, Patterson TF. Clinical evaluation and microbiology of oropharyngeal infection due to fluconazole-resistant *Candida* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 1998; 26(4):960-3.

89. Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman J. Ergosterol Biosynthesis Inhibitors Become Fungicidal when Combined with Calcineurin Inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(3): 956-964.

90. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS*. 1997; 11(5):557-67.

91. Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, and Morschhauser J. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and in *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000; 46:291-295.

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

93. Cuenca-Estrela M, Lee-Yang W, Ciblak AM, Arthington-Skaggs AB, Mellano E, Warnock WD, et al. Comparative Evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(11):3644-7.

94. Bart-Delabesse E, Boiron P, Carlloti A, Dupont B. *Candida albicans* genotyping and studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. *J Clin Microbiol* 1993; 31(11):2933-2937.

95. Barchiesi F, Colombo A, McGough DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. In vitro activity of itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(7):1530-1533.

96. Dupont B, Denning DW, Marriott D, Sugar A, Viviani MA, Sirisanthana T. Mycosis and AIDS patients. *J Med Vet Mycol* 1994; 32 Suppl 1:65-77.

97. Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T, Michel-Briand Y. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Microbiol* 1994a; 2(4):1115-8.
98. Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Redding SW, Smith J, Farinacci G, Fothergill AW, Rinaldi MG. Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. *J Clin Microbiol* 1994; 32(1):59-64.
99. Redding S, Smith J, Farinacci G, Rinaldi M, Fothergill A, Rhine-Chalberg J, Pfaller M. Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: documentation by in vitro susceptibility testing and DNA subtype analysis. *Clin Infect Dis* 1994; 18(2):240-2.
100. Sangeorzan JA, Bradley SF, He X, Zarins LT, Ridenour GL, Tivalli RN, Kauffman CA. Epidemiology of oral candidiasis and HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med* 1994; 97(4):339-46.
101. Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Rinaldi MG. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth

macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(3):535-40.

102. Rex JH, Chester R, Cooper CR Jr, Merz WG, Galgiani JN, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(4):906-9.

103. Franz R, Ruhnke M, Morschhäuser J. Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Mycoses* 1999; 42(7-8):453-8.

104. Tavitian A, Raufman JP, Rosenthal LE, Weber J, Webber CA, Dincsoy HP. Ketoconazole-resistant *Candida* esophagitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology* 1986; 90(2):443-5.

105. Barchiesi F, Najvar LK, Luther MF, Scalise G, Rinaldi MG, Graybill JR. Variation in fluconazole efficacy for *Candida albicans* strains sequentially isolated from oral cavities of patients with AIDS in an experimental murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(5):1317-1320.

106. Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Engelmann E, Trautmann M. Comparative evaluation of three antifungal susceptibility test methods for *Candida albicans* isolates and correlation with response to fluconazole therapy. *J Clin Microbiol* 1996; 34(12):3208-11.

107. Laguna F, Rodríguez-Tudela JL, Martínez-Suárez JV, Polo R, Valencia E, Díaz-Guerra TM, Dronda F, Pulido F. Patterns of fluconazole susceptibility in isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans*. Clin Infect Dis 1997;24(2):124-30.
108. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. The Lancet Infect Dis. 2002; 2: 79-83.
109. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. Eukaryot Cell. 2005 Apr; 4(4):633-8.
110. Ramage G, Lopez-Ribot JL. Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Methods Mol Med. 2005; 118:71-9.
111. Ostrosky-Zeicher L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW, et al. Antifungal Susceptibility Survey of 2,000 Bloodstream *Candida* isolates in the United States. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003. 3149-3154.
112. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. Clin Micro Rew. 2001.14(4):643-658.

113. Cuenca-Estrela M, Lee-Yang W, Ciblak AM, Arthington-Skaggs AB, Mellano E, Warnock WD, et al. Comparative Evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(11):3644-7.
114. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution testing of yeasts: approved standard, 2nd ed., M27-A2. 2002. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
115. Magald S, Mata-Essayag S, Capriles CH, Perez C., Colella MT, Olaizola C, Ontiveros Y. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *Int J Infec Dis.* 2004. 8: 39-45. 04
116. Arthington- Skaggs BA, Motley M, Warnock, Morrison CJ. Comparative Evaluation of PASCO and National Committee for Clinical Laboratory Standarts M27- A Broth Microdilution Methods for Antifungal Drug Susceptibility Testing of Yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:6:2254-2260.
117. Arthington – Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, Frade JP, Brandt ME, Hajjeh RA, et al. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2002. 46(8): 2477-2481.



118. Arendup M, Lundgren B, Jensen IM, Hansen BS, Moller NF. Comparison of Etest and a tablet diffusion test with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Candida* isolates. *J of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001. 47: 521-526.
119. Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ. Stability of Muller-Hinton Agar Supplemented with Glucose and Methylene Blue for Disk Diffusion Testing of Fluconazole and Voraconazole.. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(3):1288-1289.
120. Barry A, Bille, Brown S, Ellis D, Meis J, Pfaller M, et al. Quality Control Limits for Fluconazole Disk Susceptibility Tests on Muller-Hinton Agar with Glucose and Methylene Blue. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(7): 3410-3412.
121. Kirkpatrick WR, Turner TM, Fothergill AW, McCarthy DI, Redding SW, Rinaldi MG, Patterson TF. Fluconazole disk diffusion susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 1998.36(11):3429-32.
122. Espinel – Ingroff A, Barchiesi M, Hazen KC, Martinez-Suarez V, Scalise G. Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. *Med Micol* 36:68-78.

123. Colombo AL, Matta D, Almeida LP, Rosas R. Fluconazole Susceptibility of Brazilian *Cândida* Isolates Assessed by a Disk Diffusion Method. *The Brazilian Journal of Infections Diseases*. 2002. 6(3): 118-123.
124. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ. Activities of Fluconazole and Voriconazole against 1,586 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.
125. Perea S, Lopez-Ribot JL, Wickes BL, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmann SP, et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002. Jun; 46(6):1695-703.
126. Duncan BB, Chambless LE, Schmidt ML, Folsom AR, Crouse JR, Carpenter MA. Association of the waist-to-hip ratio is different with wine than with beer or hard liquor consumption. *Atherosclerosis risk in Communities Study Investigators. Am. J. Epidemiol* 1995; 142(10):1034-8.
127. Fricker-Hidalgo H, Vandapel O, Duchesne MA, Mazoyer MA, Monget D, Lardy B, Lebeau B, Freney J, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Comparison of the

new API Candida system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species. J Clin Microbiol 1996;34(7):1846-8.

128. Lees E, Barton R. The use of Niger seed agar to screen for *Candida dubliniensis* in the clinical microbiology laboratory. Diag.Microbiol Inf Dis 2003; 46:13-17.

129. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A. 2004. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

130. Rex JH, Pfaller MA, Lancaster M, Odds FC, Bolmström A, Rinaldi MG. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards-recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. J Clin Microbiol 1996;34(4):816-7.

131. Ayres M, Ayres JM, Ayres LD, Santos AS. BioEstat 3.0: aplicações estatísticas na área da saúde. 1 ed. Pará: Sociedade Brasileira de Mamirauá; 2003.

132. Ávila SLM, Ferreira AW. Sorologia: Importância e Parâmetros. In: nome editora, Diagnóstico Laboratorial. X ed. Xxxx: ano. P.1-7.

133. CDC. Revised Classification System for HIV Infection and Expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. MMWR 1992;41 (RR-17).

134. Milan EP, Burattini MN, Kallás EG, Fischman O, Costa PRO, Colombo AL. Azole resistance among oral *Candida* species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure. Diagn Microbiol Infect Dis 1998;32(3):211-6.

135. 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.

136. Kurzai O, Korting HC, Harmsen D, Bautsch W, Molitor M, Frosch M, Muhlschlegel FA. Molecular and phenotypic identification of the yeast pathogen *Candida dubliniensis*. J Mol Med. 2000;78(9):521-9.

137. Portela MB, Souza IP, Costa EM, Hagler AN, Soares RM, Santos AL. Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in human immunodeficiency virus-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5925-7.

138. Sant'Ana Pde L, Milan EP, Martinez R, Queiroz-Telles F, Ferreira MS, Alcantara AP, Carvalho MT, Colombo AL. Multicenter Brazilian study of oral

Candida species isolated from AIDS patients.  
Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Mar;97(2):253-

139. Racial/Ethnic Disparities in Diagnoses of HIV, 2001-2004. CDC/ MMWR/.  
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5505a1.htm>

140. Uniting the world against Aids, UNAIDS.  
[http://www.unaids.org/en/Regions\\_Countries/default.asp](http://www.unaids.org/en/Regions_Countries/default.asp)

141. Willis AM, Coulter WA, Hayes JR, Bell P, Lamey PJ. Factors affecting the adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells of insulin-using diabetes mellitus patients. J Med Microbiol. 2000 Mar;49(3):291-3

142. 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.

143. 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):1600-3.

144. Rubio Calvo MC, Gil J, Ramirez de Ocariz I, Benito R, Rezusta A. In vitro activity of fluconazole, voriconazole and posaconazole against *Candida* spp. *Rev Esp Quimioter*. 2003 Jun;16(2):227-32
145. Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Dec 1;253(1):9-17. Epub 2005 Sep 26. Review.
146. Arikan S, Darka O, Hascelik G, Gunalp A. Identification of *Candida dubliniensis* strains using heat tolerance tests, morphological characteristics and molecular methods. 2003 Jan; 37(1): 49-57.
147. Tekeli A, Koyuncu E, Dolapci I, Guven GS, Sahin GO, Uzun O. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of Turkish HIV-positive patients. *Mycoses* 2005 May;48(3):197-201.
148. Fotedar R, Al-Hedaithy SS. *Candida dubliniensis* at a university hospital in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol*. 2003 May;41(5):1907-11.
149. Fotedar R, Hedaithy SS. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive yeasts recovered from the respiratory specimens in HIV-negative patients. *Mycoses* 2004 Apr;47(4-3):150-5.
150. Fisher JM, Basson NJ, van Zyl A. Identification of *Candida dubliniensis* in a HIV-positive South African population. *SADJ*. 2001 Dec;56(12):599-601.

151. Meiller TF, Jabra-Rizk MA, Baqui AAMA, Kelley JI, Meeks VI, Merz WG, Falkler WA. Oral *Candida dubliniensis* as a clinically important species in HIV-positive patients in the United States. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88(5):573-80.

152. Kim JO, Garofalo L, Blecker-Shelly D, McGowan KL. *Candida dubliniensis* infections in a pediatric population: retrospective identification from clinical laboratory isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 2003Jul;41(7):3354-7.

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

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

155. Binolfi A, Biasoli MS, Luque AG, Tosello ME, Magaro HM. High prevalence of oral colonization by *Candida dubliniensis* in HIV-positive patients in Argentina. *Med Mycol*. 2005 Aug;43(5):431-7.

156. Hartung de Capriles C, Mata-Essayag S, Perez C, Colella MT, Rosello A, Olaizola C, Abate SM. Detection of *Candida dubliniensis* in Venezuela. *Mycopathologia*. 2005 Oct;160(3):227-34.

157. Faggi E, Pini G, Campisi E, Martinelli C, Difonzo E. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus infected and non-infected patients and in a yeast culture collection. *Mycoses*. 2005 May;48(3):211-5.
158. Sano A, Vilela MM, Takahashi I, Fukushima K, Takizawa K, da 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(3):177-81.
159. Blignaut E, Pujol C, Joly S, Soll DR. Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. *J Clin Microbiol*. 2003 May;41(5):1838-42.
160. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Feb;49(2):668-79.
161. Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999 Jan;12(1):80-96. Review.



162. Repentigny L, Lewandowski D, Jolicoeur P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidíases in Human Immunodeficiency virus infection. Clin Microbiol Rev 2004; 17(4): 729-759.

163. Patton LL, McKaig RG, Eron JJ, Lawrence HP, Strauss RP. Oral hairy leukoplakia and oral candidiasis as predictors of HIV viral load. AIDS 1999;13(5):2174-6.

164. Diz Dios P, Ocampo A, Miralles C, Limeres J, Tomás I. Changing prevalence of human immunodeficiency virus-associated oral lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 2000;90(4):403-4.

165. Greenspan D, Komaroff E, Redford M, Phelan JA, Navazesh M, Alves MEAF, Kamrath H, Mulligan R, Barr CE, Greenspan JS. 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.

166. Salobreña AC, Cepeda LAG, Cañada FO, Barrionuevo DO, García LC, Quindós G. Resistencia *in vitro* a los antifúngicos en *Candida albicans* de pacientes infectados por el VIH con y sin candidosis oral. Rev Iberoam Micol 1999;16(4):194-7.

167. Yang YL, Lo HJ, Hung CC, Li Y. Effect of prolonged HAART on oral colonization with *Candida* and candidiasis. BMC Infect Dis. 2006 Jan 20;6:8.

168. Ramirez-Amador V, Ponce-De-Leon S, Sierra-Madero J, Soto-Ramirez L, Esquivel-Pedraza L, Anaya-Saavedra G. Synchronous kinetics of CD4+ lymphocytes and viral load before the onset of oral candidosis and hairy

leukoplakia in a cohort of Mexican HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005 Dec;21(12):981-90.

169. Melo NR, Taguchi H, Jorge J, Pedro RJ, Almeida OP, Fukushima K, Nishimura K, Miyaji M. Oral Candida flora from Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 Jun;99(4):425-31. Epub 2004 Aug 13.

170. Cassone A, Tacconelli E, De Bernardis F, Tumbarello M, Torosantucci A, Chiani P, Cauda R. Antiretroviral therapy with protease inhibitors has an early, immune reconstitution-independent beneficial effect on Candida virulence and oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected subjects. *J Infect Dis*. 2002 Jan 15;185 (2):188-95. Epub 2002 Jan 3.

171. Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA. In vitro susceptibility of oral Candida to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Dec;20(6):349-53.

172. Migliorati CA, Birman EG, Cury AE. Oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients under treatment with protease inhibitors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Sep;98(3):301-10.

173. Munro CA, Hube B. Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. *Trends Microbiol.* 2002 Apr;10(4):173-7.
174. De Bernardis F, Tacconelli E, Mondello F, Cataldo A, Arancia S, Cauda R, Cassone A. Anti-retroviral therapy with protease inhibitors decreases virulence enzyme expression in vivo by *Candida albicans* without selection of avirulent fungus strains or decreasing their anti-mycotic susceptibility. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004 May 1;41(1):27-34.
175. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003 Sep;67(3):400-28, table of contents. Review.
176. Mocroft A, Oancea C, van Lunzen J, Vanhems P, Banhegyi D, Chiesi A, Vinogradova E, Maayan S, Phillips AN, Lundgren J; EuroSIDA study group. Decline in esophageal candidiasis and use of antimycotics in European patients with HIV. *Am J Gastroenterol.* 2005 Jul;100(7):1446-54.
177. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bortlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Lancaster M, Odds FC, Rinaldi MG, Walsh TJ, Barry AL. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole and *Candida* infections. *Clin Infect Dis* 1997;24(2):235-47.

178. 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):843-6.

179. Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Goudet J, Durussel C, Pagani JL, Chave JP, Bille J. Typing *Candida albicans* oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. J Clin Microbiol. 1996 May;34(5):1235-48.

180. 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 Jul;35(7):1761-5.

181. Blanco MT, Morales JJ, Lucio L, Perez-Giraldo C, Hurtado C, Gomez-Garcia AC. Modification of adherence to plastic and to human buccal cells of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by a subinhibitory concentration of itraconazole. Oral Microbiol Immunol. 2006 Feb;21(1):69-72.

182. He XY, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. Mycoses. 2006 Mar;49(2):80-4.

183. Tekeli A, Dolapci I, Emral R, Cesur S. Candida carriage and Candida dubliniensis in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. *Mycoses*. 2004 Aug; 47(7):315-8.
184. Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola NB. Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis. *Diabet Med* 2005; 0 (0).
185. Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Hurel SJ, Porter SR. The isolation, identification and molecular analysis of Candida spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol*. 2002 Jun; 17(3):181-5.
186. Sahin I, Oksuz S, Sencan I, Gulcan A, Karabay O, Gulcan E, Yildiz O. Prevalance and risk factors for yeast colonization in adult diabetic patients. *Ethiop Med J*. 2005 Apr; 43(2):103-9.
187. Lattif AA, Prasad R, Banerjee U, Gupta N, Mohammad S, Baquer NZ. The glyoxylate cycle enzyme activities in the pathogenic isolates of Candida albicans obtained from HIV/AIDS, diabetic and burn patients. *Mycoses*. 2006 Mar; 49(2):85-90.
188. 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.

189. Canuto MM, Rodero GF, Ducasse OTV, Aguado HI, González 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.
190. Schaller M, Krnjaic N, Niewerth M, Hamm G, Hube B, Korting HC. Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans*. *J Med Microbiol*. 2003 Mar;52(Pt 3):247-9.
191. Pinjon E, Moran GP, Jackson CJ, Kelly SL, Sanglard D, Coleman DC, Sullivan DJ. Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Aug;47(8):2424-37.
192. Quindos G, Carrillo-Munoz AJ, Arevalo MP, Salgado J, Alonso-Vargas R, Rodrigo JM, Ruesga MT, Valverde A, Peman J, Canton E, Martin-Mazuelos E, Ponton J. In vitro susceptibility of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents. *Chemotherapy*. 2000 Nov-Dec;46(6):395-401.
193. Ahmad S, Khan Z, Mokaddas, Khan Z . Isolation and molecular identification of *Candida dubliniensis* form non-human immunodeficiency virus-infected patients in Kuwait. *J Med Microbiol* 2004; 53:633-7.

194. Al Mosaid A, Sullivan D, Salkin IF, Shanley D, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar. *J Clin Microbiol*. 2001 Jan;39(1):323-7.
195. Staib P, Morschhauser J. Chlamyospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*.
186. Mesa LM, Arcaya N, Canas O, Machado Y, Calvo B. Phenotypic evaluation to differentiate *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*] *Rev Iberoam Micol*. 2004 Sep;21(3):135-8.
197. Campanha NH, Neppelenbroek KH, Spolidorio DM, Spolidorio LC, Pavarina AC. Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis*. 2005 Nov;11(6):392-8.
198. Ellepola AN, Hurst SF, Elie CM, Morrison CJ. Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Dec;18(6):379-88.
199. Yucesoy M, Marol S. Performance of CHROMAGAR candida and BIGGY agar for identification of yeast species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2003 Oct 29;2:8.

200. Saunte DM, Klingspor L, Jalal S, Arnau J, Arendrup MC. Four cases of *Candida albicans* infections with isolates developing pink colonies on CHROMagar *Candida* plates. *Mycoses*. 2005 Nov;48(6):378-81.
201. Sahand IH, Moragues MD, Eraso E, Villar-Vidal M, Quindos G, Ponton J. Supplementation of CHROMagar *Candida* medium with Pal's medium for rapid identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. 2005 Nov;43(11):5768-70.
202. Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J Clin Microbiol*. 2001 Jul;39(7):2513-7.
203. Soong TW, Yong TF, Ramanan N, Wang Y. The *Candida albicans* antiporter gene *CNH1* has a role in Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> transport, salt tolerance, and morphogenesis. *Microbiology*. 2000 May; 146 (Pt5):1035-44.
204. Capoluongo E, Moretto D, Giglio A, Belardi M, Prignano G, Crescimbeni E, Cordiali-Fei P, Maini A, Di Carlo A, Mercantini R, Giannetti A, Ameglio F. Heterogeneity of oral isolates of *Candida albicans* in HIV-positive patients: correlation between candidal carriage, karyotype and disease stage. *J Med Microbiol*. 2000 Nov;49(11):985-91.



## **7. ANEXOS**

---

**Anexo 1.** Prevalência de *C. dubliniensis* (CD) nos diversos trabalhos referidos na literatura.

Local de isolamento das cepas		CD (%)	“não-albicans”	Referência Bibliográfica
África	África do Sul	12	NA	150
América Central	México	zero	<i>C. tropicalis</i> (8,2%) <i>C. glabrata</i> (7,1%) <i>C. parapsilosis</i> (1,2%)	135
América do Norte	EUA	5	<i>Candida tropicalis</i> (7%) <i>Candida glabrata</i> (0,2%) <i>C. parapsilosis</i> (2%) <i>C. lusitaniae</i> (1,5%)	50
		1,4	NA	153
		6,8	NA	152
		17	NA	154
		25	NA	151
América do Sul	Argentina	13	NA	155
	Brasil	1,15	NA	81
		0	<i>C. tropicalis</i> (2,8%) <i>C. glabrata</i> (9,2%) <i>C. krusei</i> (6,4%) <i>C. parapsilosis</i> (0,8%) <i>C. guilhermondi</i> (0,8%) <i>C. lusitaniae</i> (0,8%) <i>C. tropicalis</i> (2,8%) <i>C. glabrata</i> (3,5%) <i>C. parapsilosis</i> (0,7%) <i>C. krusei</i> (0,7%)	134
		0	<i>C. tropicalis</i> (2,8%) <i>C. glabrata</i> (3,5%) <i>C. parapsilosis</i> (0,7%) <i>C. krusei</i> (0,7%)	138
		0,5	NA	158
		2,8	<i>C. tropicalis</i> e <i>C. glabrata</i> (11,42%)	19
		2	NA	54
		5,8	<i>C. tropicalis</i> (1,93%) <i>C. glabrata</i> (5,8%)	137
		Venezuela	3,98	NA
	Ásia	China - Taiwan	0	<i>C. tropicalis</i> (2,1%) <i>C. glabrata</i> (3%) <i>C. parapsilosis</i> (3%) <i>C. lusitaniae</i> (1,5%)
Sul da Ásia		0	<i>C. tropicalis</i> <i>C. krusei</i>	142
Arábia Saudita		9	NA	148
	3,3	NA	149	
Europa	Alemanha	30	NA	136
	Irlanda	11	NA	52
	Itália	1,5	NA	157
	Turquia	0,9	NA	146
11,4		NA	147	

\* NT= não avaliado

## **8. APÊNDICES**

---

**Apêndice 1.****TERMO DE PARTICIPAÇÃO E CONSENTIMENTO**

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada "Pesquisa da Freqüência das Espécies e do Perfil e Sensibilidade Antifúngica de *Cândida* sp. em Indivíduos Soropositivos e Imunodependentes". Esse projeto, coordenado pela pesquisadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa Regina Baptista 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 e de uso individual, da parte interna de sua bochecha. Depois disso, faremos uma avaliação dos micróbios em laboratório. Essa coleta não trará 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 o 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa Rossit, no telefone 017- 210-5700 R.5887, na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Você também não terá nenhuma despesa com essa pesquisa. O material cedido destina-se apenas a análise científica e não pode ser comercializado ou fornecido como resultado de 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 dessa faculdade (0xx17 – 2105700 R. 5813).

São José do Rio Preto, \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_.

Nome do sujeito da pesquisa: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Endereço:

telefone:

RG do prontuário médico:

Médico Responsável:

Pesquisadora Responsável

Tábata Salum Calille

**FAMERP - Centro de Investigação de Microrganismos**

**FONE: (0xx17) 2105700 R. 5843/5887**

**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:  
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: Poliquimioterápico? 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.**

**Protocolo nº 5386/2002 Comitê de Ética da FAMERP**



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO  
AUTARQUIA ESTADUAL - LEI Nº 8899 ,de 27/09/94  
(Reconhecida pelo Decreto Federal nº 74.179, de 14/06/74 )

Parecer n.º 214/2002

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Protocolo nº. 5386/2002 sob a responsabilidade de Andrea Regina Baptista Rossit e Ricardo Luiz Dantas Machado com o título "Epidemiologia e diagnóstico molecular de Doenças Infecciosas e Parasitárias humanas" e os sub-projetos 1) Distribuição dos agentes causadores da malária e sua correlação com os polimorfismos eritrocitários, hemoglobinopatias e deficiência da G-6PD na Amazônia brasileira - 2) Avaliação da Prevalência e do Perfil de sensibilidade antifúngica em espécies do gênero *Candida* spp., em um hospital escola de nível terciário estão de acordo com a Resolução CNS 196/96 e foram aprovados por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 09 de dezembro de 2002.

  
PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. PATRÍCIA MALUF CURY  
COORDENADORA DO CEP/FAMERP