

**Mara Cristina Lopes Amorim**

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*  
NA CAVIDADE BUCAL E SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIFÚNGICA EM PACIENTES IRRADIADOS  
EM REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO E  
PORTADORES DE PRÓTESE REMOVÍVEL**

**Faculdade de Odontologia**

**Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG**

**Belo Horizonte**

**2012**

**Mara Cristina Lopes Amorim**

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *CANDIDA* NA  
CAVIDADE BUCAL E SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIFÚNGICA EM PACIENTES IRRADIADOS EM  
REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO E  
PORTADORES DE PRÓTESE REMOVÍVEL**

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-graduação da Faculdade de  
Odontologia da Universidade Federal de  
Minas Gerais, como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre em Estomatologia

**Orientador: Prof.Dr. Vagner Rodrigues Santos**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Evandro Neves Abdo**

**Colaboradores: Profa. Dra. Susana Johann**

**Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa**

**Faculdade de Odontologia - UFMG**

**Belo Horizonte**

**2012**

“Sentir tudo de todas as maneiras,  
Viver tudo de todos os lados,  
Ser a mesma coisa de todos os modos possíveis ao mesmo tempo,  
Realizar em si toda a humanidade de todos os momentos  
Num só momento difuso, profuso, completo e longínquo.”

***Fernando Pessoa***

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus que me deu o dom da vida;

Aos meus pais, José Maurício e Maria Tereza, pessoas maravilhosas que me conceberam, das quais tenho muito orgulho;

Às minhas queridas irmãs Lara, Nádia e Natália pelas confidências, desabafos, e especialmente à Nádia pelas análises dos dados;

Aos meus queridos orientadores Prof. Vagner Rodrigues Santos e Prof. Evandro Neves Abdo pela cumplicidade e por acreditarem em mim;

Ao professor Carlos Augusto Rosa e à professora Susana Johann pelo acolhimento e amizade no Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do ICB;

Ao professor Ozair Leite pelo eterno estímulo ao aprendizado;

À Betânia pela grandiosa ajuda, paciência e amizade em todas as fases desse projeto;

A todos os colegas de laboratório e a todos meus amigos que tiveram paciência e torceram por mim;

À Silvana do nosso laboratório de Microbiologia pela incondicionável ajuda e prontidão;

Ao Vladimir Noronha, grande colega, pela ajuda em todos os momentos difíceis;

Aos pacientes que permitiram as coletas e confiaram na elaboração deste trabalho;

Ao Tommy, ao Zac, ao Thunder e ao Floquinho pelas horas de caminhada e descontração;

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Ciclo da PCR.....	34
FIGURA 2: Componentes do Kit Candifast®: Bandeja de Identificação e Teste de Resistência (1); Frasco de Controle de Turbidez (2); Frasco de Diluição/Identificação (3), Frasco de Teste de Resistência (4).....	43
FIGURA 3: Candidose pseudomembranosa em palato, rebordo alveolar. Queilite angular em comissura bucal - Grupo 1 .....	50
FIGURA 4: Formas clínicas da candidose bucal encontrada no Grupo 1.....	51
FIGURA 5: Sítios de acometimento da candidose no Grupo 1.....	51
FIGURA 6: Formas clínicas da candidose no Grupo 2. Total de 12 pacientes.....	52
FIGURA 7: Sítios de acometimento da candidose no Grupo 2.....	52
FIGURA 8: Identificação de <i>C. albicans</i> utilizando o Candifast®.....	53
FIGURA 9: Identificação das leveduras (Grupo 1) utilizando o Kit Candifast®.....	54
FIGURA 10: Identificação das leveduras utilizando o kit Candifast®.....	54
FIGURA 11: Identificação presuntiva de <i>C. albicans</i> – CHROMagar® <i>Candida</i> com 2 morfotipos.....	55
FIGURA 12: Identificação presuntiva de <i>C. tropicalis</i> - CHROMagar® <i>Candida</i> . Observar a presença de outro morfotipo na placa (verde) no canto superior esquerdo.....	56
FIGURA 13: Identificação presuntiva de <i>C. krusei</i> – CHROMagar® <i>Candida</i> .....	57
FIGURA 14: Identificação presuntiva (Grupo 1) utilizando o meio CHROMagar® <i>Candida</i> : 27 amostras.....	58

FIGURA 15: Identificação presuntiva (Grupo 2) utilizando o meio CHROMagar® <i>Candida</i> : 25 amostras.....	58
FIGURA 16: As amostras semelhantes no CHROMagar® <i>Candida</i> foram colocadas lado a lado para a corrida em gel de agarose 1,5%. KB (padrão), (a- <i>C. albicans</i> ), (a1- <i>C. albicans</i> ATCC), (t- <i>C. tropicalis</i> ), (t1- <i>C. tropicalis</i> ATCC) (g- <i>C. glabrata</i> ), (g1- <i>C. glabrata</i> ATCC), (p- <i>C. parapsilosis</i> ATCC), (k- <i>C. krusei</i> ), (k1- <i>C. krusei</i> ATCC), (B-branco).....	59
FIGURA 17: Identificação pela PCR no Grupo 1.....	60
FIGURA 18. Identificação pela PCR no Grupo 2.....	61
FIGURA 19: Meio ágar Sabouraud mostrando o mesmo morfotipo de leveduras.....	62
FIGURA 20. Meio CHROMagar® <i>Candida</i> mostrando dois morfotipos de leveduras, no mesmo paciente: cor verde ( <i>C. albicans</i> ), cor bege ( <i>C. parapsilosis</i> ).....	63
FIGURA 21: Identificação das espécies de <i>Candida</i> utilizando três métodos (Grupo 1).....	64
FIGURA 22: Identificação das espécies de <i>Candida</i> utilizando três métodos (Grupo 2).....	65
FIGURA 23: Concentração Inibitória Mínima (CIM) para nistatina. Faixa Intervalar (16µg/mL- 0,031µg/mL). Fileira esquerda (1): Controle de Esterilidade; Fileira direita (12): Controle de Crescimento.....	67
FIGURA 24: Concentração Inibitória Mínima para o itraconazol: observar o efeito <i>trailing</i> em alguns pocinhos.....	68
FIGURA 25: Teste de resistência aos antifúngicos Candifast®: Positivo para anfotericina B e miconazol.....	69

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Formas clínicas de candidose bucal.....	19
TABELA 2: Dados Demográficos do Estudo: Descrição dos grupos de pacientes, número de indivíduos, gênero, idade e raça.....	48
TABELA 3: Grupo 1 - Comparação de diferentes métodos de identificação de <i>Candida</i> sp., em relação ao método Padrão-ouro PCR.....	66
TABELA 4: Grupo 2 – Comparação de diferentes métodos de identificação de <i>Candida</i> sp., em relação ao método Padrão-ouro PCR.....	66
TABELA 5: Perfis de susceptibilidade <i>in vitro</i> (CIM) de isolados clínicos de <i>Candida</i> utilizando metodologia CLSI ( $\mu\text{g/mL}$ ).....	70
TABELA 6: CIM 50, CIM 90 e intervalo ( $\mu\text{g/mL}$ ) para anfotericina B, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina em relação às espécies de leveduras estudadas (leitura 48 horas).....	71
TABELA 7: Resistência aos antifúngicos utilizando o teste bioquímico Candifast®.....	73
TABELA 8: Resistência aos antifúngicos em amostras onde a identificação Candifast® foi igual à PCR.....	74

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	91
ANEXO 2: Ficha Clínica.....	94
ANEXO 3: Aprovação do Projeto de pesquisa pelo COEP.....	97
ANEXO 4: Identificação de espécies de <i>Candida</i> através dos Kits Candifast®, meio CHROMagar® <i>Candida</i> e PCR EI 1 em pacientes portadores de prótese.....	98
ANEXO 5: Identificação de espécies de <i>Candida</i> através do Kits Candifast®, meio CHROMagar® <i>Candida</i> e PCR EI 1 em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço.....	99
ANEXO 6: Susceptibilidade antifúngica das amostras – Grupo 1.....	100
ANEXO 7: Susceptibilidade antifúngica das amostras – Grupo 2.....	101

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Formação de biofilme pela <i>Candida albicans</i> .....	18
2.2 Candidose em Pacientes Irrradiados de Cabeça e Pescoço.....	20
2.3 Pacientes Portadores de Estomatite por Dentadura.....	22
2.4 Tratamento com antifúngicos.....	25
2.4.1 Determinação <i>in vitro</i> da susceptibilidade a drogas antifúngicas: Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	28
2.4.2 Clinical and Laboratory Standarts Institute – CLSI.....	29
2.5 Métodos para identificação de <i>Candida</i> .....	30
2.5.1 API 20 C.....	30
2.5.2 Sistema CHROMagar® <i>Candida</i> .....	30
2.5.3 Prova do Tubo Germinativo.....	31
2.5.4 E-Test®.....	32
2.5.5 Teste bioquímico: KIT CANDIFAST® (International Microbio- France).....	33
2.5.6 PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia de Polimerase).....	34
2.5.6.1 Técnica da PCR em Tempo Real (RT-PCR).....	36
2.5.6.2 Técnica da PCR <i>Fingerprint</i> : Primer EI.....	37
2.5.6.3 Sequenciamento das subunidades D1/D2.....	38
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4. METODOLOGIA.....	40
4.1 Universo da amostra.....	40
4.2 Critérios de Inclusão da amostra.....	40
4.3 Critérios de Exclusão da amostra.....	41
4.4 Coleta dos micro-organismos.....	41

4.5	Isolamento e identificação das leveduras utilizando o Kit Candifast® e o meio CHROMagar® <i>Candida</i> .....	41
4.6	Extração do DNA das leveduras.....	43
4.7	Identificação molecular das leveduras: PCR-EI1.....	44
4.8	Sequenciamento da região D1D2 da subunidade maior do DNA ribossomal.....	45
4.9	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de seis drogas antifúngicas.....	46
4.10	Aspectos éticos e legais.....	47
5.	RESULTADOS.....	48
5.1	Número e distribuição dos pacientes.....	48
5.1.1	Identificação clínica da candidose e locais de acometimento da doença.....	49
5.2	Identificação das amostras.....	52
5.2.1	Identificação das amostras utilizando o Kit Candifast®.....	53
5.2.2	Identificação fisiológica das leveduras utilizando o meio CHROMagar® <i>Candida</i> .....	55
5.2.3	Identificação das leveduras por biologia molecular (PCR EI-1).....	58
5.3	Resultados dos testes de resistência aos antifúngicos.....	67
6	DISCUSSÃO.....	75
7	CONCLUSÕES.....	81
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
	ANEXOS.....	91

## RESUMO

A candidose é a doença de origem fúngica oral mais comum em seres humanos e apresenta uma variedade de características clínicas. Sendo causada principalmente pelo fungo *Candida albicans*, ela é considerada uma infecção oportunista, afetando principalmente indivíduos que são debilitados por outras doenças. Os avanços da medicina levaram ao prolongamento da sobrevivência de pacientes imunocomprometidos, como aqueles pacientes irradiados de cabeça e pescoço que apresentam neoplasias. Assim, houve um aumento da importância das doenças infecciosas causadas por fungos. A estomatite protética ou estomatite por dentadura é definida como um processo inflamatório de uma mucosa subjacente a uma prótese removível. Os agentes antifúngicos utilizados para o tratamento da candidose são particularmente tóxicos para as células humanas e o uso de tais fármacos tem de obedecer a critérios rígidos, para minimizar a possibilidade de resistência dos micro-organismos. Os testes bioquímicos para a detecção das espécies de *Candida* e para testar a resistência dos micro-organismos aos antifúngicos, como o Candifast®, têm se mostrado úteis, práticos e eficazes, assim como técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). A técnica da PCR possui a capacidade de amplificar uma seqüência precisa de DNA de forma simplificada, com elevada sensibilidade e especificidade. Os objetivos deste trabalho foram identificar as espécies de *Candida* em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço que apresentam neoplasias malignas (Grupo 1) e em pacientes que fazem uso de próteses odontológicas removíveis (Grupo 2), utilizando o Kit Candifast®, o meio CHROMagar® *Candida* e a técnica da PCR por impressão digital, usando o iniciador EI1 e o seqüenciamento (D1/D2), comparando estes métodos; avaliar a susceptibilidade das espécies de *Candida* coletadas dos 2 grupos de pacientes aos antifúngicos usuais presentes no Kit Candifast®; e, comparar essa susceptibilidade com o método de microdiluição (Concentração Inibitória Mínima, CIM). Foram avaliados 15 pacientes no Grupo 1 e 12 pacientes no Grupo 2. A forma clínica pseudomembranosa foi a prevalente no Grupo 1, enquanto que a estomatite por dentadura foi a forma clínica mais encontrada no Grupo 2. No Grupo 1, o kit Candifast® identificou 38,8% de *C. albicans*; 38,8% de *C. tropicalis*; 5,5% *C. krusei*, 5,5% *C. lusitaniae*, 5,5% de *C. parapsilosis* e 5,5% de *C. glabrata*. Para o Grupo 2, o Candifast® identificou 100% das amostras com sendo *C. albicans*. Considerando o meio CHROMagar® *Candida*, no Grupo 1, 9 amostras (33,3%) foram identificadas como *C. albicans*, 14 (51,9%) como *C. tropicalis*, e 2 (7,4%) como *C. krusei*. 2 amostras (7,4%) não foram identificadas por apresentarem outras colorações (branca e bege) não descritas pelo fabricante. Em relação ao Grupo 2, das 25 amostras isoladas pelo CHROMagar®, (60%) foram identificadas como sendo *C. albicans*, (16%) como *C. tropicalis*, (8%) como *C. krusei*; (12%) não foram identificadas. Pela técnica de impressão digital e pelo sequenciamento, os isolados foram identificados no Grupo 1 como *C. albicans* (37,1%); como *C. tropicalis* (55%) e (7,4%) como *C. krusei*. No Grupo 2 a PCR permitiu a identificação de 68% de *C. albicans*, 20% de *C. tropicalis*, 8% de *C. glabrata* e 4% de *C. parapsilosis*. Em relação ao perfil de susceptibilidade antifúngica, a maioria dos isolados foi sensível aos seis antifúngicos testados pela técnica de CIM (anfotericina B, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina). No grupo 1 os isolados *C. tropicalis* se mostraram os mais resistentes ao fluconazol (33%), enquanto que a *C. albicans* mostrou maior resistência ao miconazol. 100% dos isolados identificados como *C. krusei* foram resistentes ao fluconazol. No Grupo 2, dentre os antifúngicos testados, o fluconazol foi o que mostrou maior grau de resistência dos isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*. A nistatina foi o antifúngico com o melhor perfil

de susceptibilidade, sendo que todos os isolados se mostraram sensíveis a ele. O teste de resistência do Kit Candifast® mostrou índices de resistência maiores dos isolados quando comparados com o ensaio de CIM. Quase 100% dos isolados foram resistentes ao miconazol no grupo 1 e no grupo 2, 64,2% dos isolados foram resistentes ao miconazol e ao fluconazol. Assim, este Kit foi falho na identificação de várias espécies de *Candida*, pois comparando com o método de identificação molecular utilizado, houve grande divergência nos resultados apurados. O meio CHROMagar® *Candida* foi um bom método para a identificação presuntiva das espécies de *Candida*. A droga nistatina pode ser utilizada como primeira escolha para o tratamento das candidoses orais em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço e em pacientes portadores de prótese, com base nos resultados encontrados.

Palavras Chave: *Candida* spp, identificação, pacientes, radioterapia, próteses removíveis, métodos de identificação

## ABSTRACT

### “Identification of *Candida* species in oral cavity and antifungal susceptibility in patients receiving radiation for head and neck cancer and in patients with removable prosthesis”

Candidiasis is the most common oral fungal infection in humans and includes a variety of clinical features. Being mainly caused by the fungus *Candida albicans*, it is considered an opportunistic infection, affecting mainly people who are debilitated by other diseases. Advances in medicine have led to prolonged survival of immunocompromised patients, such as those patients irradiated for head and neck neoplasias. Thus, there was an increased importance of infectious diseases caused by fungi. The denture stomatitis and denture stomatitis is defined as an inflammation of a mucosa underlying a denture. The antifungal agents used for the treatment of candidiasis are particularly toxic to human cells and use of such drugs must comply with strict criteria, to minimize the possibility of resistance of the microorganisms. BiocheCIMal tests for the detection of candida species and to test the resistance of microorganismas to antifungals such as Candifast®, have proven useful, practical and effective, as well as molecular techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR). The PCR technique has the ability to amplify a precise sequence of DNA in a simplified manner, with high sensitivity and specificity. our objectives were to identify the species of candida in patients irradiated in the head and neck malignancies that present (Group 1) and in patients who use removable dental prosthesis (Group 2), using the Candifast® kit, CHROMagar® *Candida* and PCR E11, comparing these methods, to evaluate the susceptibility of *Candida* species collected from two groups of patients to antifungal agents present Candifast® kit, and compare this with the MIC (Minimal Inhibitory Concentration), a susceptibility microdilution method. 15 patients in Group 1 and 12 patients in Group 2 were studied. The pseudomembranous clinical candidosis was more prevalent in Group 1, while the denture stomatitis was the most frequent clinical form in Group 2. In Group 1, the Candifast® kit identified 38.8% of *C. albicans*, 38.8% *C. tropicalis*, 5.5% *C. krusei*, 5.5% *C. lusitaniae*, 5.5% *C. parapsilosis* and 5.5% *C. glabrata*. For Group 2, Candifast® identified 100% of samples with *C. albicans*. Considering the CHROMagar® *Candida*, in group 1, 9 samples (33.3%) were identified as *C. albicans*, 14 (51.9%) as *C. tropicalis*, and 2 (7.4%) as *C. krusei*. Two samples (7.4%) were not identified because they had other colors (white and beige), not described by the manufacturer. Compared to Group 2 of the 25 isolates CHROMagar® (60%) were identified as *C. albicans*, (16%) as *C. tropicalis*, (8%) as *C. krusei*; (12%) were not identified. PCR (E11 and NLI/NL4) identified in Group 1 as *C. albicans* (37.1%), as *C. tropicalis* (55%), (7.4%) as *C. krusei*. In Group 2 PCR allowed the identification of 68% *C. albicans*, 20% as *C. tropicalis*, 8% as *C. glabrata* and 4% *C. parapsilosis*. Regarding the antifungal susceptibility profile, most isolates were sensitive to six antifungal agents tested in CIM technique (amphotericin B, ketoconazole, fluconazole, itraconazole, miconazole and nystatin). In Group 1 isolates *C. tropicalis* proved more resistant to fluconazole (33%), while *C. albicans* showed greater resistance to miconazole. 100% of the strains identified as *C. krusei* were resistant to fluconazole. In group 2, among the tested antifungals, fluconazole was the one that showed a higher degree of resistance of *C. albicans* and *C. tropicalis*. The antifungal drug nystatin was better with the susceptibility profile, at the time when all isolates were sensitive to it. The endurance Candifast® kit showed higher resistance rates of isolates compared to the MIC. Almost 100% of the isolates were resistant to miconazole in Group 1 and Group 2, 64.2% were resistant to miconazole and fluconazole. Thus, this kit was flawed in the identification of several *Candida* species, as compared with the method used for molecular identification (PCR). There was great divergence in the

outcome. CHROMagar® *Candida* was a good method for the presumptive identification of *Candida* species. The drug nystatin can be used as first choice for treatment of oral candidosis in patients irradiated in the head and neck in patients with prosthesis.

Key Words: *Candida* spp, identification, patients, radiotherapy, removable dentures, identification methods

## 1. INTRODUÇÃO

A candidose ou candidíase é a doença fúngica bucal mais comum no ser humano, e pode apresentar diversas manifestações clínicas, tornando seu diagnóstico muitas vezes difícil.

No passado, a candidose era considerada apenas uma infecção oportunista, que afetava pacientes debilitados por outras doenças. Entretanto, hoje se sabe que a candidose bucal pode ocorrer em pessoas relativamente saudáveis, como resultado de uma interação complexa entre hospedeiro e micro-organismo (REGESI et al., 2008; SHOLAPURKAR et al., 2009).

Dentre as espécies de *Candida* conhecidas, a *Candida albicans* é a mais freqüente na cavidade bucal e a mais citada nos trabalhos científicos. No entanto, outras espécies vêm sendo identificadas em pacientes que apresentam candidíase, o que justifica atualmente um maior interesse em se pesquisar os outros micro-organismos deste gênero.

Os avanços da medicina levaram ao prolongamento da sobrevivência de pacientes imunocomprometidos e ao aumento da importância das infecções oportunistas por fungos. A *Candida* é a levedura oportunista mais comum e causa infecções graves, caracterizadas por elevadas taxas de mortalidade. Os agentes antifúngicos são particularmente tóxicos para as células humanas e o uso de tais fármacos tem de obedecer a critérios rígidos. Todavia, uma terapia antifúngica precoce e agressiva que leve em conta o agente etiológico envolvido pode melhorar o prognóstico dos pacientes infectados (EPSTEIN et al., 2002; MIROWSKI et al., 1997).

Devido ao fato do tratamento instituído a esses pacientes não ser sempre específico, tem-se observado nos dias atuais um aumento significativo da resistência das espécies de *Candida* aos antifúngicos presentes no mercado. Isso pode ser devido à instituição de um tratamento longo e pela incorreta seleção dos princípios ativos em relação ao agente etiológico da infecção ou ainda pela seleção de espécies ou linhagens com resistência intrínseca às drogas utilizadas. Todo este processo gera efeitos colaterais, como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Assim, é de extrema relevância a identificação precisa da espécie de *Candida* infectante, bem como o estabelecimento de protocolos específicos de tratamento, pois conhecendo o micro-organismo e sua susceptibilidade aos antifúngicos usuais, pode-se tratar o paciente de forma mais eficaz e menos agressiva (GABLER, 2008; SOYSA, 2003).

Estudos epidemiológicos relacionados à candidose em pacientes portadores de prótese são de grande importância para se avaliar a prevalência dessa doença. A correta identificação

das espécies isoladas, a verificação de fatores de virulência e a análise do perfil de susceptibilidade dos agentes antifúngicos a esses micro-organismos podem contribuir para o desenvolvimento de outras pesquisas e determinar novas propostas terapêuticas para o tratamento das candidoses (BUDTZ-JÖRGENSEN et al, 2000)

As técnicas de laboratório convencionais para identificação de leveduras (características de cultura, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas) têm um tempo de liberação (“turnaroundtime”) longo. Nessas condições, ferramentas mais rápidas e mais sensíveis, de base molecular, são de grande valor.

Nos últimos anos, alguns meios cromógenos de cultura com capacidade de diferenciar a espécie *C. albicans* e outras leveduras de interesse clínico têm surgido. Esses meios de cultura para fungos se baseiam na alteração da cor desenvolvida pelas colônias através de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromógenos. O meio CHROMagar *Candida*® produzido pela Difco, tem sido utilizado para isolar e identificar presuntivamente algumas espécies de *Candida* presentes na cavidade bucal, dentre elas a *C. albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*. Este meio se baseia na utilização do substrato  $\beta$  glicosaminidase e diferencia as leveduras de acordo com a morfologia e a cor das colônias. Sua utilização facilita a detecção e a identificação destas leveduras e também fornece resultados em menor tempo que os obtidos por métodos tradicionais (MADHAVAN et al., 2010).

Os testes bioquímicos para a detecção das espécies de *Candida* e para testar a resistência dos micro-organismos aos antifúngicos, como o Candifast®, têm-se mostrado úteis, práticos e eficazes, assim como técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). O segredo do sucesso da PCR reside na capacidade que ela tem de amplificar uma sequência precisa de DNA aliada à sua simplicidade, rigor, elevada sensibilidade e especificidade (BARROS LOPES et al., 1996)

O objetivo do presente trabalho é identificar as espécies de *Candida* em pacientes irradiados de cabeça e pescoço que apresentam neoplasias malignas e em pacientes que fazem uso de próteses odontológicas removíveis, utilizando o meio de cultura CHROMagar® *Candida*, testes bioquímicos, como o Candifast® e testes moleculares como a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) e comparar a susceptibilidade aos antifúngicos utilizando o método de microdiluição (CIM) e o teste bioquímico do Candifast®.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

As leveduras do gênero *Candida* são classificadas no Reino Fungi como Phylum Ascomycota, ordem Saccharomycetales, família Candidaceae. O gênero *Candida* se produz por brotamento, de forma assexuada e as leveduras desse gênero possuem tanto a capacidade fermentativa quanto a assimilativa, sendo assim capazes de crescer em um número grande de substratos orgânicos e meios de cultura, como o Ágar Sabouraud, Ágar Fubá e CHROMagar®. Em relação à faixa de temperatura de crescimento, esses micro-organismos são classificados como mesófilos, crescendo preferencialmente entre 18°C e 45°C (KURTZMAN et al., 2010). A maioria das espécies patogênicas tem um crescimento ideal em cultivos anaeróbios, mas crescem satisfatoriamente sob condições de taxas elevadas de gás carbônico atmosférico. Tanto em meios ricos como pobres de nutrientes com faixa de pH variando entre 2,5 a 7,5 o crescimento desses micro-organismos é expressivo (ODDS, 1988).

A candidíase ou candidose é uma doença infecciosa causada principalmente pela espécie *C. albicans*. Outros membros do gênero *Candida* como a *C. tropicalis*, a *C. Krusei*, a *C. parapsilosis* e *C. guilliermondi* podem ser também encontradas na cavidade bucal, porém raramente causam a doença. A *C. albicans* pode apresentar-se de duas formas: levedura ou hifa. Acredita-se que a forma de levedura seja inócua, porém a forma de hifas está freqüentemente associada com a invasão dos tecidos do hospedeiro (NEVILLE et al. 2009).

A candidose é a doença micótica bucal mais comum, embora os índices de freqüência sejam difíceis de determinar devido a uma alta prevalência desse micro-organismo na população (LINCH, 1994; MAUTONI, 1997; SHOLAPURKAR et al., 2009). Além das espécies de *Candida* citadas acima, Regesi et al.(2008) citam outras duas espécies, como a *C. glabrata* e a *C. pseudotropicalis*.

A *C. albicans* é um micro-organismo comensal presente na cavidade bucal da maioria das pessoas saudáveis. A transformação ou passagem desse fungo de comensal para patógeno está relacionada com fatores locais e sistêmicos do hospedeiro (SOYSA et al., 2004).

As infecções fúngicas, especialmente aquelas causadas por leveduras, aumentaram significativamente nos últimos dez anos. A maioria delas é saprófita, mas pode se tornar patogênica quando o hospedeiro apresentar fatores de predisposição. As características clínicas das lesões causadas por essas leveduras são bem variadas: podem provocar lesões cutâneas, mucocutâneas e até mesmo afecções septicêmicas e viscerais (KOENIG et al., 1989; SOYSA et al., 2004).

Para Pereira-Cenci et al.(2008), a existência de espécies de *Candida* comensais varia de 20% a 50% em uma população dântula saudável. A incidência de *C. albicans* intra oral, segundo Neville et al. (2009), está entre 30 a 50% nos pacientes, sem evidência clínica de infecção.

Existem três fatores que podem fazer com que um indivíduo portador de *Candida* passe a apresentar sinais clínicos de infecção como o estado imunológico do hospedeiro, o meio ambiente da mucosa bucal e a resistência da *C. albicans*.

A candidose oral está associada com fatores locais, como xerostomia, uso de próteses, uso de tabaco e também com fatores sistêmicos, incluindo as condições imunossupressivas, causadas ora por doenças, ora por medicamentos (SHOLAPURKAR et al., 2009).

Regesi e Sciuba (2008) citam outros fatores predisponentes da candidíase, como a imaturidade imunológica da infância, os distúrbios endócrinos, como o diabetes, hipoparatiroidismo, a gravidez, o câncer avançado, a desnutrição, a antibioticoterapia sistêmica, a quimioterapia do câncer e outras formas de imunossupressão, como em pacientes HIV positivo e naqueles que fazem uso de corticóide em terapia sistêmica.

A candidose da mucosa bucal pode apresentar formas clínicas variadas. A maioria dos pacientes apresenta uma forma, no entanto em alguns casos pode haver mais de uma manifestação em um mesmo indivíduo. As formas clínicas principais relatadas por Neville et al. (2009) e Sahand et al. (2009) são: candidose pseudomembranosa; a candidose eritematosa, cuja principal apresentação clínica é a candidose atrófica aguda; glossite romboidal mediana (atrofia papilar central); queilite angular; candidose multifocal crônica; a estomatite por dentadura (candidose atrófica crônica); candidose hiperplásica; candidose mucocutânea e a síndrome candidose endócrina. As principais manifestações clínicas, seus principais sinais e sintomas são mostrados na Tabela 1.

Para Sahand et al. (2009) a forma oral da candidose é a mais prevalente e a maioria dos pacientes com candidose oral tem algum grau de imunossupressão, que pode ser vista em pacientes HIV positivos, em pacientes que estão sendo submetidos a quimioterapia ou em pacientes que estão fazendo uso de agentes imunossupressores, como nos casos de pacientes submetidos a transplantes. Outros fatores podem favorecer o aparecimento da candidose, entre eles a xerostomia e um complexo conjunto de fatores de virulência dos fungos, incluindo as adesinas, que mediam a adesão da *Candida* às células epiteliais.

## 2.1. Formação de biofilme pela *Candida albicans*

Os biofilmes consistem em um conjunto de células embebidas em uma matriz extracelular, aderidas irreversivelmente às superfícies sólidas. Eles representam a forma mais prevalente de crescimento microbiano na natureza, sendo cruciais para o desenvolvimento das infecções clínicas (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

A formação de biofilme por *C. albicans* ocorre por adesão de uma camada de células flutuantes leveduriformes a uma superfície, e sobre estas, uma camada de formas filamentosas rodeadas por uma matriz de polissacarídeos. O material extracelular produzido pela espécie *C. albicans* contém carboidratos, proteínas e outros componentes ainda desconhecidos, sendo esta composição diferente das células não aderidas (planctônicas). Segundo Baillie e Douglas (2000), o biofilme é muito mais forte e estável do que o crescimento planctônico, apresentando maior resistência aos medicamentos terapêuticos. Estudos recentes têm sugerido que espécies de *Candida* com grandes habilidades na formação de biofilmes tendem a ser mais virulentas (WILLIAMS et al., 2011).

A superfície para a adesão do biofilme pode ser viva ou inerte. A adesão dos microrganismos é um processo complexo com muitas variáveis que afetam sua formação. Assim, o seu crescimento requer um complexo desenvolvimento de vias metabólicas que envolvem uma série de eventos, os quais são regulados em resposta ao meio ambiente e aos microrganismos. A superfície deve ter características que são importantes no processo de adesão, sendo que a colonização microbiana parece se incrementar melhor em superfícies rugosas (PRAKASH et al., 2003).

Características como pH, níveis de nutrientes, ferro, oxigênio, forças iônicas, e temperatura podem ter um papel importante na adesão microbiana à superfície (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

Tabela 1- Formas Clínicas de Candidose Bucal

<b>TIPO CLÍNICO</b>	<b>SINAIS E SINTOMAS</b>	<b>LOCALIZAÇÕES COMUNS</b>	<b>FATORES ASSOCIADOS E OBSERVAÇÕES</b>
<b>Pseudomembranosa</b>	Placas brancas, cremosas, destacáveis, queimação e halitose	Mucosa jugal, língua e palato	Antibioticoterapia e imunossupressão
<b>Eritematosa: Ex. Candidose atrófica aguda</b>	Máculas vermelhas, sensação de queimação	Região post. palato duro, mucosa jugal e dorso de língua	Antibioticoterapia, xerostomia, imunossupressão, idiopática
<b>Atrofia Papilar Central (Glossite Romboidal Mediana)</b>	Áreas mucosas atróficas, assintomáticas	Linha média da região posterior do dorso lingual	imunossupressão, idiopática
<b>Multifocal Crônica</b>	Áreas vermelhas, freqüentemente com placas brancas removíveis, sensação de queimação	Região post. palato, posterior do dorso lingual, ângulos da boca	imunossupressão, idiopática
<b>Queilite Angular</b>	Lesões vermelhas fissuradas, irritadas, sensação de ferimento	Ângulos da boca	imunossupressão, idiopática, perda de dimensão vertical
<b>Estomatite por Dentadura (Candidose Atrófica Crônica)</b>	Vermelhas, assintomáticas	Limitada à superfície do palato que suporta a prótese	A prótese é positiva em cultura, mas não a mucosa – provavelmente não é uma infecção verdadeira
<b>Hiperplásica (leucoplasia por Candida)</b>	Placas brancas que não podem ser removidas, assintomáticas	Região anterior da mucosa jugal	Idiopática, imunossupressão, cuidado para não confundir com outras lesões ceratóticas
<b>Mucocutânea</b>	Placas brancas, algumas removíveis, áreas vermelhas	Língua, mucosa jugal, palato	Rara, hereditária, disfunção imune idiopática esporádica

Fonte: NEVILLE et al., 2009

## 2.2- Candidose em Pacientes Irrradiados de Cabeça e Pescoço

A cada ano, aproximadamente 500.000 novos casos de câncer de cabeça e pescoço são diagnosticados no mundo. Os tratamentos de escolha para este tipo de câncer são a cirurgia, a radiação ou a combinação desses dois métodos (SHIBUYA et al., 2002).

A quimioterapia é restrita para tratamento de neoplasias malignas nas regiões de cabeça e pescoço. Ela é geralmente empregada em casos de tumores avançados. Embora a radioterapia seja efetiva no controle do câncer de cabeça e pescoço, alguns efeitos colaterais são indesejáveis e podem agravar o estado de saúde do paciente. Alterações na pele, mucosa, ossos, glândulas salivares e dentes podem ser observadas como dermatite, mucosite, atrofia e degeneração dos ácinos das glândulas salivares. Em seus trabalhos, Bonan et al. (2003) concluíram que em pacientes com neoplasias de cabeça e pescoço a radioterapia promove uma importante redução do fluxo salivar durante e após o tratamento.

Os pacientes que apresentam neoplasias malignas e se submetem à radioterapia e à quimioterapia são imunocomprometidos, assim como os pacientes transplantados de medula óssea, os pacientes que necessitam de terapia intensiva e os pacientes portadores do vírus HIV. Todos esses pacientes são particularmente susceptíveis às infecções fúngicas oportunistas, como as candidoses, as criptococoses e a aspergilose, que são doenças que raramente ocorrem em pacientes saudáveis (ALMEIDA e SCULLY, 1992; EPSTEIN et al, 1993; SAHAND et al, 2009).

Segundo Epstein et al. (2002), Mirowski et al. (1997), Neville et al. (2009) Sixou et al.(1996), as infecções são a maior causa de mortalidade entre os pacientes imunocomprometidos portadores de câncer. A presença de colônias de fungos na cavidade oral de pacientes submetidos à quimioterapia tem sido muito descrita na literatura. Os fungos podem ser isolados da saliva em 80% destes pacientes, fazendo assim parte da microflora predominante da cavidade oral. O aumento da prevalência de *Candida* em números absolutos e em também em proporção na flora bucal tem sido também confirmados. Relatos de aparecimento de lesões associadas ao aumento da concentração desses micro-organismos na saliva têm aumentado o interesse em pesquisar esses patógenos oportunistas. Lesões bucais com características inflamatórias devido à *Candida* – candidoses - têm sido largamente encontradas em pacientes que apresentam leucemia. Além da cavidade bucal, a candidose pode acometer a orofaringe e em casos mais graves causar septicemia. As espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* são as espécies mais frequentemente encontradas nesses pacientes.

Assim, a candidose oral é a doença provocada por fungos mais comum em indivíduos com câncer de cabeça e pescoço, especialmente quando esses pacientes são submetidos à radioterapia. Normalmente nesses pacientes há relatos de colonização oral de *Candida* acima de 93%, e infecção em torno de 30%. A radiação utilizada para o tratamento do câncer pode provocar mudanças histológicas na cavidade oral, resultando no aparecimento de mucosite e alterações na quantidade e qualidade da saliva. Estudos recentes têm demonstrado que as candidoses apresentadas por esses pacientes não são causadas somente pela *C. albicans*. Espécies não-*albicans* tem sido frequentemente encontradas nesses pacientes submetidos à radioterapia causando infecções (REDDING et al., 1999; REDDING et al., 2001).

Embora a *C. albicans* seja a principal responsável pelas candidoses na cavidade bucal, pois faz parte da microflora indígena, outras espécies do fungo, além da *C. tropicalis* já citada, têm sido descritas também na literatura como responsáveis pelas infecções bucais. São elas: *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* e *C. dubliniensis* (SULLIVAN e COLEMAN, 1998; VELEGRAKI et al., 1996).

Nos seus experimentos, Belazi et al. (2004) identificaram as principais espécies de *Candida* em pacientes submetidos à radioterapia e utilizaram testes de susceptibilidade das amostras coletadas aos antifúngicos. Dos 39 pacientes que apresentavam candidose na pesquisa, 23 pacientes apresentavam a *C. albicans* (59%), 3 pacientes apresentavam a *C. glabrata* (8%), seguido de *C. kefyr* em 2 pacientes (5%), *C. tropicalis* em 1 paciente (3%) e *C. krusei* em 1 paciente (3%). A mucosite não associada com a candidose foi diagnosticada em 9 pacientes (23%), no entanto a mucosite oral associada com a candidose foi diagnosticada em 30 pacientes (77%).

Os testes *in vitro* de susceptibilidade aos antifúngicos podem ser indicados em casos onde há uma infecção confirmada por *Candida*. Esses testes detectam se há resistência aos azólicos normalmente utilizados na terapia antifúngica. Nos resultados dos pesquisadores, 8 das 23 amostras de *C. albicans*, 2 das 3 de *C. glabrata*, e 2 das 2 de *C. krusei* isoladas se mostraram resistentes ao fluconazol e sensíveis dose-dependentes ao itraconazol, enquanto que todas as colônias isoladas demonstraram pequeno valor de CIM (concentração inibitória mínima) ao voriconazol. Assim o antifúngico voriconazol pode ser um medicamento alternativo para o tratamento da candidose oral.

Jham et al. (2007), realizaram um estudo piloto em 21 pacientes com o objetivo de identificar as espécies de *Candida* responsáveis pela colonização e infecção na cavidade oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Esses pacientes foram avaliados antes, durante e após a radioterapia. Utilizando o teste bioquímico para a identificação das espécies de

*Candida* - Candifast® (International Microbio–France), os autores concluíram que durante a radioterapia a colonização e a infecção por *Candida* aumentam significativamente. Observaram também que antes da radioterapia, nos pacientes que tinham a cavidade oral colonizada por *Candida* (43%), todas as espécies encontradas eram de *C. albicans*. No entanto, durante o tratamento radioterápico, a colonização pelas espécies não-*albicans* aumentou significativamente, em detrimento à colonização pela espécie *C. albicans* que teve uma diminuição considerável (para 24%). As principais espécies de *Candida* não-*albicans* encontradas foram: *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. lusitanae*. Segundo os autores, essas mudanças de espécies encontradas no estudo não foram devidas ao uso de antifúngicos, pois essa variação também foi encontrada naqueles pacientes que não fizeram uso de qualquer medicação.

O aumento da incidência de candidíase oral, observada em pacientes com doenças malignas, deve-se particularmente à radioterapia utilizada de forma isolada ou em combinação com outras terapias, como a quimioterapia. Os efeitos dessas formas de tratamento vão depender do tipo da lesão neoplásica, do estágio em que se encontra e do seu grau de malignidade. A administração de antibióticos de largo espectro pode também predispor o paciente à candidose oral. A incidência dessa lesão nos pacientes é muito variável, devido principalmente à existência de inúmeros regimes terapêuticos empregados nas diversas partes do mundo (SOYSA, 2003).

Belazi et al. (2004) citam que após 2 semanas aproximadamente da radioterapia, o número de espécies de *Candida* aumenta significativamente. Assim, começam a aparecer as candidoses, que muitas vezes estão associadas às mucosites, causando grande desconforto aos pacientes, sendo inclusive causa de abandono dos tratamentos radioterápicos. Além disso, os altos níveis de leveduras presentes na cavidade bucal desses pacientes podem persistir por até 6 meses após o término da radioterapia (ROSSIE et al., 1997).

### **2.3- Pacientes portadores de Estomatite por Dentadura**

As infecções fúngicas têm recebido uma atenção especial devido a um aumento da sua prevalência em todo o mundo. Numerosos estudos têm mostrado que as espécies *Candida* possuem uma grande variedade de mecanismos que permitem a colonização e infecções bem sucedidas em um hospedeiro susceptível (PEREIRA-CENCI et al., 2008).

A estomatite por dentadura é a alteração que acomete a mucosa de suporte das próteses totais e que se caracteriza por hiperemia e edema, podendo a inflamação ser moderada ou intensa. Embora o tecido apresente-se hiperêmico e inflamado, a estomatite por dentadura é freqüentemente assintomática, entretanto, a mucosa pode mostrar-se hemorrágica e o paciente pode sentir prurido, queimação, sintomatologia dolorosa, sabor desagradável, bem como apresentar halitose e xerostomia (BUDTZ-JORGENSEN, 1990).

Pacientes portadores de próteses totais apresentam com freqüência esta condição, com a qual se associa a *C. albicans*, determinando a chamada candidíase eritematosa que na literatura também pode ser encontrada com outras nomenclaturas: estomatite por dentadura, estomatite por *Candida*, ou candidíase atrófica crônica (NEWTON, 2003).

A *C. albicans* normalmente vive como comensal e inócua e coloniza vários *habitats* em seres humanos, como peles e mucosas. A existência de espécies de *Candida* comensais varia de 20% a 50% em uma população dântula saudável. Como o crescimento em superfícies é parte natural do “estilo de vida” desses fungos, é esperado que ocorra a colonização da *Candida* numa prótese. Existem evidências de que a *Candida* possa aderir em próteses feitas de resina acrílica. A levedura pode aderir diretamente à prótese ou via uma camada de placa já aderida à base da dentadura (polimetilmetacrilato – PMMA). Sem essa aderência, os microorganismos seriam facilmente removidos da cavidade oral quando a saliva ou os alimentos estivessem sendo deglutidos (PEREIRA-CENCI et al., 2008).

Segundo Oliveira et al.(2010) a estomatite por dentadura (DS) é considerada uma forma de candidose orofaríngea e é definida como um processo inflamatório da mucosa subjacente a uma prótese removível.

A candidose oral afeta 65 a 93% dos pacientes idosos que são portadores de próteses totais. Essa infecção, quando diagnosticada, deve ser tratada de forma local, ou seja, no sítio específico em que ela se encontra. Somente os casos bem indicados devem ser tratados com antifúngicos sistêmicos (SHOLAPURKAR et al., 2009).

A etiologia da estomatite por dentadura mostra-se extremamente variável, sendo considerada multifatorial. Além da infecção por *Candida* como já relatada, a placa microbiana, o trauma, o uso contínuo da dentadura e a xerostomia constituem fatores predominantes na patologia desta alteração. A freqüente associação entre *Candida*, especialmente a *C. albicans* com estomatite por dentadura, vem sendo relatada há bastante tempo na literatura (MESQUITA et al., 1998; WILSON, 1998).

O papel da saliva humana no processo de adesão da *Candida* ainda é controverso. A saliva apresenta um efeito físico de limpeza e possui moléculas de defesa, incluindo a

lisosima, a histatina, a lactoferrina, a calprotectina e a IgA, que interagem com as espécies de *Candida* diminuindo a aderência e a colonização de superfícies orais. Outros componentes da saliva incluindo mucinas, estaterina e proteínas ricas em prolina têm sido descritos como agentes facilitadores para a adesão da *Candida* às resinas acrílicas cobertas com saliva (PEREIRA-CENCI et al., 2008).

Oliveira et al. (2010), em seus experimentos identificaram os principais fungos envolvidos com a candidose de pacientes que usavam prótese e avaliaram a presença ou ausência de leveduras na circulação sanguínea desses pacientes. Concluíram que a *C. albicans* foi a espécie isolada mais comum das próteses de maxila e da mucosa do palato. Em 2 das 14 amostras foram encontradas *C. albicans* associada com *C. dubliniensis*. Em seus resultados não foram encontradas *C. albicans* na circulação sanguínea. No entanto uma forte correlação entre a estomatite por dentadura e a presença da *Candida* sp. oral foi confirmada nesses pacientes. Embora antígenos de *Candida* não tenham sido encontrados no sangue dos pacientes, a prescrição de drogas antifúngicas sistêmicas poderia facilitar a defesa imunológica contra as leveduras e evitar a persistência de uma infecção.

Pinto et al. (2008) estudaram as enzimas fosfolipases e a secreção de proteinases em leveduras do gênero *Candida*, descritas na literatura como importantes fatores de virulências desses micro-organismos. Além disso, a formação do tubo germinativo pela *C. albicans* é associada com a capacidade invasiva desses fungos e é também considerada um mecanismo importante de patogenicidade. Os autores estudaram a candidose de 70 pacientes que apresentavam estomatite por dentadura e utilizavam prótese superior e compararam com 70 indivíduos que apresentavam mucosa palatina normal. A presença da espécie *C. dubliniensis* foi avaliada e a susceptibilidade desses micro-organismos ao fluconazol foi também testada. Como resultado de suas pesquisas, a *C. albicans* foi a única espécie que produziu a fosfolipase e o tubo germinativo. Nos casos onde havia infecção, os níveis de fosfolipase eram muito elevados, em comparação com os casos onde o fungo era comensal. No entanto as cepas isoladas dos pacientes com estomatite por dentadura e as cepas isoladas nos pacientes saudáveis mostraram os mesmos fatores de virulência. Assim, para o processo de infecção, vários outros fatores devem ser considerados. A *C. glabrata* mostrou pouca sensibilidade e pequena resistência ao fluconazol e amostras de *C. dubliniensis* não foram encontradas nesses pacientes portadores de estomatite por dentadura.

As candidíases associadas à estomatite por dentadura não são de fácil tratamento. Geralmente recidivas ocorrem após a interrupção do mesmo, ainda que o trauma causado pela prótese tenha sido eliminado por meio de substituição por nova prótese. Logo se tornam um

desafio na prática clínica, face à sua frequência e ao pequeno número de drogas antifúngicas disponíveis em nosso meio (JEAN *et al.*, 2003).

Existe uma correlação entre a precariedade da saúde bucal de portadores de prótese total, má higiene e lesões da mucosa bucal com a maior incidência de estomatite protética. Atualmente observa-se um aumento da expectativa de vida. Assim, a necessidade de próteses muco-suportadas persistirá ainda por muitos anos em virtude das limitações impostas pelas condições de saúde e até mesmo econômicas dos pacientes (OLIVEIRA *et al.*, 2007)

#### **2.4- Tratamento com Antifúngicos**

Com o advento das várias terapias para o tratamento de pacientes portadores de neoplasias e pacientes HIV positivos, a cada ano surgem novos pacientes imunocomprometidos que estão mais propensos a ter infecções severas provocadas por fungos, principalmente na forma de leveduras. Espécies ditas “*albicans*” são mais prevalentes, no entanto nos últimos anos as espécies “*não albicans*” têm sido amplamente identificadas. Alguns estudos sugerem que este aumento na incidência das espécies *não-albicans* seja devido ao uso não controlado de agentes antifúngicos azólicos especialmente o fluconazol (WINGRARD, 1995).

Lyman e Walsh (citados por FIGUEIREDO, 2006) relatam que alguns grupos de drogas podem ser utilizados no tratamento das candidoses orais, entre eles os derivados azólicos. Essas drogas são compostos sintéticos com boas propriedades farmacocinéticas que vem sendo utilizados em escala progressiva substituindo muitas vezes a anfotericina B, que apresenta alta toxicidade. Embora haja diferença na estrutura química das diversas drogas que compõem este grupo, é suposto que elas compartilham mecanismo de ação comum. A estrutura química dos azólicos compreende basicamente um ou mais anéis de 5 átomos de carbono (anel azólico), unido (s) ao restante da molécula por ligação do tipo C-N. Os imidazólicos (miconazol e cetoconazol) contêm dois átomos de nitrogênio no anel azólico enquanto que, para os triazólicos (fluconazol e itraconazol) um terceiro átomo de nitrogênio foi introduzido neste anel.

O mecanismo de ação primário dos derivados azólicos envolve a inibição da biossíntese do ergosterol, que é o produto final da via metabólica de esteróis fúngicos. Isso ocorre por meio da inibição seletiva da enzima 14  $\alpha$ -demetilasa, dependente do citocromo P-450, que participa da sequência de eventos envolvidos na conversão de lanosterol a ergosterol,

resultando no acúmulo de uma série de precursores metilados (incluindo o lanosterol) e concomitante diminuição ou mesmo ausência do produto final da via biossintética. Em seguida, a substituição do ergosterol pelos precursores metilados determinará a formação de membranas plasmáticas defeituosas e com permeabilidade alterada (KOKJOHN et al., 2003; MARTINDALE, 2005).

Esse mecanismo de ação é responsável pela atividade fungistática dos derivados azólicos. Bossche e Marichal (citados por FIGUEIREDO, 2006), afirmaram em seus trabalhos que um dos átomos de nitrogênio do anel azólico se ligaria ao grupo heme do citocromo P-450 fúngico, resultando na inibição deste citocromo e conseqüentemente, impedindo a função da enzima.

Outras ações têm sido descritas, no entanto todas causariam modificações direta ou indiretamente na membrana plasmática do fungo, ocasionadas ora pela inibição da biossíntese do ergosterol (alteração da atividade quitina-sintetase, interferência no metabolismo respiratório e biossíntese de lipídios, inibição de formação de hifas e de tubo germinativo) ora pela interferência na organização de ácidos graxos da membrana plasmática (LYMAN e WALSH, 1992).

A anfotericina B faz parte do grupo dos polienos. Tem como mecanismo de ação a sua ligação aos esteróis da membrana, principalmente o ergosterol. Essa ligação resulta na formação de inúmeros poros na membrana que alteram a sua permeabilidade, levando à perda de sódio, potássio e outros componentes citoplasmáticos, o que causaria a morte fúngica. Assim a anfotericina é considerada uma droga fungicida (GABLER, 2008).

A nistatina é um antifúngico poliênico, obtido a partir do *Streptomyces noursei*. O mecanismo de ação da nistatina se dá através de ligação aos esteróides (ergosterol) existentes na membrana celular dos fungos susceptíveis, com resultante alteração na permeabilidade da membrana celular e conseqüente extravasamento do conteúdo citoplasmático. A nistatina não apresenta atividade contra bactérias, protozoários ou vírus. Tem ação fungistática e fungicida *in vitro* contra uma grande variedade de leveduras e fungos leveduriformes, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *Torulopsis glabrata*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*. (BRASIL, 2012).

O fluconazol é atualmente o agente de primeira linha utilizado para o tratamento de infecções por *Candida*. A sua eficácia, associada à disponibilidade de sua fórmula e a sua relativa baixa toxicidade fazem com que esse medicamento seja utilizado em muitas situações. A oportunidade de profilaxia e o tratamento empírico em relação ao uso desses medicamentos é um ponto de discussão por algumas razões: há um potencial emergente de

resistência aos azólicos; há falta de dados sólidos para se estabelecer vantagens sobre os placebos; a não absorvência desses agentes antifúngicos em algumas das condições clínicas encontradas; sua ineficácia contra os moldes e os custos. O uso do fluconazol em casos de comprovada eficácia deve promover a melhor terapia para os pacientes e deve limitar o crescimento de outros patógenos potenciais. Estudos clínicos deveriam ser realizados a fim de que os profissionais de saúde fizessem um uso racional na seleção da droga mais apropriada para uma indicação específica (STRAHILEVITZ et al., 2000; JHAM et al).

O fluconazol tem um largo espectro de ação, agindo em várias espécies de *Candida*, de *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia*, fungos dimórficos como o *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, e *Coccidioides immitis*. Possui também ação sobre a *Leishmania*. Algumas espécies de *Candida* não-*albicans*, incluindo a *C. krusei* e a *C. glabrata* são resistentes ao fluconazol. No entanto, a *C. glabrata* pode responder a doses maiores do medicamento (800-1200 mg/d). O uso prolongado da droga (finalidade terapêutica), assim como seu uso profilático, favorece uma nova colonização e infecção por esses patógenos. Patógenos como os *Aspergillus* são resistentes ao fluconazol (STRAHILEVITZ et al., 2000).

Slavin et al. (1995), realizaram um estudo prospectivo, randomizado e duplo-cego, comparando a eficácia do uso do fluconazol com o placebo e concluíram que quando a profilaxia com o fluconazol não é realizada, 16% a 18% dos pacientes apresentarão infecções fúngicas, devidas principalmente à *C. albicans* e outras espécies de *Candida* spp. Em seus resultados os pesquisadores observaram que somente 3% dos pacientes transplantados de medula óssea que receberam o fluconazol profilaticamente desenvolveram infecções fúngicas (3 casos *C. krusei*, 1 caso com *Aspergillus* sp e um caso de *Mucorales*). Em relação aos pacientes que receberam o placebo, 16% desenvolveram infecções fúngicas.

Baseado nesse estudo e em outro experimento que também utilizou o fluconazol e teve resultado similar, uma conferência de 22 investigadores recomendou a profilaxia com o fluconazol, 400 mg diariamente, para aqueles pacientes que iriam se submeter ao transplante de medula óssea, fosse ele alógeno ou autógeno de alto risco. No entanto, salientaram que quando fossem selecionar a droga a ser utilizada, drogas alternativas deveriam também ser pesquisadas, no momento em que os estudos prévios compararam o fluconazol com placebo e não com outro medicamento (STRAHILEVITZ et al. 2000).

Menichetti et al. (1994) citados por Strahilevitz et al.(2000) fizeram uma comparação da eficácia de uso do antifúngico fluconazol com anfotericina B. A administração dos medicamentos foi feita em pacientes leucêmicos que não haviam realizado o transplante de

medula óssea (pacientes imunossuprimidos). A dosagem utilizada foi de 150 mg de fluconazol administrada uma vez ao dia e a anfotericina B de 500 mg era administrada de 6 em 6 horas. A infecção fúngica sistêmica ocorreu em 2,6% dos pacientes que receberam fluconazol contra 2,5% dos pacientes que receberam anfotericina B (diferença não estatisticamente significativa). Assim, os autores concluíram que a administração de anfotericina B como profilaxia neste grupo de pacientes imunossuprimidos, tem uma boa eficácia quando comparada ao fluconazol. A incidência de candidose invasiva nunca excedeu 8%, resultados similares à terapia com o fluconazol. Além do mais, nos pacientes que receberam profilaxia com o fluconazol há uma maior chance de surgirem espécies resistentes ao medicamento, especialmente *C. krusei* e *C. glabrata*.

De acordo com Epstein et al. (2002), a terapia tópica – com nistatina, miconazol, clotrimazol e anfotericina B – é geralmente efetiva no controle da candidíase de baixo grau. Nos casos de infecções oro-faríngeas severas, a terapia tópica, juntamente com a terapia sistêmica podem assegurar o uso de uma dose sistêmica menor e um tempo menor da terapia antifúngica sistêmica. Quando se optar pelo uso tópico de agentes antifúngicos, alguns fatores devem ser considerados, como o sabor, a textura o potencial de sensibilidade ou resistência à droga e o custo. Se o paciente apresentar xerostomia, caso haja prescrição de tabletes com o medicamento antifúngico, eles não serão bem absorvidos. Devido à baixa toxicidade observada quando o fluconazol tópico é utilizado em forma de enxaguantes bucais, essa terapia poderá ser utilizada em pacientes de alto risco, como os idosos e as grávidas.

#### **2.4.1. Determinação *in vitro* da susceptibilidade a drogas antifúngicas: Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Para se conceituar susceptibilidade e resistência à drogas antifúngicas, deve-se considerar dois pontos de vista: o microbiológico e o clínico.

Do ponto de vista microbiológico, uma amostra de leveduras é resistente a um antifúngico quando sua concentração inibitória mínima (CIM) é elevada em relação à CIM habitual para a espécie estudada. No entanto, considerando o aspecto clínico, amostras resistentes microbiologicamente podem responder perfeitamente ao tratamento, pois a concentração da droga no local da infecção pode ser maior que a CIM do microrganismo.

Assim, um fungo é considerado resistente clinicamente quando mesmo diante de

elevadas concentrações do fármaco ele continua crescendo e produzindo sintomatologias (RODRIGUES-TUDELA et al., 2003).

#### **2.4.2 Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI**

O CLSI, anteriormente denominado de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards Institute) foi criado através de uma subcomissão para elaborar normas e métodos para os testes de susceptibilidade a antifúngicos, semelhantes àqueles usados com os agentes antibacterianos. Tal criação foi extremamente necessária, visto que não havia concordância dos valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos diferentes antifúngicos estabelecidas pelos diversos laboratórios. Isso dificultava a terapia medicamentosa quando os antifúngicos tinham que ser prescritos.

A CLSI criou vários documentos como o M-27A em 1998, que foi modificado em 2002 pelo novo modelo – o M-27A2. Esse modelo adaptou melhor a metodologia da microdiluição, que é mais atrativa para os testes de susceptibilidade antifúngica que a metodologia da macrodiluição. Passou-se a incluir a leitura de 24 horas para *Candida* spp. devido ao crescimento *trailing*, que é um crescimento residual. Assim, um isolado que em 24 horas é susceptível, pode apresentar-se totalmente resistente em um período de 48 horas (CLSI, 2002).

Em 2008, um novo documento é criado pela CLSI – M-27A3. Nele, além da descrição dos três antifúngicos citados anteriormente o fluconazol, a flucitosina e o itraconazol, há a inclusão de outros antifúngicos como o anidulafungin, o caspofungin, o micafungin e o voriconazol. Assim, novas diretrizes para a interpretação dos testes de susceptibilidade utilizando tais fármacos são estabelecidas. Novos valores para susceptibilidade, susceptibilidade dose-dependente, resistência e não susceptibilidade são agora padronizadas. A CLSI (2008) descreve o efeito *trailing* comum ao fluconazol e ao itraconazol como “inibição parcial de crescimento sob variação nas concentrações dos antifúngicos”. Esse efeito é observado nos azólicos devido ao fato de serem fungistáticos. O documento cita ainda que amostras com esse comportamento deveriam ser categorizadas como “susceptível” em vez de “resistente”.

## 2.5- Métodos para identificação de *Candida*

A necessidade de se identificar leveduras isoladas, de forma eficiente e acurada, permitiu o desenvolvimento de vários sistemas de identificações manuais e automáticas. Existem muitos “kits” de identificação rápida de leveduras. Buchaille et al. (1998) e Verweij et al. (1999) citam vários sistemas, como o AUXACOLOR (Sanofi Diagnostics Pasteur), API 20 C (BioMérieux, France), API *Candida* systemm (BioMérieux), CIMro-organismo *Candida* (CIMro-organismo, France), Fungichrom I e Fungifast I twin (International CIMrobio, France), o Vitek (bioMérieux Vitek, USA) e o Yeast Star (CLARC Laboratories, The Netherlands).

### 2.5.1- API 20 C

O Sistema API 20 C (BioMérieux) consiste em galerias contendo cada uma 20 orifícios com substratos de fontes de carbono desidratados, que permitem assim 19 provas de assimilação. Uma pequena alçada de amostras de levedura, após terem sido repicadas em ágar Sabouraud por um período de 24 horas é transferida para tubos contendo 2 ml de solução salina e a turbidez é ajustada segundo à escala 2 de McFarland. Após este controle de turbidez, 100 µl da suspensão é adicionada ao meio basal do API 20, onde ela é homogeneizada e transferida posteriormente ao poço de incubação. O painel deve ser incubado em câmara úmida previamente preparada a 30°C por até 72 horas, com leituras de 24, 48 e 72 horas. O resultado é considerado positivo quando houve opacidade nos poços ou negativo na ausência de opacidade nos poços de cada carboidrato. A interpretação é realizada com o auxílio do catálogo analítico API 20 C (FIGUEIREDO, 2006).

### 2.5.2- Sistema CHROMagar® *Candida*

Nos últimos anos, um grande número de meios cromogênicos tem sido comercializados incluindo o CHROMagar® *Candida*, o chomID *Candida* (BioMérieux), Albicans ID2 (BioMérieux), *Candida* ID2 (BioMérieux), e CandiSelect 4 (BIO-Rad). Estes

meios propiciam o isolamento e a identificação das leveduras clinicamente mais relevantes, com base na cor das colônias (HOSPENTHAL et al., 2006; ILKIT et al, 2007).

Estes sistemas permitem a identificação presuntiva da *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, diferenciando as espécies que possam estar em uma mesma placa. Cada espécie reage especificamente com um substrato cromogênico, fermentando compostos específicos presentes nesse substrato. Assim as colônias ficam com aparência e coloração características, de acordo com a espécie isolada. Esse meio é efetivo e de fácil uso para o isolamento e identificação das leveduras em espécimes clínicos (ARAUJO et al, 2005; SAN-MILAN et al., 1996).

O meio de cultura CHROMagar *Candida* (Difco) tem sido amplamente utilizado para isolar e identificar presuntivamente algumas espécies de *Candida* presentes na cavidade bucal, dentre elas a *C. albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*. Este meio se baseia na utilização de um substrato cromogênico, que é hidrolisado por enzimas espécie-específico (glicosaminidase), que diferencia as leveduras de acordo com a morfologia e a cor das colônias. A utilização deste meio facilita a detecção e a identificação destas leveduras e, também, fornece resultados presuntivos em menor tempo que os obtidos por métodos tradicionais (ARAÚJO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

Segundo Madhavan et al. (2011), pelo CHROMagar *Candida* é possível identificar, além dessas espécies citadas, outras, como a *C. glabrata*, a *C. rugosa* e *C. parapsilosis*. Em seus trabalhos, os autores pesquisaram a sensibilidade e a especificidade desse meio e observaram que as colônias apresentavam cores e formas peculiares: Isolados de *C. albicans* mostraram-se com colorações verde-claro e forma circular; *C. dubliniensis* verde-escuro e puntiformes; *C. rugosa* verde de forma circular e bordas elevadas; *C. glabrata* rosa escuro e puntiforme; a *C. krusei* rosa com aspecto aveludado e bordas irregulares e a *C. tropicalis* azul “metálico” de forma irregular.

### **2.5.3- Prova do Tubo Germinativo**

A prova do tubo germinativo é um teste que caracteriza de forma rápida e prática a levedura da espécie *C. albicans*. A técnica é simples e baseia-se, fundamentalmente na semeadura de um pequeno inóculo dessa levedura em soro que pode ser de origem humana, fetal bovino ou de cavalo, podendo-se utilizar ainda albumina de ovo. A técnica consiste em retirar uma pequena porção de uma colônia de levedura com uma alça de platina calibrada (0,001mL) e emulsificá-la de forma asséptica em 0,5mL de soro. Após a retirada dessa colônia, deve-se proceder a incubação: 37°C por 2 horas em banho-maria ou até 3 horas em

estufa bacteriológica. Após este período, uma gota desta suspensão deve ser removida para a preparação do tipo lâmina-lamínula e então será levada ao microscópio para observação. Quando o teste for positivo, o tubo germinativo aparecerá como um filamento fino e cilíndrico originado do blastoconídio da levedura, no qual não se observa nenhuma zona de constrição, quer na base ou ao longo de sua extensão (ALMEIDA, 2010).

Mesa et al. (2004) estudando formas de caracterizar e diferenciar fenotipicamente espécies de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, observaram em seus estudos que a *C. dubliniensis* também pode formar o tubo germinativo. Martin (1979), em seu trabalho clássico já havia confirmado a formação do tubo germinativo em *C. tropicalis*.

#### **2.5.4- E-Test®**

O E-test® – teste Epsilometer – é um teste de laboratório utilizado por microbiologistas para determinar se um isolado específico de bactéria ou fungo é sensível à ação de um antibiótico específico. O E-test® foi descrito pela primeira vez em 1988, mas foi somente introduzido no mercado em 1991 pela AB Biodisk®. Ele é basicamente um teste de difusão em ágar. Para isso, utiliza uma tira retangular impregnada com a droga a ser estudada. Uma colônia de fungos ou bactérias é inoculada na superfície de uma placa de ágar. A droga (antibiótico, por exemplo) que está na tira retangular é colocada no ágar e se difunde, produzindo um gradiente exponencial a ser computado. Há uma escala exponencial impressa na fita. Após 24 horas de incubação, uma zona elíptica de inibição é produzida, e o ponto no qual a elipse encontra a tira fornece uma leitura para a concentração inibitória mínima da droga (WALES, 2010).

O E-test® tem sido amplamente utilizado devido à sua simplicidade. No entanto, nem todos agentes antifúngicos estão disponíveis nesse teste e pode haver uma dificuldade de interpretação, devido ao crescimento de micro-colônias na zona de inibição. Além disso, se a leitura for realizada por vários profissionais, pode não haver padronização de resultados (KOGA-ITO et al., 2008).

### 2.5.5- Teste bioquímico: KIT CANDIFAST® (International Microbio-France)

O kit Candifast® é indicado para a identificação das principais leveduras que são encontradas na patologia humana e para a análise de suas resistências a vários antifúngicos.

Princípio do teste:

A **identificação da levedura** está baseada nas seguintes observações:

- Na susceptibilidade da cepa, que está sendo analisada, à actidiona, que é observada pela mudança na cor do indicador ou para amarelo ou para amarelo alaranjado ou para vermelho fucsina;
- Na fermentação de sete açúcares (glucose - GLU; galactose – GAL; trealose – TER; maltose – MAL; celobiose – CEL; rafinose – RAF e lactose – LAC) que é percebida pela mudança na cor do indicador para o amarelo ou amarelo alaranjado devido à acidificação do meio ou pela demonstração da atividade da urease que produz uma alcalinização do meio, mudando a cor do indicador para vermelho fucsina em cada poço.

A **determinação da resistência** das leveduras está baseada no crescimento ou na ausência de crescimento dessas leveduras na presença de vários antifúngicos. O crescimento é demonstrado pela mudança de cor do meio:

- Fermentação da glicose pelas leveduras leva a uma acidificação do meio que contém vermelho de fenol, tornando-o amarelo ou amarelo alaranjado;
- Hidrólise da uréia pelas leveduras urease-positiva que liberam a amônia e esta alcaliniza o meio que contém vermelho de fenol, mudando a cor para rosa fucsina.
- Os antifúngicos utilizados na Candifast® são: anfotericina B (4µg/mL); nistatina (200 unidades/mL); flucitosina (35µg/mL); econazol (16 µg/mL); cetoconazol (16 µg/mL); miconazol (16 µg/mL); fluconazol (16 µg/mL). No Kit os antifúngicos supracitados estão abreviados, respectivamente por: AB, NY, FCT, ECZ, KTC, MCZ, FCZ (KOENING et al, 1989).

### 2.5.6- PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia de Polimerase)

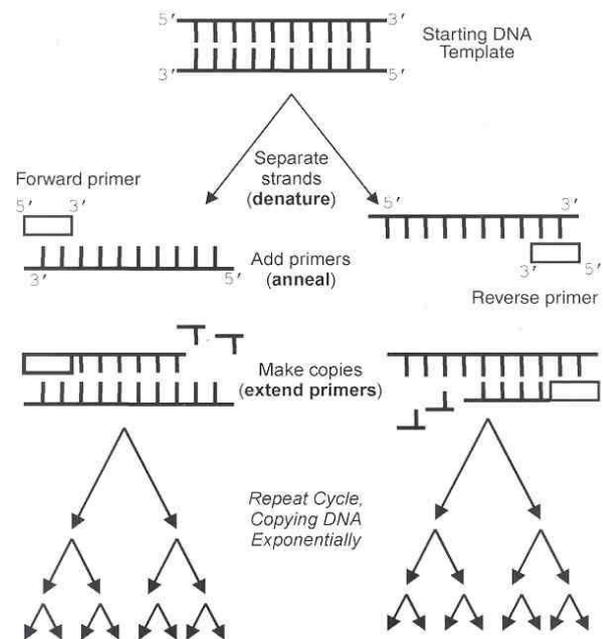
Na década de 80, os trabalhos realizados com o intuito de se fazer a identificação molecular dos fungos tiveram início. Magee e Magee (1987) utilizaram uma técnica para a identificação molecular chamada OFAGE (orthogonal field alternating gel electrophoresis). Em seus trabalhos, os autores estudaram o perfil eletroforético dos cromossomos de diversas espécies de *Candida* e concluíram que as linhagens de *C. albicans* apresentavam de nove a 10 cromossomos; a *C. stellatoidea* apresentou nove cromossomos; a *C. glabrata* apresentou dez e a *C. guilliermondii* apresentou seis cromossomos. No entanto esta técnica não é prática, pois pode levar vários dias até a identificação molecular final.

A PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) é uma metodologia que se baseia na amplificação exponencial seletiva de uma quantidade reduzida de DNA de uma única célula.

Esta técnica revolucionou o mundo científico e as suas aplicações são imensas: é usada no diagnóstico médico, mapeamento genético, detecção de doenças hereditárias, clonagem de genes, testes de paternidade, identificação de “impressões digitais” genéticas. De fato, a PCR revolucionou várias áreas como a Biologia Molecular, Patologia, Farmácia, Botânica, Medicina Forense e valeu o prêmio Nobel, em 1993, a Kary Mullis. O objetivo da PCR é produzir uma quantidade apreciável de um segmento específico de DNA a partir de uma quantidade

mínima. O DNA molde sofre uma amplificação controlada por enzimas, obtendo-se milhões de cópias do fragmento de DNA de interesse. O molde pode ser qualquer forma de DNA de cadeia dupla, como o DNA genômico: pode usar-se uma gota de sangue, um fio de cabelo, uma célula do epitélio oral, um blastômero, de uma célula, de um patógeno (GRIFFITHS et al., 1999).

Um ciclo da PCR (Figura 1) consiste em três fases: desnaturação do DNA molde (a 95°C), ligação (“annealing”) dos *primers* (a 64°C) e polimerização do DNA (a 72°C). Na 1ª etapa faz-se a separação das cadeias de dupla hélice de DNA através do calor. Esta separação é essencial para que, na 2ª fase, dois *primers* de oligonucleótidos se liguem às sequências dos pares de bases complementares da cadeia molde. Estes *primers* são desenhados e sintetizados



**Fig. 1 – Ciclo da PCR.**

de modo a ligarem-se às extremidades opostas de cada uma das cadeias de DNA molde que se pretende amplificar. Os *primers* servem, portanto, de ponto de partida para a replicação de DNA e, na última etapa, faz-se a sua extensão. A enzima responsável por esta polimerização é a DNA polimerase termo-estável (Taq), tendo sido isolada a partir da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* que vive em elevadas temperaturas. É essencial que a enzima usada seja estável ao calor, uma vez que os ciclos da PCR têm lugar a temperaturas situadas entre os 64°C e 95°C. Para executar este ciclo usa-se um termociclador, que faz variar de forma rigorosa o tempo e a temperatura ao longo do ciclo. Normalmente são repetidos cerca de 30 ciclos, o que demora apenas algumas horas.

Assim, duas novas cadeias são sintetizadas a partir da cadeia molde em cada ciclo completo da PCR. Logo se dá um crescimento exponencial, havendo ao fim de  $n$  ciclos  $2^n$  vezes mais cópias do que no início.

O segredo do sucesso da PCR reside na capacidade que ela tem de amplificar uma sequência precisa de DNA aliada à sua simplicidade, rigor, elevada sensibilidade e especificidade. Não é necessário isolar o DNA que se pretende amplificar (mesmo que se encontre misturado com DNA de outras espécies), uma vez que a especificidade da PCR é dada pelos *primers*. É uma técnica rápida, de baixo custo e segura.

Contudo, a PCR também tem limitações, como a necessidade de conhecer a sequência de DNA a amplificar para que possam ser sintetizados *primers* específicos. Outras desvantagens são a relativa facilidade com que ocorre contaminação da amostra por DNA estranho (uma vez que se trata de uma técnica muito sensível) e a limitada extensão da sequência que é possível amplificar (é difícil aplicar a PCR a sequências maiores do que 5kb). Pode também ocorrer incorporação errônea de bases durante a replicação.

Os resultados da PCR são úteis no diagnóstico, prognóstico e na determinação da terapia a ser utilizada, e até mesmo na avaliação da susceptibilidade a doenças. A PCR é frequentemente utilizada na detecção de polimorfismos, mutações pontuais e infecção por micro-organismos bacterianos, fúngicos ou virais antes da exteriorização patológica da sua presença (GRIFFITHS et al., 1999).

Chavasco et al. (2006), analisando 37 amostras de candidose em pacientes imunocomprometidos, (HIV positivos), encontraram 2 amostras de *C. dubliniensis* (5,4%) utilizando a técnica da PCR. Nas outras amostras foi encontrada a espécie *C. albicans*. A *C. dubliniensis* é uma nova espécie recentemente descrita e compartilha muitas características fenotípicas e bioquímicas com *C. albicans*, dificultando assim a diferenciação entre elas. A

técnica da PCR (Reação em Cadeia Polimerase) se mostrou eficaz, prática e com identificação taxonômica acurada.

Varguez et al. (2007), fizeram um estudo comparativo entre 2 métodos de identificação de *Candida* – O ensaio RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) e o Kit ID 32 ATB (BioMérieux, França). O RAPD, que é um método de amplificação aleatória de um DNA polimórfico criado para a identificação de isolados clínicos de espécies de *Candida* gerou padrões de PCR-RAPD bem consistentes quando foi utilizado o *primer* OPE-18. Assim, os autores concluíram que o método é muito específico e sensível e poderia ser utilizado para a identificação de várias espécies de *Candida*, como *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. pelliculosa*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. lusitaniae*.

#### 2.5.6.1- Técnica da PCR em Tempo Real (RT-PCR)

A RT-PCR quantitativa ou em tempo real é empregada para inferir a quantidade inicial de um determinado produto através do comportamento da cinética de amplificação. Essa análise se dá através da detecção de um sinal fluorescente a cada ciclo de amplificação, sendo coletadas informações a cada ciclo. Para essa análise é estabelecido um limiar de detecção (*Threshold*), que consiste em um ponto de referência onde todas as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente. E para se estabelecer uma base de comparação entre as amostras utiliza-se o valor de Ct (*Threshold cycle*) onde cada curva de amplificação atravessa o *Threshold*.

Para que seja possível a detecção do aumento de produto de uma PCR ao longo de cada ciclo através da fluorescência é preciso marcar o fragmento amplificado com alguma molécula fluorescente. Para essa marcação se utilizará o sistema *SYBR Green*. A quantificação baseia-se na propriedade do *SYBR Green* apresentar intensificação da fluorescência apenas quando ligado à dupla fita de cDNA e de esta intensidade aumentar proporcionalmente ao aumento da quantidade de cDNA gerado.

Azevedo et al., (2004), compararam em suas pesquisas diferentes métodos de extração de RNA de células de leveduras (*Candida*) inoculadas em sangue e diferentes reagentes de amplificação enzimática. Foram isoladas de pacientes cinco espécies de leveduras - *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. O RNA foi extraído em cada um dos procedimentos e foi testado no formato RT-PCR em etapa única, utilizando-se quatro kits: **RT-PCR da Invitrogen** (SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq), **Applied Biosystems** (EZrTth RNA PCR Kit), **Qiagen** (Qiagen OneStep RT-PCR) e **Roche** (C. Therm.

Polymerase One-Step RT-PCR System). Os autores concluíram em seus trabalhos que os testes utilizados para diagnóstico alcançaram boa sensibilidade e reprodutibilidade e que os kits que usam metodologia “hot-start” (Invitrogen e Qiagen) tiveram desempenho melhor do que aqueles que permitem que a polimerase inicie sua ação durante a etapa de transcrição reversa. Os seus resultados revelaram um desempenho melhor do kit da Qiagen, tanto em relação à extração de RNA como ao ensaio de RT-PCR, e mostraram a importância de se escolher o kit apropriado para o diagnóstico molecular.

#### **2.5.6.2. Técnica da PCR *Fingerprint*: Primer EI**

A técnica da PCR *Fingerprint* permite a identificação de novas espécies a partir de linhagens previamente conhecidas. A partir dessas linhagens já pré-identificadas (linhagem de referência) é possível comparar o perfil de amplificação com novas linhagens desconhecidas.

Vários autores têm utilizado a técnica do PCR utilizando o *Intron Splice Site primer* EI-1 em seus diferentes estudos. Barros Lopes et al. (1998), trabalhando com leveduras para fermentações alcoólicas, utilizaram este método para diferenciar diversas leveduras utilizadas comercialmente na fabricação de vinhos. Eles concluíram que o método é útil não só para identificar as espécies *Saccharomyces cerevisiae*, mas também para identificar outras espécies que poderiam ser úteis na fabricação de outros tipos de vinho, com sabores e características diferenciadas.

Outro trabalho foi realizado por Costa-Silva et al. (2010) utilizando o *Intron Splice Site primer* EI-1 para a análise do perfil de amplificação de diferentes espécies de leveduras consideradas contaminantes no processo de fermentação alcoólica, originadas de uma destilaria no Estado da Paraíba na safra 2004/2005. Foram realizadas as etapas analíticas para discriminação molecular das leveduras a partir da extração do DNA total, amplificação por PCR e análise do perfil genético. Os resultados obtidos indicam que o *primer* EI-1 é muito eficaz na discriminação das diferentes espécies de *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, evidenciando padrões de bandas específicos para as leveduras analisadas. Isto demonstra a utilidade deste marcador no auxílio à taxonomia de leveduras.

### **2.5.6.3. Sequenciamento das subunidades D1/D2**

Nos últimos anos, a região D1/D2 da subunidade maior do rDNA (26 S) tem sido sequenciada nas espécies de leveduras já conhecidas. Assim, atualmente todas as leveduras podem ser identificadas utilizando este método para o sequenciamento desta região. Através de seus trabalhos, Kurtzman e Robnett (1998) sugeriram que uma mesma espécie de levedura difere em no máximo três substituições/deleções nesta região de aproximadamente 600 nucleotídeos. Com o advento desta técnica foi possível desenvolver iniciadores específicos que possibilitam uma identificação rápida por PCR das leveduras sem a utilização do sequenciamento. Esse estudo foi o primeiro a incluir essencialmente todas as leveduras ascomicéticas no mesmo conjunto de dados moleculares. Isso permitiu a detecção de numerosas espécies até então aparentemente sinônimas, bem como o reconhecimento de relações estreitas entre espécies que aparentemente não mostravam quaisquer similaridades. Essa análise de dados permitiu uma visão global das relações filogenéticas que envolvem as leveduras ascomicéticas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 – Objetivo geral

Isolar e identificar as espécies de leveduras causadoras de patologias em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço que apresentam neoplasias malignas e em pacientes que fazem uso de próteses odontológicas removíveis.

#### 3.2- Objetivos específicos

- Avaliar quais são os aspectos clínicos da candidose nos dois grupos;
- Identificar bioquimicamente, através do Kit Candifast® as espécies de *Candida* presentes nos dois grupos de pacientes;
- Identificar as espécies de *Candida* através do meio de cultura CHROMagar® *Candida*;
- Identificar através de técnicas de biologia molecular (PCR) as espécies de *Candida* obtidas dos pacientes;
- Comparar os resultados da identificação de *Candida* encontrados nos 2 grupos de pacientes através dos métodos bioquímico, do meio de cultura CHROMagar® *Candida* e biologia molecular;
- Avaliar a susceptibilidade das espécies de *Candida* coletadas dos 2 grupos de pacientes aos antifúngicos usuais presentes no Kit Candifast® e comparar esses resultados com o método da Concentração Inibitória Mínima (CIM);

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Universo da amostra**

Os pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço foram selecionados através dos projetos de Pesquisa e Extensão realizados na Faculdade de Odontologia (Clínica de “Atenção Odontológica de Suporte aos Pacientes Irrradiados de Cabeça e Pescoço”). Os pacientes de Estomatite por Dentadura foram selecionados através das Clínicas de Prótese, das Clínicas de Patologia e Semiologia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. A coleta de um paciente foi realizada em consultório odontológico particular.

Os pacientes foram avaliados pela presença ou ausência de sinais sugestivos de candidose (conforme descrição na tabela 1). Quando foi observada a presença de candidose, o pesquisador entregou ao paciente o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1), que foi lido e assinado por ambos, pesquisador e paciente, permitindo assim que a pesquisa se iniciasse.

Os pacientes participantes passaram por um exame clínico inicial (*baseline*) onde foram preenchidos pelos pesquisadores formulários próprios do estudo baseados em prontuários das clínicas de Semiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG (Anexo 2). Inicialmente foram coletados dados de identificação e anamnese, seguindo-se aos exames objetivo geral e intrabucal.

### **4.2. Critérios de Inclusão da amostra**

Os pacientes avaliados que apresentaram manifestações clínicas de candidose (como presença de placas brancas removíveis, áreas eritematosas associadas ou não a próteses) foram convidados a participar da pesquisa e foi entregue a cada um o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo 1), que após lido e assinado permitiu ao pesquisador incluir tal paciente no presente trabalho. Os pacientes irradiados de cabeça e pescoço incluídos na amostra estavam em tratamento radioterápico ou tinham finalizado este tratamento em no máximo 6 meses.

### **4.3. Critérios de Exclusão da amostra**

Foram excluídos da pesquisa os pacientes que 1) não apresentaram candidose; 2) apresentaram manifestações clínicas de candidose e não aceitaram a realização da coleta intra-oral ou não estavam de acordo com o Termo de Consentimento; 3) não tiveram condições físicas de se submeterem à coleta do material (raspagem das mucosas); 4) pacientes irradiados de cabeça e pescoço que apresentaram próteses.

### **4.4. Coleta dos micro-organismos**

O período de coleta das amostras foi de novembro de 2011 a abril de 2012. Foram coletadas amostras de todos os pacientes que aceitaram a pesquisa e apresentaram a candidose, qualquer que fosse o aspecto clínico da doença.

As amostras foram do tipo “Conveniência” e não houve qualquer predileção por gênero, idade ou raça.

A coleta do material foi feito por meio de raspagem das mucosas (citologia) utilizando *swab* estéril e descartável, que foi colocado diretamente nas áreas onde houve presença de candidose.

### **4.5. Isolamento e identificação das leveduras utilizando o Kit Candifast® e o meio CHROMagar® *Candida*.**

As amostras selvagens, coletadas diretamente dos pacientes, foram inoculadas imediatamente em 2 placas de Petri 90x15 de acrílico estéreis e descartáveis: uma contendo ágar Sabouraud dextrosado com 5% de cloranfenicol (Sigma-USA) e a outra em CHROMagar® *Candida* (Difco). As amostras inoculadas em ágar Sabouraud foram incubadas em estufas microbiológicas a 37°C por 24 horas, para a realização dos testes bioquímicos de fermentação de açúcares e de susceptibilidade a antifúngicos (Candifast® International Microbio-France). As amostras inoculadas em meio CHROMagar® *Candida* foram incubadas a 37°C por 72 horas e após a verificação do crescimento nas placas as colônias foram avaliadas quanto à coloração e ao morfotipo. Após esta avaliação, a identificação presuntiva era realizada. A coloração verde da colônia indicava presença da *C.*

*albicans*, a coloração azul da colônia indicava *C. tropicalis* e as rosas indicavam presuntivamente a *C. krusei*.

Após esta identificação com o CHROMagar® *Candida* cada morfotipo diferente foi estriado em novas placas de Petri contendo ágar Sabouraud a fim de que colônias puras pudessem ser obtidas para posterior identificação molecular. Uma colônia pura de cada amostra foi colocada em criotubo de 1,5 ml previamente identificado, contendo Caldo *Gymp* (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1% e fosfato de sódio monobásico 0,2%) com 15% de glicerol estéril e posteriormente essas amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C na Coleção de Microrganismos e Células da do ICB-UFMG.

Para a realização do teste bioquímico Candifast®, uma alçada de levedura foi retirada do ágar Sabouraud e inoculada no frasco R1 do Kit (frasco de diluição e identificação). O inóculo estava corretamente preparado quando a turbidez conseguida no frasco 1 era visualmente igual à turbidez do frasco T.C (Controle de Turbidez). Após a preparação do inóculo no frasco R1, 100 µl deste frasco foi transferido para o frasco R2 para uso posterior. A bandeja do kit foi então aberta e em cada pocinho de “IDENTIFICAÇÃO”, 100 µl foram dispensados (ACT, GLU, GAL, TER, MAL, CEL, RAF, LAC). Após esta etapa 2 gotas de óleo mineral foram acrescentados nestes 8 pocinhos e a bandeja no lado “IDENTIFICAÇÃO” foi lacrada. O outro lado da bandeja “TESTE DE RESISTÊNCIA” foi preparado adicionando 100 µl da solução contida no frasco R2 em cada pocinho ( C+, AB, NY, FCT, ECZ, KTZ, MCZ, FCZ). Em seguida 2 gotas de óleo mineral foram colocadas em cada pocinho, a bandeja foi lacrada e então incubada por 24 horas a 37 °C para a leitura dos resultados. Para se fazer a leitura, o pocinho C+ tinha que ser positivo, com coloração amarela ou alaranjada e ela foi baseada na escala oferecida pelo kit, onde há uma combinação de cores (cultura positiva/cultura negativa), permitindo assim a identificação das leveduras e o teste de susceptibilidade aos antifúngicos. Caso o poço de controle se mostrasse negativo em 24 horas, a leitura poderia ser feita em 48 horas ou 72 horas no máximo dependendo do processo de fermentação da levedura. A figura 2 mostra os componentes do Kit Candifast®.

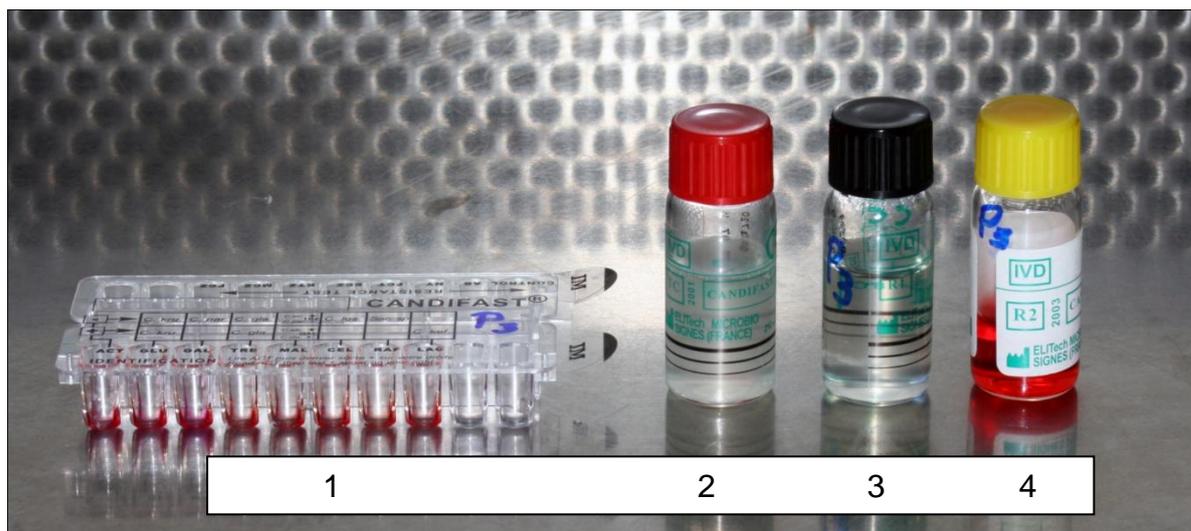


Figura 2: Componentes do Kit Candifast®: Bandeja de Identificação e Teste de Resistência (1); Frasco de Controle de Turbidez (2); Frasco de Diluição/Identificação (3), Frasco de Teste de Resistência (4).

#### 4.6. Extração do DNA das leveduras

Após a identificação presuntiva das leveduras utilizando o CHROMagar® *Candida*, leveduras de morfotipos diferentes foram estriadas em ágar sabouraud (cada morfotipo foi colocado em uma placa de Petri separada) para que colônias puras fossem obtidas. Assim, essas leveduras puras foram reavaliadas quanto ao morfotipo e foram levadas ao Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos no Departamento de Microbiologia - ICB/UFMG para terem os respectivos DNA extraídos. A extração do DNA seguiu o seguinte protocolo:

1. “Ressuspender uma alçada de leveduras em *eppendorf* contendo 100 µl de tampão de lise (Tris HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 10 mM pH 8,0; SDS 0,5). Deixar em banho-maria até que o tampão fique incolor (40°-44°C);
2. Incubar a 65 °C por 30 minutos;
3. Acrescentar 200 µl de clorofórmio-álcool isoamílico, homogeneizar gentilmente por inversão;
4. Centrifugar 10 minutos a 14800 rpm;
5. Retirar o sobrenadante e transferir para outros tubos (*eppendorf*);

6. Adicionar v/v (proporção volume/volume) de isopropanol à temperatura ambiente e deixar na bancada por 15 minutos descansando para precipitar o DNA;
7. Centrifugar por 10 minutos a 13200 rpm;
8. Descartar o sobrenadante por inversão;
9. Adicionar 200 µl de etanol 70%;
10. Centrifugar por 10 minutos a 13200 rpm;
11. Repetir os passos 9 e 10;
12. Descartar o sobrenadante por inversão;
13. Secar o DNA na estufa por 37°C por 30 minutos ou overnight;
14. Adicionar 50 µl de TE<sup>®</sup>.

Após a extração do DNA das leveduras, as amostras foram levadas ao equipamento Nano Drop <sup>®</sup>, para avaliar a qualidade das extrações.

#### **4.7. Identificação molecular das leveduras: PCR-EI1**

Para a diferenciação molecular das leveduras foi utilizado o método de PCR conhecido como “fingerprint”. Ele utiliza o iniciador - “primer” EI1 (5'-CTGGCTTGGTGTATGT-3'), que possui complementaridade aos sítios de processamento de íntrons. As linhagens da mesma espécie apresentam perfis de amplificação semelhantes. Assim, após o agrupamento das espécies que se mostraram semelhantes com o PCR EI1, um representante de cada agrupamento foi encaminhado para o sequenciamento do DNA. O PCR EI1 foi executado com o seguinte protocolo para cada amostra:

1. 15,3 µl de água DPEC (dietil pirocarbonato);
2. 2,5 µl de tampão;
3. 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub>;
4. 1 µl de DNTP;
5. 2 µl de *primer* EI1;
6. 1 µl de Betaína;
7. 0,5 µl de DMSO;
8. 0,2 µl de Taq;
9. 1 µl de DNA da levedura.

Quando era feito o procedimento da PCR para várias leveduras, um mix era feito com os reagentes de números 1 ao 8 e após o preenchimento de cada *ependorf* com a solução, o DNA era acrescentado por último e colocado na máquina de PCR para o início dos ciclos.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5 X, diuídos em tampão de corrida 6X e Gel Red durante aproximadamente 1 hora a 120 V. As bandas presentes no gel foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France). Os resultados da amplificação foram comparados com as amostras de referência (padrão 1 KB) que foram dispostas nas canaletas iniciais de cada gel do experimento.

#### **4.8. Sequenciamento da região D1D2 da subunidade maior do DNA ribossomal**

As linhagen que apresentaram perfis de PCR diferentes das espécies mais comuns foram sequenciadas para que a identificação molecular fosse confirmada. O sequenciamento foi feito na região D1/D2 da subunidade maior DNA ribossomal utilizando-se os iniciadores-“*primer*” NL1 (5'- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Os produtos de PCR foram sequenciados em um sequenciador automático MegaBace™ 1000 (Amersham Biosciences, USA) no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM- UFMG). As sequências foram editadas usando o programa DNAMAN (lynnon BioSoft, Vaudreuil, Québec). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas já depositadas no GenBank e analisadas através do programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool- versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) desenvolvido pelo Nacional Center For Biotechnology. Os isolados que apresentaram as sequências analisadas com similaridade  $\geq 98\%$  em relação às sequências já depositadas no GenBank, foram considerados como pertencentes à mesma espécie ou gênero; já aqueles que apresentaram sequências com similaridade  $\leq 97\%$ , foram considerados como pertencentes ao mesmo gênero (ROSA *et al.*, 2010).

#### **4.9. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de seis drogas antifúngicas**

Todos os isolados de *Candida* spp. provenientes dos pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço e portadores de próteses removíveis foram testados quanto à susceptibilidade a seis antifúngicos: Itraconazol, fluconazol, anfotericina B, miconazol, cetoconazol e nistatina, que são as drogas mais comumente utilizadas para o tratamento das candidoses orais. A anfotericina B e o fluconazol utilizados eram da marca Sigma®, o itraconazol foi preparado a partir de Sporanox®-cápsulas com 100mg e o cetoconazol, miconazol e a nistatina foram obtidas através de farmácia de Manipulação Nature Derme na forma de P.A. (puro para análise). A anfotericina B foi mantida a 4°C em vidro escuro devido a sua sensibilidade à luz. O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640 com tampão MOPS (morpholinopropanesulfonic acid) 0,165 M, pH7, com acréscimo de 2% de glicose. O meio RPMI foi preparado segundo as especificações contidas no CLSI (2008) (Apêndice A. Meio RPMI-1640).

O fluconazol e a nistatina foram solubilizados em água destilada estéril e as demais drogas em DMSO (dimetilsulfóxido), segundo normas do CLSI- documento M27 A3-2008. Para todos os antifúngicos foi preparada uma solução-mãe de 1000µg/mL. A partir desta solução-mãe iniciou-se o processo de microdiluição seriada dos antifúngicos utilizando o meio RPMI em placa de 96 poços (BIOFIL® Tissue Culture Plate 96 Well).

Os poços correspondentes a fila 1 da placa de microdiluição (Controle de Esterilidade) foi preenchido com 200 µl de RPMI. Os poços da fileira 12 receberam o meio de cultura e o inóculo fúngico (controle de crescimento).

Após a confecção das placas, teve início o preparo do inóculo. Os isolados de *Candida* foram repicadas em ágar Sabouraud no dia anterior (crescimento de 24 horas) e uma pequena alçada de cada levedura foi colocada em tudo de ensaio contendo salina 0,85% (4 mL) para a leitura da transmitância no aparelho espectrofotômetro. O comprimento de onda utilizado no espectrofotômetro foi de 530 nm, e as amostras foram ajustadas para 75% a 80% de transmitância (padronização do inóculo). Esse valor de transmitância corresponde a uma suspensão de  $10^6$  células/mL. Caso a transmitância estivesse elevada, um pouco mais de inóculo era acrescentado à salina e novamente a leitura realizada. Por outro lado, se a transmitância estivesse abaixo de 75% haveria a diluição do inóculo, com acréscimo de salina. Após a padronização do inóculo, este foi diluído de 1:50 e 1:20 no meio RPMI (CLSI, 2002). Posteriormente 100 µl do inóculo foi adicionado à placa de 96 poços. Desta forma, a

concentração final do inóculo correspondeu a  $1,5-1,0 \times 10^3$  células /mL. Este processo fez com que a concentração final dos agentes antifúngicos fosse de 0,12 a 64 µg/mL para o fluconazol; 0,015 a 8 µg/mL para o cetoconazol, para o miconazol e para a anfotericina B; 0,031 a 16 µg/mL para a nistatina e para o itraconazol.

As placas foram incubadas em BOD a 35°C por 48 horas para a leitura dos resultados. A determinação do ponto de inibição foi realizada pela metodologia visual, descrita no CLSI.

#### **4.10. Aspectos éticos e legais**

Todas as informações do presente estudo foram de caráter confidencial, e os nomes dos participantes, assim como fotos das suas fisionomias não foram divulgados. Os voluntários foram informados sobre o tipo e a finalidade do estudo, bem como tiveram garantia da confidencialidade das informações. As dúvidas que por ventura surgiram foram esclarecidas a todos os voluntários. Somente após o consentimento verbal e escrito (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- Anexo 1), as amostras começaram a ser coletadas. Os pacientes não arcaram com quaisquer despesas referentes à pesquisa. Não houve intercorrências no ato das coletas das amostras.

Os pacientes que apresentarem candidose foram tratados e acompanhados pelo pesquisador até a remissão completa dos sintomas. Foram utilizados antifúngicos de escolha dependendo da identificação da espécie e da resposta aos antifúngicos testados.

O estudo foi enviado para aprovação na Câmara do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica da Faculdade de Odontologia da UFMG e encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG), onde teve sua aprovação com o seguinte protocolo: Projeto CAAE- 0561.0.203.438-11 (Anexo 3).

Os dados obtidos pela amostra de conveniência foram analisados por estatística descritiva e para se avaliar a acurácia dos métodos “Candifast®” e “CHOMagar® *Candida*” foi utilizado o Teste de Diagnóstico, que considera como padrao-ouro o teste de PCR, e a partir dele é calculada a sensibilidade, especificidade, VPP (valores preditivos positivos), VPN (valores preditivos negativos) e acurácia dos métodos testados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1- Número e distribuição dos pacientes

Neste presente estudo, foram coletadas amostras de 2 grupos de pacientes: pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço (Grupo 1) e pacientes portadores de próteses (Grupo 2). No grupo dos pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço os exames clínicos e coletas foram realizados em 15 pacientes, e no grupo de pacientes portadores de prótese em 12 pacientes. As amostras foram coletadas no período de janeiro de 2012 a abril de 2012. No Grupo 1 foram obtidos 27 isolados de leveduras (considerando o método fisiológico CHROMagar® *Candida*) e no Grupo 2, 25 isolados. No Grupo 1 foram encontrados 13 pacientes do gênero masculino (86,7%) e 2 pacientes do gênero feminino (13,3%). Em relação ao Grupo 2, 9 pacientes eram do gênero feminino (75%) e 3 pacientes eram do gênero masculino (25%). Os dados acima estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Dados Demográficos do Estudo: Descrição dos grupos de pacientes, número de indivíduos, gênero, idade e raça

Grupo:	Descrição dos Grupos	Número de Indivíduos	Gênero*	Idade (média/anos)	Raça **
Grupo 1	Pacientes Irrradiados em Região de Cabeça e Pescoço	15	M(13) 86,7% F(2) 13,3%	55-83 (63,2)	L: 30,7% F: 30,7% M: 38,5%
Grupo 2	Pacientes portadores de Prótese Removível	12	M(3) 25% F(9) 75%	54-73 (61,4)	L: 66,6% F: 22,2% M: 11,1%

A coleta das amostras foi realizada de acordo com a metodologia previamente descrita e não houve contaminação de qualquer placa de Petri. Quando o meio ágar Sabouraud foi utilizado, a incubação preconizada foi de 24 horas; quando o meio CHROMagar® *Candida* foi utilizado, o período de incubação foi de 72 horas a 37°C.

### 5.1.1. Identificação clínica da candidose e locais de acometimento da doença.

Em relação à identificação clínica da candidose, no grupo de pacientes irradiados (Grupo 1), somente três formas da doença foram encontradas: A candidose pseudomembranosa com o maior acometimento (66,6%) dos pacientes (10 pacientes), seguidas pelas formas queilite angular e candidose atrófica aguda, ambas com um percentual de 20% de acometimento (em 3 pacientes cada uma). Um único paciente (6,6%) apresentou glossite rombóide mediana, que estava em associada com a candidose atrófica aguda. Outros três pacientes (20%) apresentaram duas formas de candidose: Dois apresentaram candidose pseudomembranosa e candidose atrófica aguda e em um paciente foi identificada candidose pseudomembranosa com queilite angular. Neste grupo não houve a presença da estomatite por dentadura, visto que a presença de prótese nestes pacientes era um dos critérios de exclusão.

No grupo de pacientes portadores de prótese (Grupo 2), a identificação clínica da candidose seguiu padrões diferentes daqueles do Grupo 1. Neste grupo somente duas formas clínicas de candidose foram observadas: a estomatite por dentadura (candidose atrófica crônica), estava presente em 10 dos 12 pacientes analisados (83,3%) enquanto que a queilite angular foi identificada em 4 pacientes (33,3%). Em dois pacientes (16,6%), as duas formas foram encontradas simultaneamente. De todos os pacientes avaliados neste grupo, onze (91,6%) faziam uso de prótese total removível e somente 1 paciente (8,4%) fazia uso de prótese parcial removível.

Quando se considerou as áreas acometidas pela doença, no Grupo 1 a língua foi o sítio de maior acometimento (7 pacientes, 46,6%), seguida de palato (40%) , rebordo alveolar (26,6%), comissura bucal (26,6%), mucosa jugal (20%), soalho bucal e orofaringe (ambos com 13,3%). No entanto em 4 pacientes (26,6%) foi observado um acometimento em vários sítios ( $\geq 3$ ) simultaneamente, ou seja, a candidose ocorreu de forma generalizada. A figura 3 ilustra a candidose pseudomembranosa em palato, em rebordo alveolar e na comissura bucal em pacientes do Grupo 1.

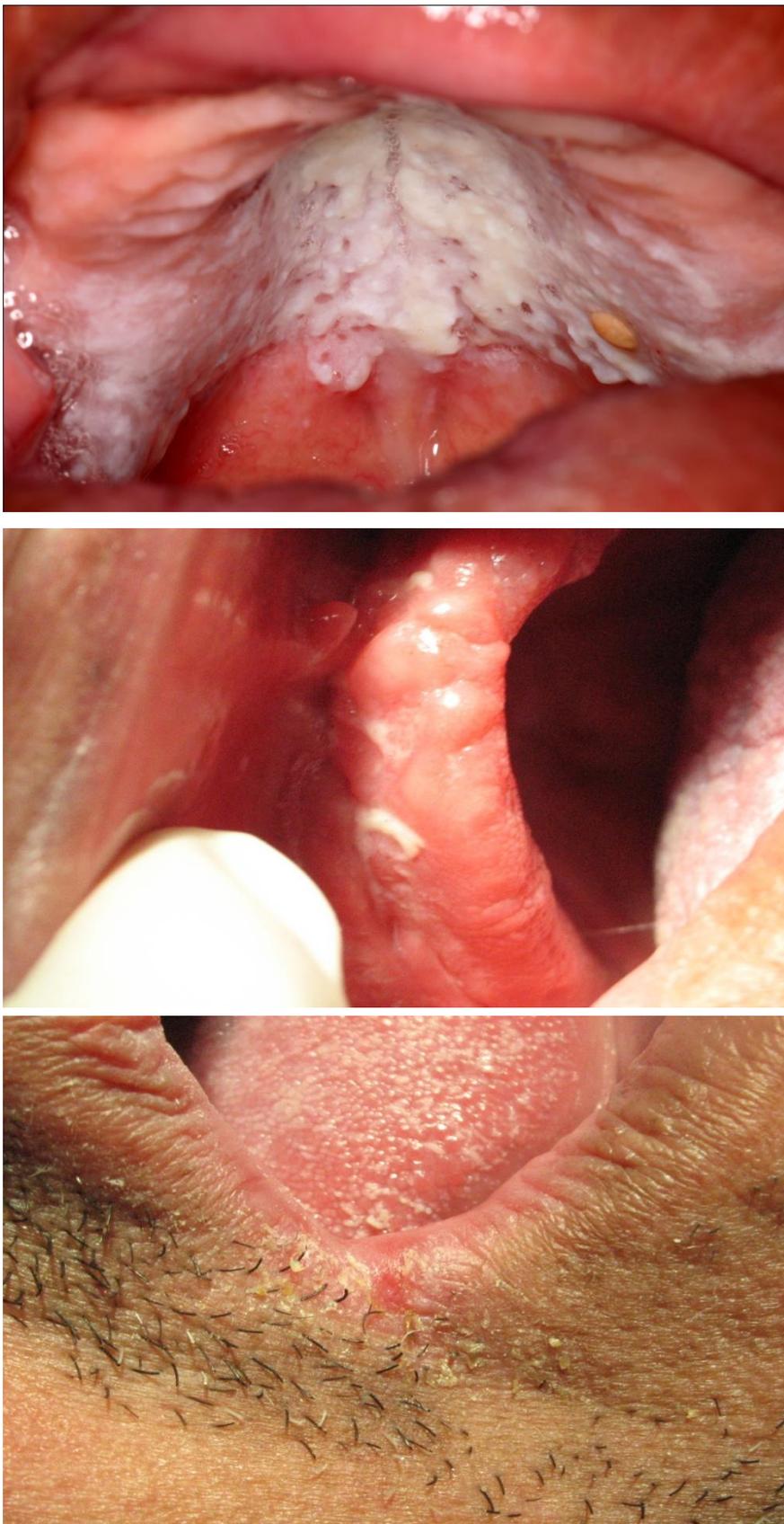


Figura 3: Candidose pseudomembranosa em palato, rebordo alveolar. Queilite angular em comissura bucal - Grupo 1

Em relação ao grupo 2, os únicos locais de acometimento das lesões foram palato (83,3%) e comissura bucal (33,3%). Esses dados são descritos nas figuras 4, 5, 6 e 7.

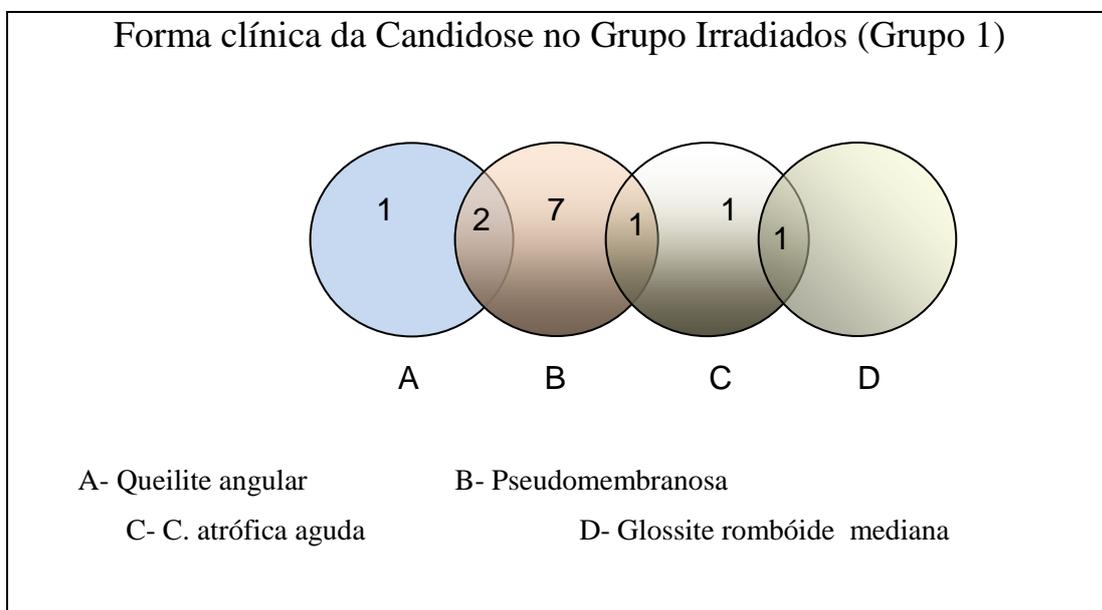


Figura 4: Formas clínicas da candidose bucal encontrada no Grupo 1. Total de 15 pacientes

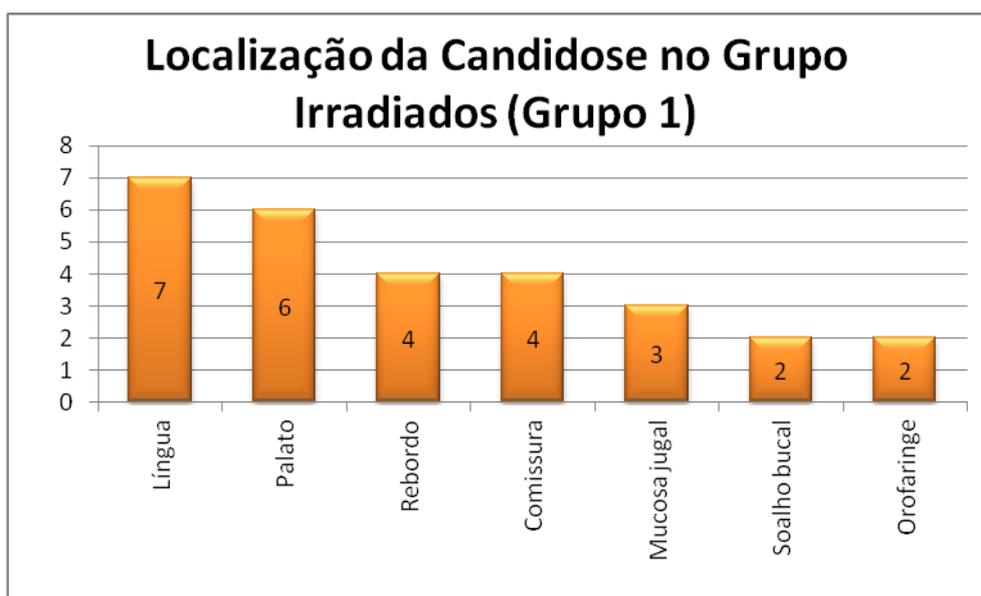


Figura 5: Sítios de acometimento da candidose no Grupo 1.

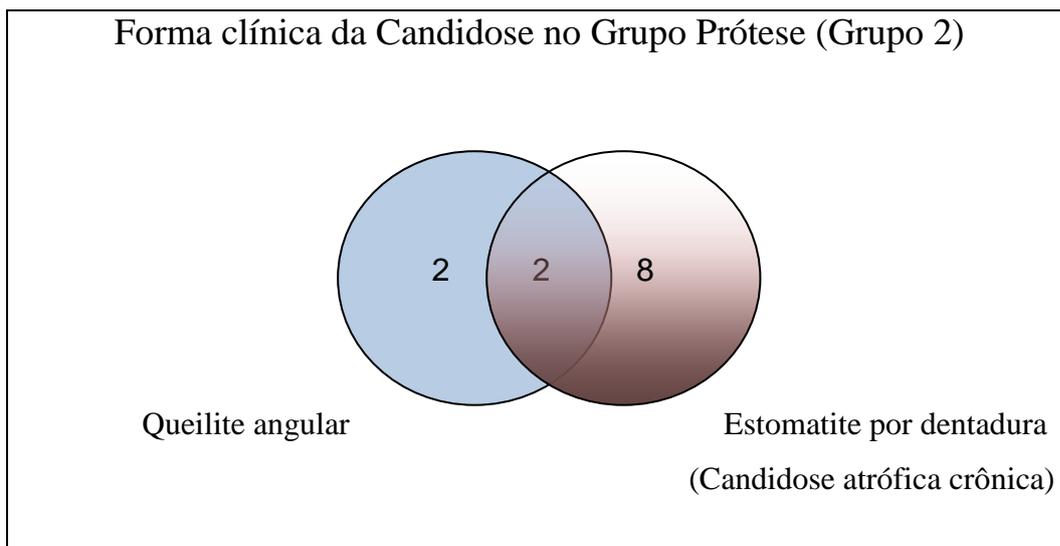


Figura 6: Formas clínicas da candidose no Grupo 2. Total de 12 pacientes

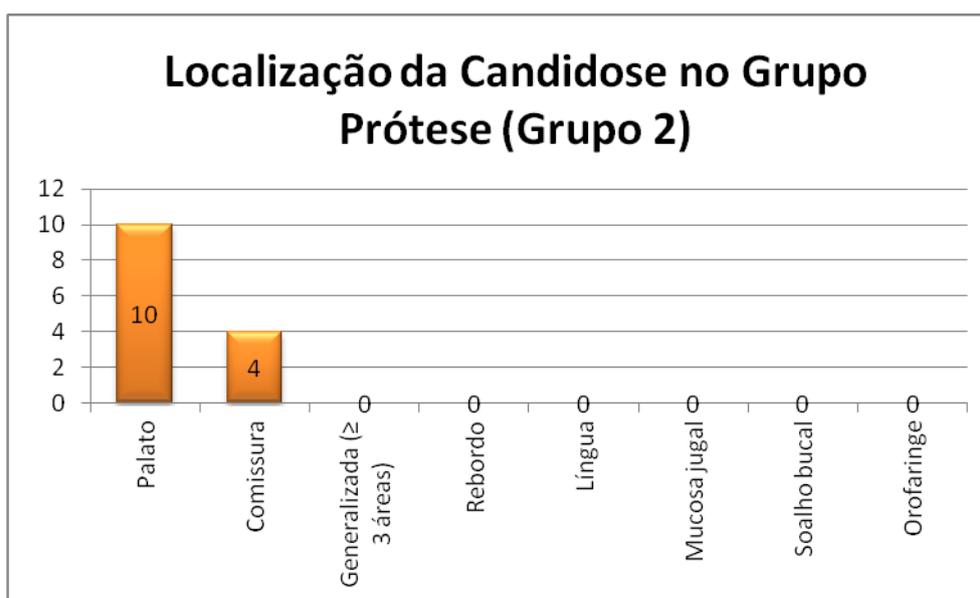


Figura 7: Sítios de acometimento da candidose no Grupo 2

## 5.2. Identificação das amostras

A identificação das amostras foi feita utilizando três métodos: O teste bioquímico (Candifast®), o teste fisiológico com o meio CHROMagar® *Candida* e PCR EI1, para confirmar as identificações, através da biologia molecular. Os resultados dos três métodos de identificação de leveduras estão descritos nos Anexos 4 e 5.

### 5.2.1. Identificação das amostras utilizando o Kit Candifast® - Teste bioquímico

As amostras dos dois grupos- Grupo 1 e Grupo 2 foram identificadas com o Kit Candifast® (Figura 8) segundo a metodologia descrita em capítulo anterior e os resultados serão discutidos a seguir.

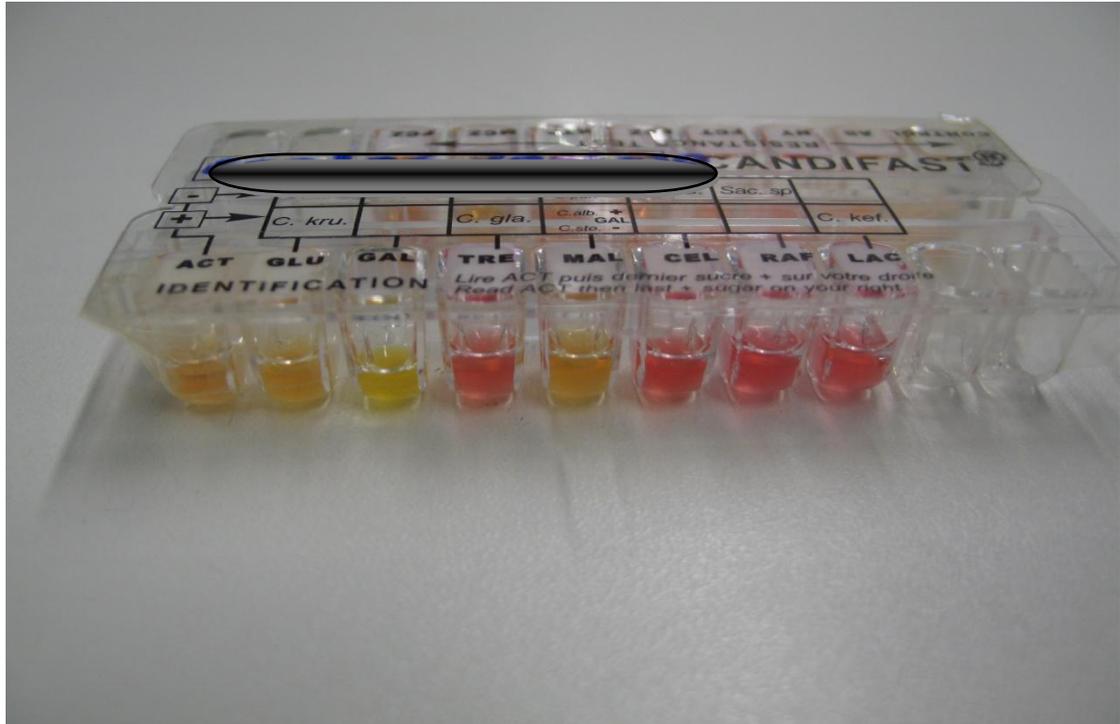


Figura 8: Identificação de *C. albicans* utilizando o Candifast®

Pelo teste bioquímico, dos 15 pacientes do Grupo 1 (Irradiados em Região de Cabeça e Pescoço) foram obtidas 18 amostras que foram inoculadas em ágar Sabouraud. Em três pacientes (20%) foram obtidas duas amostras. As amostras I7 (língua) e I7.1 (palato) apresentaram formas clínicas diferentes de candidose (Candidose pseudomembranosa e Candidose atrófica aguda respectivamente). As amostras I9 e I9A apresentaram a mesma forma clínica (Candidose Pseudomembranosa), no entanto a primeira acometia a língua, e a segunda a orofaringe. Em outro paciente avaliado (amostras I14 A e I14B), as colônias apresentaram morfotipos diferentes no ágar Sabouraud, sendo assim, foram identificadas separadamente. Assim, das 18 amostras identificadas, 7 (38,8%) foram identificadas como *C. albicans*, 7 (38,8%) foram identificadas como *C. tropicalis*. As outras quatro amostras foram identificadas como espécies distintas entre si: uma *C. krusei* (5,5%), uma como *C. lusitaniae* (5,5%), uma como *C. parapsilosis* (5,5%) e a última com *C. glabrata*. Os resultados para o Grupo 1 utilizando o kit Candifast® são descritos na figura 9.

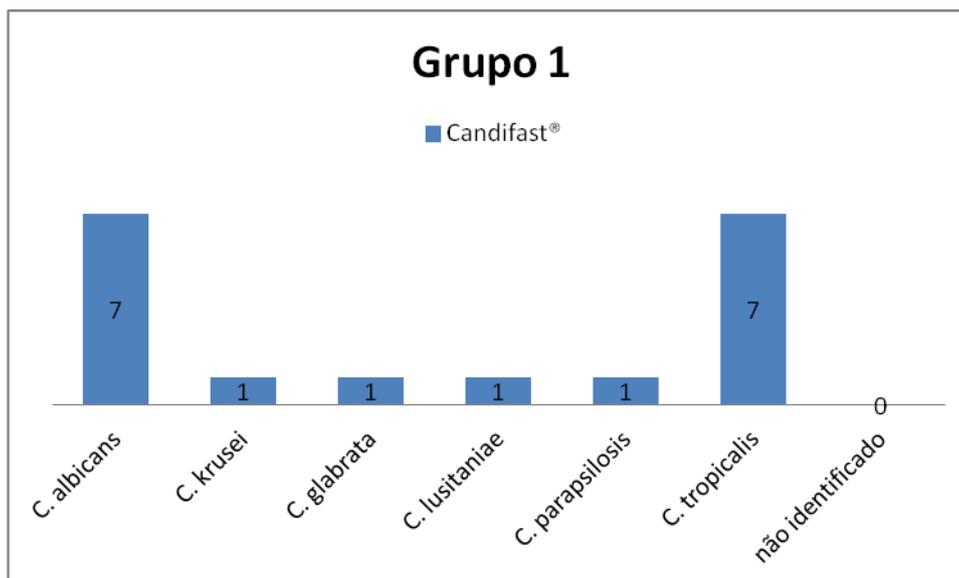


Figura 9: Identificação das leveduras (Grupo 1) utilizando o Kit Candifast® 18 amostras

Para o Grupo 2 (Portadores de Prótese), o teste bioquímico possibilitou a identificação de um total de 14 amostras dos 12 pacientes avaliados. Em dois pacientes (16,6%) foi possível obter duas amostras, pois os mesmos apresentaram dois tipos clínicos de candidose simultaneamente: Estomatite por Dentadura no palato duro e Queilite angular na comissura bucal. Nestes quatro isolados descritos (P2, P2.1, P3 e P3A), o kit Candifast® fez a identificação de *C. albicans*. As demais amostras também foram identificadas como *C. albicans* (100%). A figura 10 ilustra estes resultados.

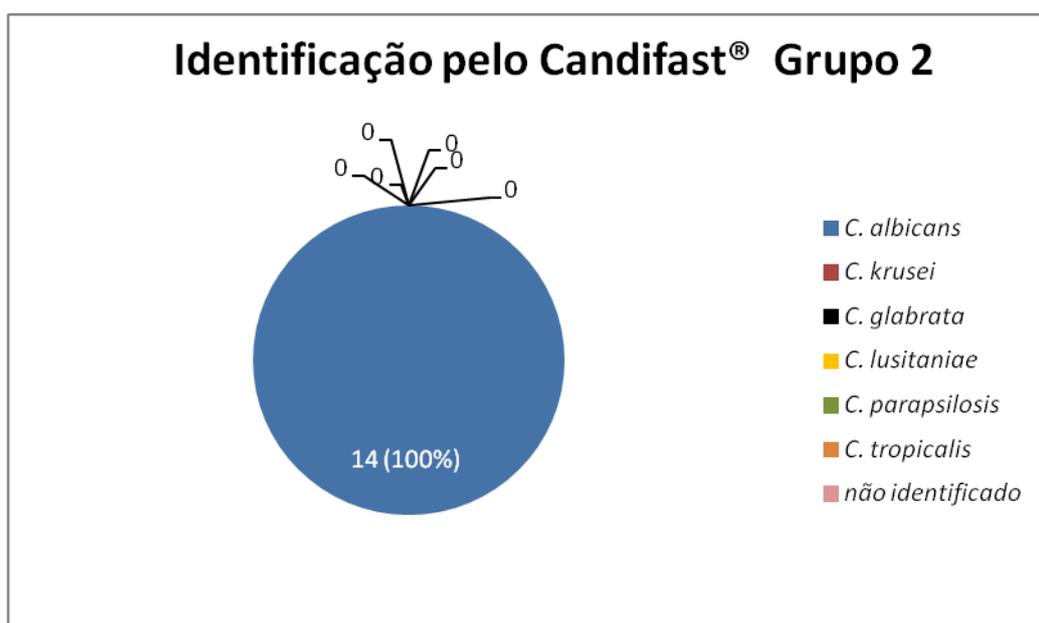


Figura 10: Identificação das leveduras utilizando o kit Candifast®

### 5.2.2. Identificação fisiológica das leveduras utilizando o meio CHROMagar® *Candida*

O meio CHROMagar® *Candida* permitiu a identificação presuntiva de três espécies de *Candida*: A *C. albicans*, que apresenta coloração verde; *C. tropicalis* que apresenta coloração azul e a *C. krusei* de coloração rosa (figuras 11, 12 e 13). Através do meio CHROMagar® *Candida* foram isoladas 27 amostras do Grupo 1 (Irradiados) e 25 amostras do Grupo 2 (Portadores de prótese). De todas as amostras testadas (n=52), 25 amostras (48%) foram identificadas como *C. albicans*, 18 amostras (34,6%) foram identificadas como *C. tropicalis* e 4 (7,7%) como *C. krusei*. No entanto, 5 amostras (9,7%) não puderam ser identificadas por este método pois as colônias não apresentavam as colorações descritas pelo fabricante – verde, azul ou rosa. Essas colônias, que não puderam ter a identificação presuntiva pelo meio CHROMagar® *Candida* apresentaram colorações branca, bege e rosa arroxeada (Anexos 4 e 5).

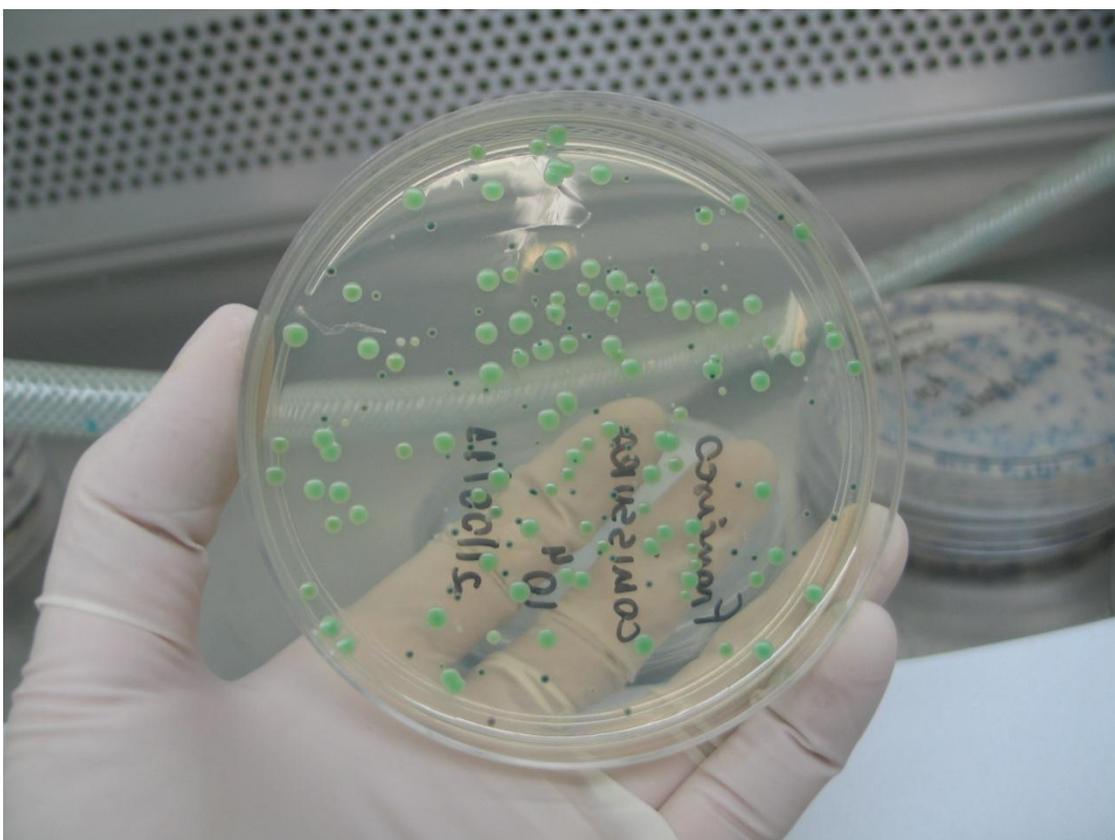


Figura 11: Identificação presuntiva de *C.albicans* – CHROMagar® *Candida* com 2 morfotipos

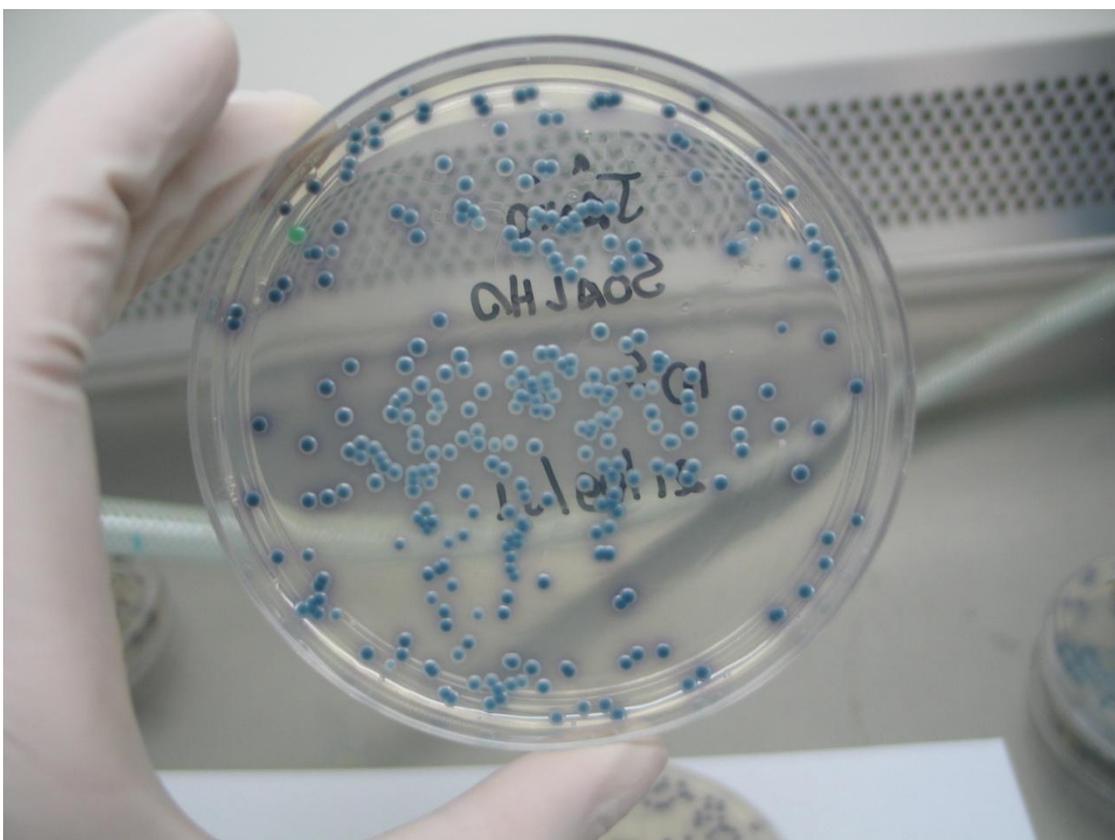


Figura 12: Identificação presuntiva de *C. tropicalis* - CHROMagar® *Candida*. Observar a presença de outro morfotipo na placa (verde) no canto superior esquerdo.

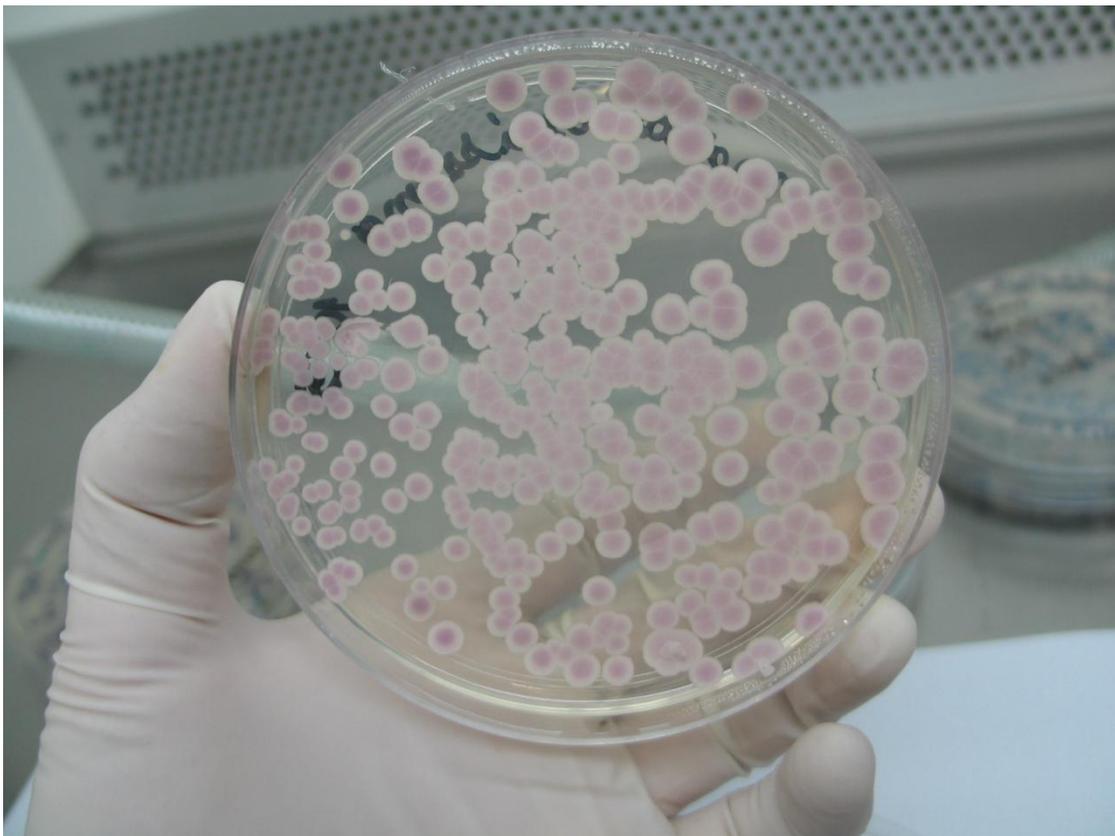


Figura 13: Identificação presuntiva de *C. krusei* – CHROMagar® *Candida*

Considerando somente o Grupo 1, 9 amostras (33,3%) foram identificadas como *C. albicans*, 14 (51,9%) como *C. tropicalis*, e 2 (7,4%) como *C. krusei*. 2 amostras (7,4%) não foram identificadas por apresentarem outras colorações (branca e bege) não descritas pelo fabricante.

Em relação ao Grupo 2, das 25 amostras isoladas pelo CHROMagar® *Candida*, foram identificadas 15 (60%) como sendo *C. albicans*, 4 (16%) como *C. tropicalis*, 2(8%) como *C. krusei* e 3 (12%) não foram identificadas. Os resultados da identificação com o meio CHROMagar® *Candida* estão descritos nas figuras 14 e 15.

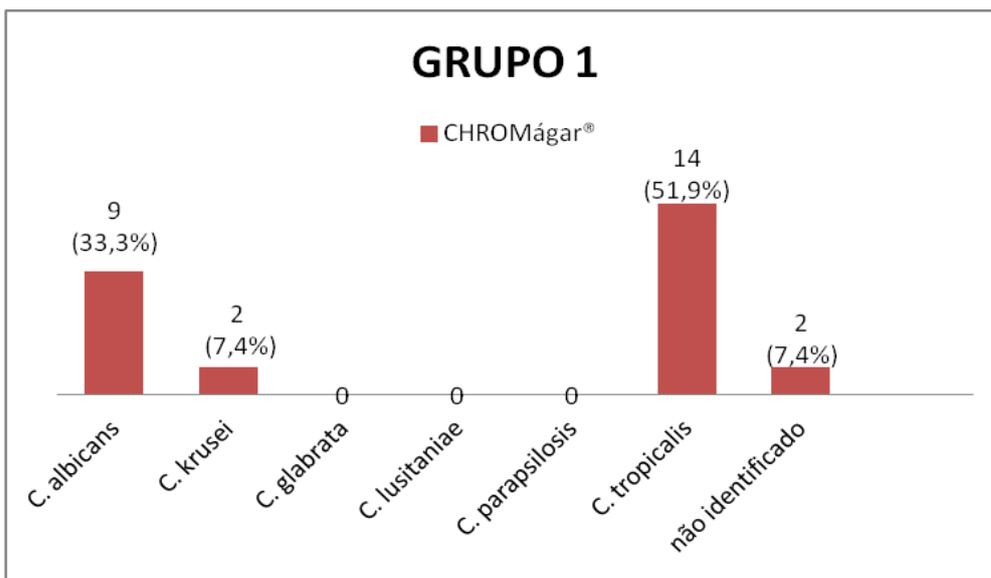


Figura 14: Identificação presuntiva(Grupo 1) utilizando o meio CHROMagar® 27 amostras

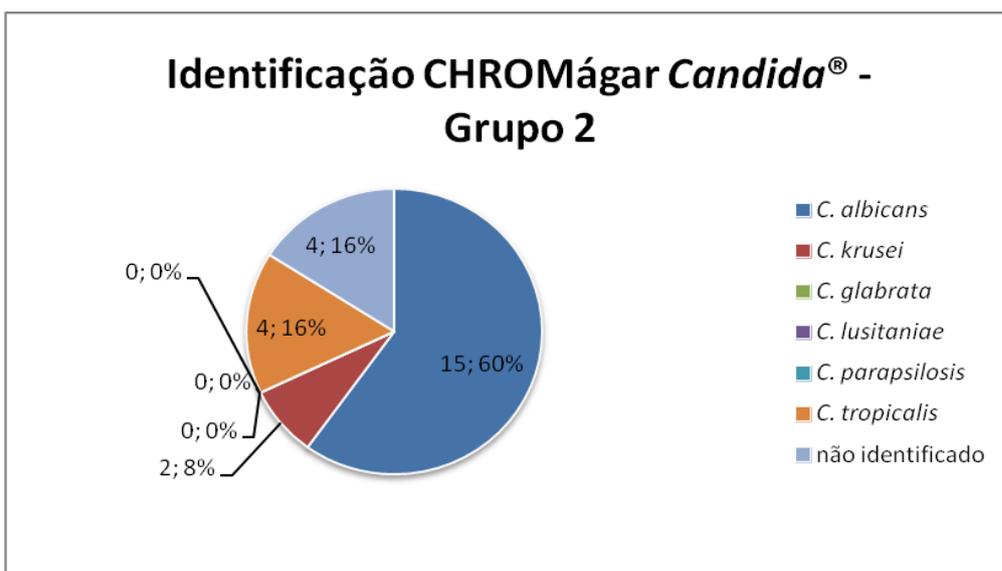


Figura 15: Identificação presuntiva (Grupo 2) utilizando o meio CHROMagar® *Candida* 25 amostras

### 5.2.3. Identificação das leveduras por biologia molecular (PCR EI-1)

Após a identificação das leveduras pelo método bioquímico e pela identificação presuntiva do meio CHROMagar® *Candida*, representantes de cada morfotipo foram selecionados para a confirmação da identificação, através da técnica de impressão digital do DNA (*fingerprint*) com o *primer* EI1. Quando os ciclos da PCR foram concluídos, os

produtos de cada amostra foram colocados em gel de agarose a 1,5% e analisados por eletroforese. As amostras que se assemelharam no CHROMagar® *Candida* foram colocadas lado a lado nos géis e as bandas foram coradas e fotografadas (Figura 16). As amostras que se mostravam idênticas na eletroforese eram consideradas da mesma espécie. Cada representante de cada grupo foi posteriormente sequenciado (região D1/D2 da subunidade maior do rDNA) para a confirmação desta identidade através da comparação das sequências dos nucleotídeos obtidos neste trabalho com outras sequências já previamente depositadas no gene bank. Para a realização deste procedimento foram utilizados dois programas (software): *Electropherogram quality analysis* (Embrapa) e o *Blast* (Basic Local Alignment Search Tool) que encontra regiões de similaridade entre as sequências biológicas.

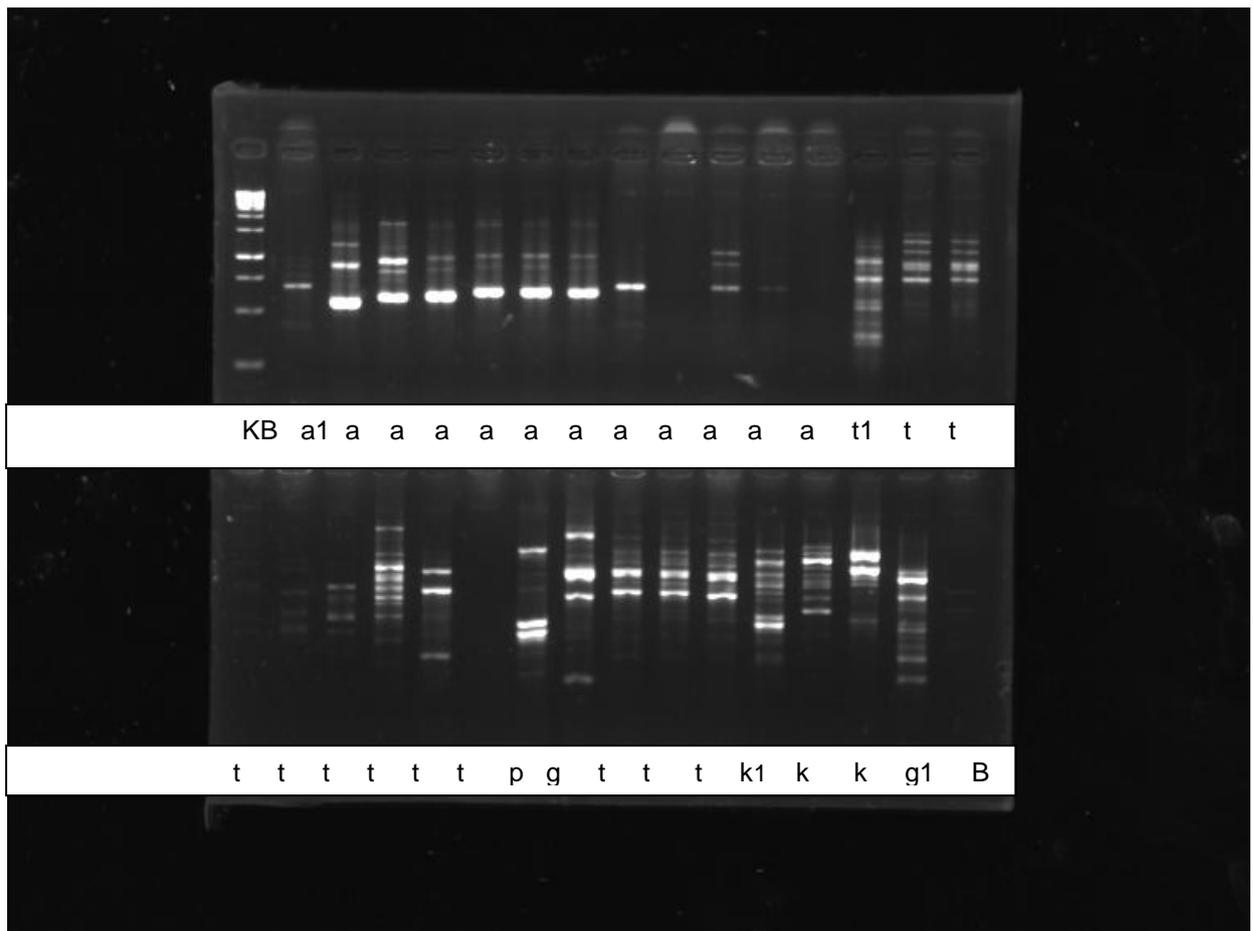


Figura 16: As amostras semelhantes no CHROMagar® *Candida* foram colocadas lado a lado para a corrida em gel de agarose 1,5%. KB (padrão), (a-*C. albicans*), (a1-*C. albicans* ATCC), (t-*C. tropicalis*), (t1-*C. tropicalis* ATCC), (g-*C. glabrata*), (g1-*C. glabrata* ATCC), (p-*C. parapsilosis* ATCC), (k-*C. krusei*), (k1-*C. krusei* ATCC), (B-branco).

Após a identificação pela PCR e confirmação pelo sequenciamento, o número de leveduras para o Grupo1 (Irradiados em região de cabeça e pescoço) foi: 27 isolados, sendo que 10 (37,1%) foram identificadas como *C. albicans*, 15 (55,5%) foram identificadas como *C. tropicalis* e 2 (7,4%) como *C. krusei*. O PCR EI 1 não confirmou a identificação das *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* com determinada pelo Kit Candifast® e as 2 amostras que o meio CHROMagar® *Candida* não havia identificado eram na verdade *C. albicans* e *C. tropicalis*. A figura 17 ilustra estes dados.

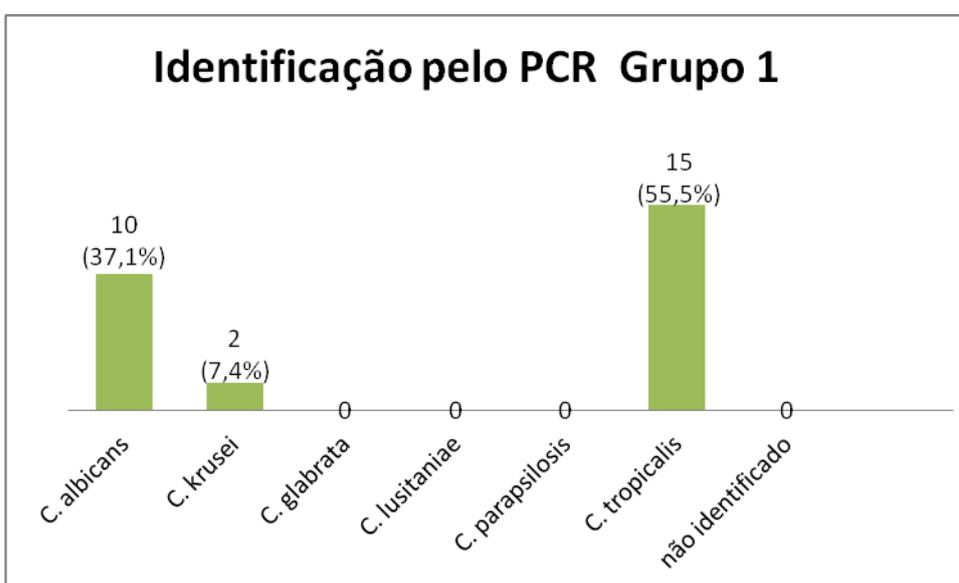


Figura 17: Identificação pela PCR (EI 1 e NL1/NL4) no Grupo 1

No Grupo 2 (Portadores de Prótese), foram isoladas 25 leveduras, sendo que 17 (68%) das amostras foram identificadas como *C. albicans*, 5 (20%) como *C. tropicalis*, 2 (8%) como *C. glabrata* e 1 (4%) *C. parapsilosis*. A figura 18 mostra os resultados descritos.

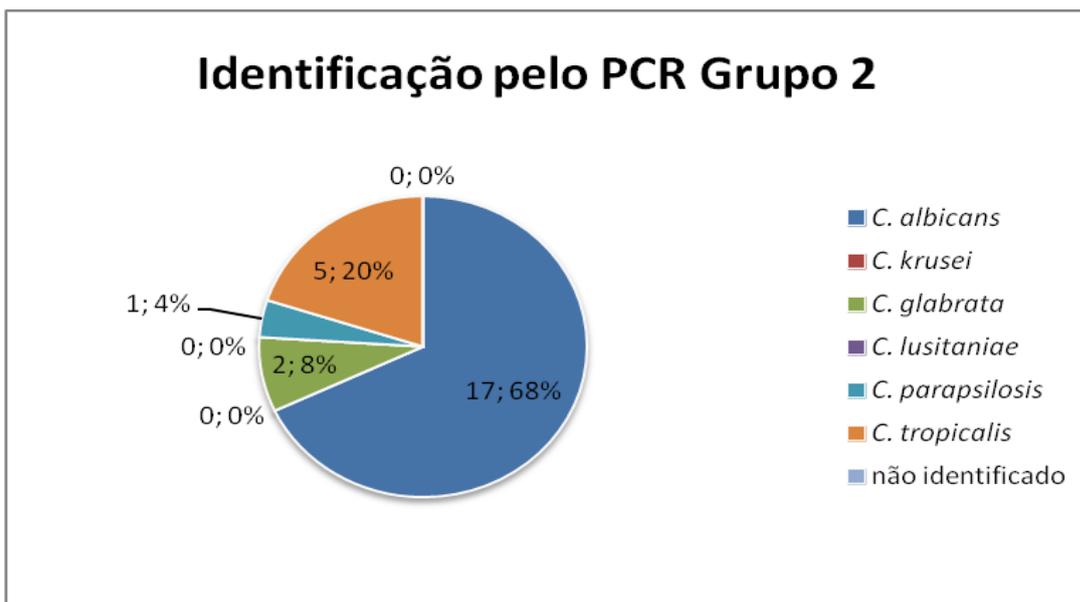


Figura 18. Identificação pela PCR (EI 1 e NL1/NL4) no Grupo 2

Assim, O Kit Candifast® permitiu a identificação de 18 isolados de leveduras no Grupo 1 e de 14 leveduras no Grupo 2. Pelo outros dois métodos de identificação foi possível isolar um número maior de micro-organismos pois o meio CHROMagar® *Candida* permite um melhor separação visual de morfotipos, diferentemente do meio ágar Sabouraud, onde a distinção das leveduras é bem dificultada. Essa diferença na identificação do morfotipo é ilustrada nas figuras 19 e 20.

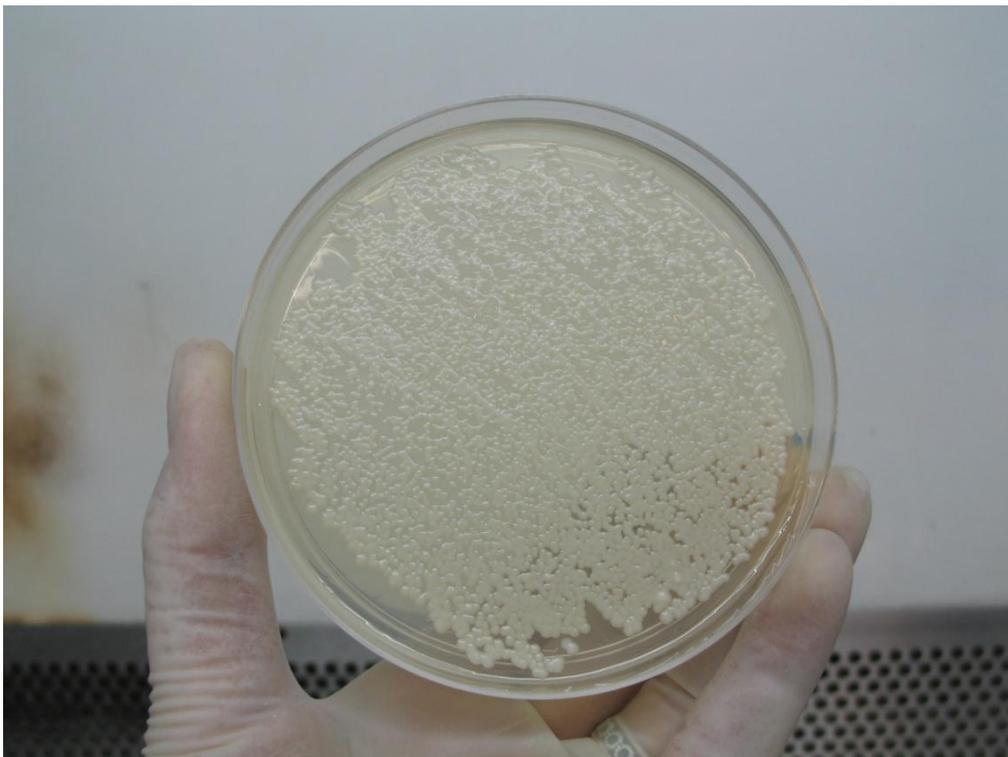


Figura 19: Meio ágar Sabouraud mostrando o mesmo morfotipo de leveduras

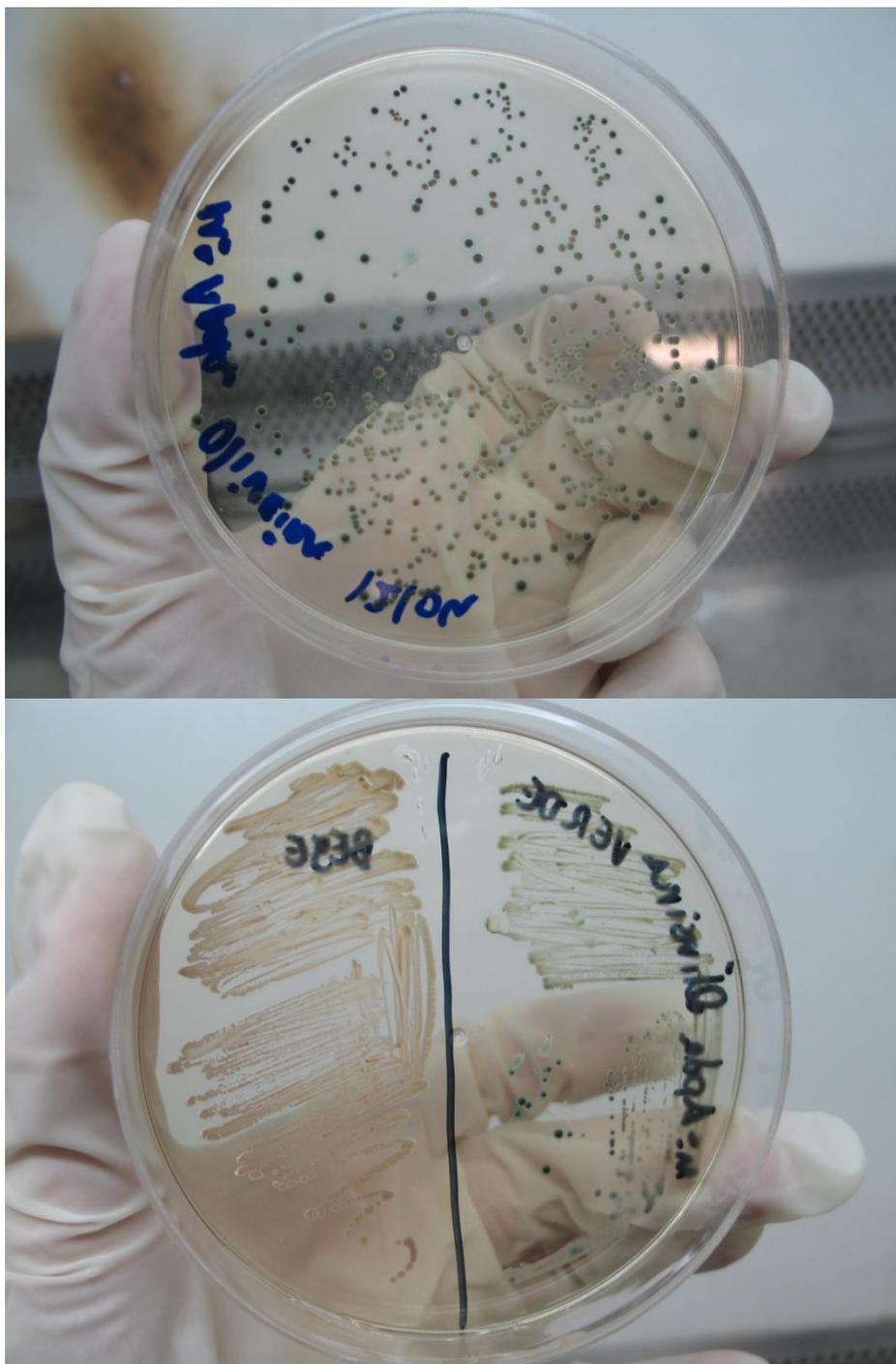


Figura 20. Meio CHROMagar® *Candida* mostrando dois morfotipos de leveduras, no mesmo paciente: cor verde (*C. albicans*), cor bege (*C. parapsilosis*)

Portanto, quando se comparou os três métodos de identificação utilizados neste presente estudo, foi observado que os resultados obtidos com o meio CHROMagar® *Candida* coincidiram em quase 100% com aqueles apresentados com a PCR E11. No entanto, quando a PCR foi comparado com o kit Candifast®, houve divergências nos resultados nos 2 grupos. O kit identificou erroneamente algumas leveduras como, por exemplo, *C. lusitaniae*, *C.*

*parapsilosis* e *C. glabrata* no Grupo 1, que não foram confirmadas pela PCR e em relação ao Grupo 2, o Candifast® identificou somente *C. albicans*, o que não foi confirmado pela PCR. EII, que identificou outras 3 espécies de leveduras: *C. tropicalis* (5 amostras), *C. glabrata* (2) e *C. parapsilosis* (1). Assim, no grupo 1, onze espécies (4 *C. albicans*, 6 *C. tropicalis* e 1 *C. krusei*) foram corretamente identificadas com o Candifast® (61,8% de concordância com a PCR) enquanto que na avaliação do Grupo 2, foram encontrados sete isolados de *C. albicans* (50% de concordância com a PCR). As figuras 21 e 22 mostram dados comparativos desses três métodos de identificação nos dois grupos de pacientes estudados.

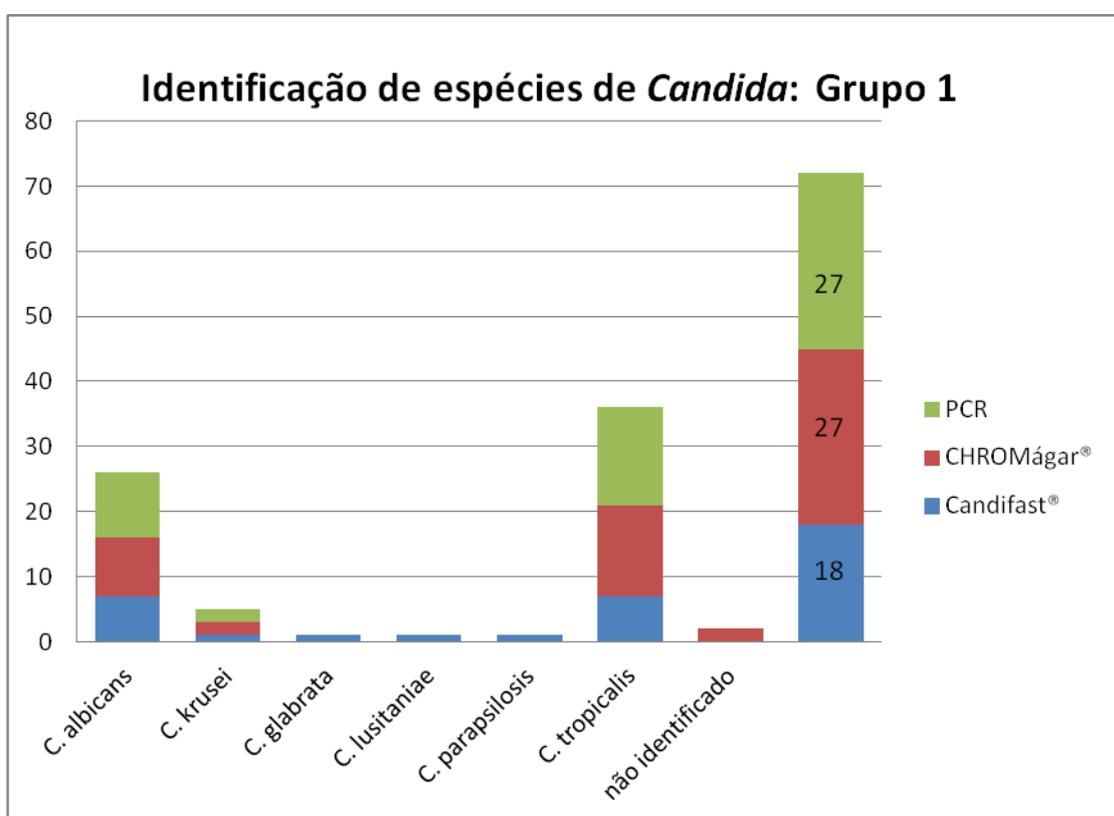


Figura 21: Identificação das espécies de *Candida* utilizando três métodos (Grupo 1)

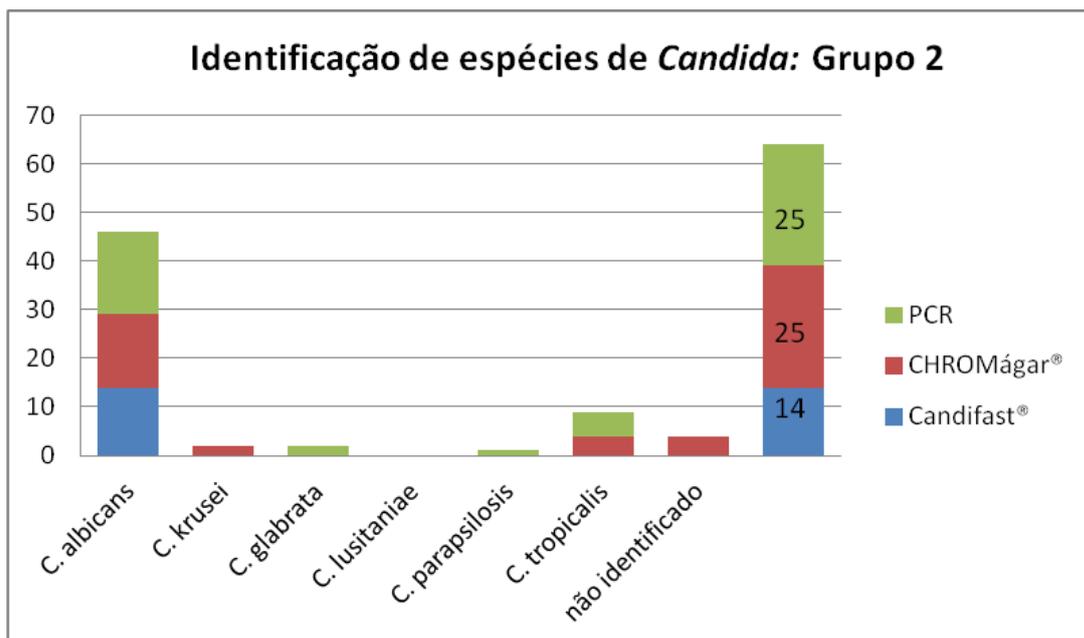


Figura 22: Identificação das espécies de *Candida* utilizando três métodos (Grupo 2)

Considerando como padrão-ouro o teste da PCR, foi calculada a sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia dos métodos Candifast® e CHROMagar® *Candida* para se avaliar qual método foi mais eficiente. Pelos resultados apurados pode-se observar que a acurácia do CHROMagar® *Candida* é bem superior ao Candifast®, mostrando valores de acurácia de 93,9% para o Grupo 1 e 82,3% para o Grupo 2. Quando considerou a identificação de cada espécie, O CHROMagar® *Candida* se mostrou sensível e específico, enquanto que o Candifast® se mostrou específico, porém pouco sensível, no momento em que várias espécies de *Candida* não foram identificados com este método bioquímico. Os resultados desta análise estatística utilizando o Teste de Diagnóstico estão mostrados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: **Grupo 1** - Comparação de diferentes métodos de identificação de *Candida* sp., em relação ao método Padrão-ouro PCR.

Espécie analisada	Método testado	Acurácia (%)	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
<b>Geral</b> (n=45)	Candifast <sup>®</sup>	33,3	41,6	11,1	55,5	6,6
	CHROMágar <sup>®</sup>	93,9	92,6	100	100	75
<i>C. albicans</i>	Candifast <sup>®</sup>	72,7	40	86,9	57,1	76,9
	CHROMágar <sup>®</sup>	96,9	90	100	100	95,8
<i>C. tropicalis</i>	Candifast <sup>®</sup>	63,6	33,3	88,8	71,4	61,5
	CHROMágar <sup>®</sup>	96,9	93,3	100	100	94,7
<i>C. glabrata</i>	Candifast <sup>®</sup>	96,9	N/A	96,9	0	100
	CHROMágar <sup>®</sup>	100	N/A	100	N/A	100
<i>C. krusei</i>	Candifast <sup>®</sup>	96,9	50	100	100	96,8
	CHROMágar <sup>®</sup>	100	100	100	100	100
<i>C. parapsilosis</i>	Candifast <sup>®</sup>	96,9	N/A	96,9	0	100
	CHROMágar <sup>®</sup>	100	N/A	100	N/A	100
<i>C. lusitanae</i>	Candifast <sup>®</sup>	96,9	N/A	96,9	0	100
	CHROMágar <sup>®</sup>	100	N/A	100	N/A	100

S = Sensibilidade; E = Especificidade; VPP = Valor Preditivo Positivo; VPN = Valor Preditivo Negativo; N/A – Não se aplica: quando não há identificação da amostra pelo padrão-ouro.

ND – O método não foi capaz de identificar nenhuma amostra verdadeiramente negativa.

Tabela 4: **Grupo 2** – Comparação de diferentes métodos de identificação de *Candida* sp., em relação ao método Padrão-ouro PCR.

Espécie analisada	Método testado	Acurácia (%)	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
<b>Geral</b> (n=39)	Candifast <sup>®</sup>	14,7	20	ND	35,7	ND
	CHROMágar <sup>®</sup>	82,3	82,6	81,1	90,5	69,2
<i>C. albicans</i>	Candifast <sup>®</sup>	38,2	29,4	47,0	35,7	40,0
	CHROMágar <sup>®</sup>	94,1	88,2	100	100	89,4
<i>C. tropicalis</i>	Candifast <sup>®</sup>	85,3	0	100	N/A	85,3
	CHROMágar <sup>®</sup>	97,0	80,0	100	100	96,6
<i>C. glabrata</i>	Candifast <sup>®</sup>	94,1	0	100	N/A	100
	CHROMágar <sup>®</sup>	94,1	0	100	N/A	100
<i>C. krusei</i>	Candifast <sup>®</sup>	100	N/A	100	N/A	100
	CHROMágar <sup>®</sup>	94,1	N/A	94,1	0	100
<i>C. parapsilosis</i>	Candifast <sup>®</sup>	97,0	0	100	0	100
	CHROMágar <sup>®</sup>	97,0	0	100	0	100
<i>C. lusitanae</i>	Candifast <sup>®</sup>	100	Esta espécie não foi identificada por nenhum dos 3 métodos.			
	CHROMágar <sup>®</sup>	100				

S = Sensibilidade; E = Especificidade; VPP = Valor Preditivo Positivo; VPN = Valor Preditivo Negativo; N/A – Não se aplica: quando não há identificação da amostra pelo padrão-ouro.

### 5.3. Resultados dos testes de resistência aos antifúngicos

A análise da resistência aos antifúngicos usuais foi realizada pela técnica da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – figuras 23 e 24 e pela parte do kit Candifast® destinada para este fim (figura 25). No Kit Candifast®, a fileira para o teste de resistência possui sete antifúngicos que podem ser testados. São eles: a anfotericina B, a nistatina, a flucitosina, o econazol, o cetoconazol, o miconazol e o fluconazol. Para a realização da técnica da CIM foram utilizadas seis drogas. O fluconazol, o itraconazol e a anfotericina B são as drogas mais utilizadas na rede pública e a suas doses de ação assim como as dosagens em que o micro-organismo já é resistente tem sido bem elucidados pelo CLSI (2008). As demais drogas, a nistatina, o miconazol e o cetoconazol, além de serem largamente utilizadas na odontologia, faziam também parte do Kit Candifast®, podendo assim serem comparadas. Os dados relativos aos resultados dos testes de susceptibilidade das amostras estão demonstrados nos anexos 6 e 7.



Figura 23: Concentração Inibitória Mínima (CIM) para nistatina. Faixa Intervalar (16 $\mu$ g/mL-0,031 $\mu$ g/mL). Fileira esquerda (1): Controle de Esterilidade; Fileira direita (12): Controle de Crescimento.

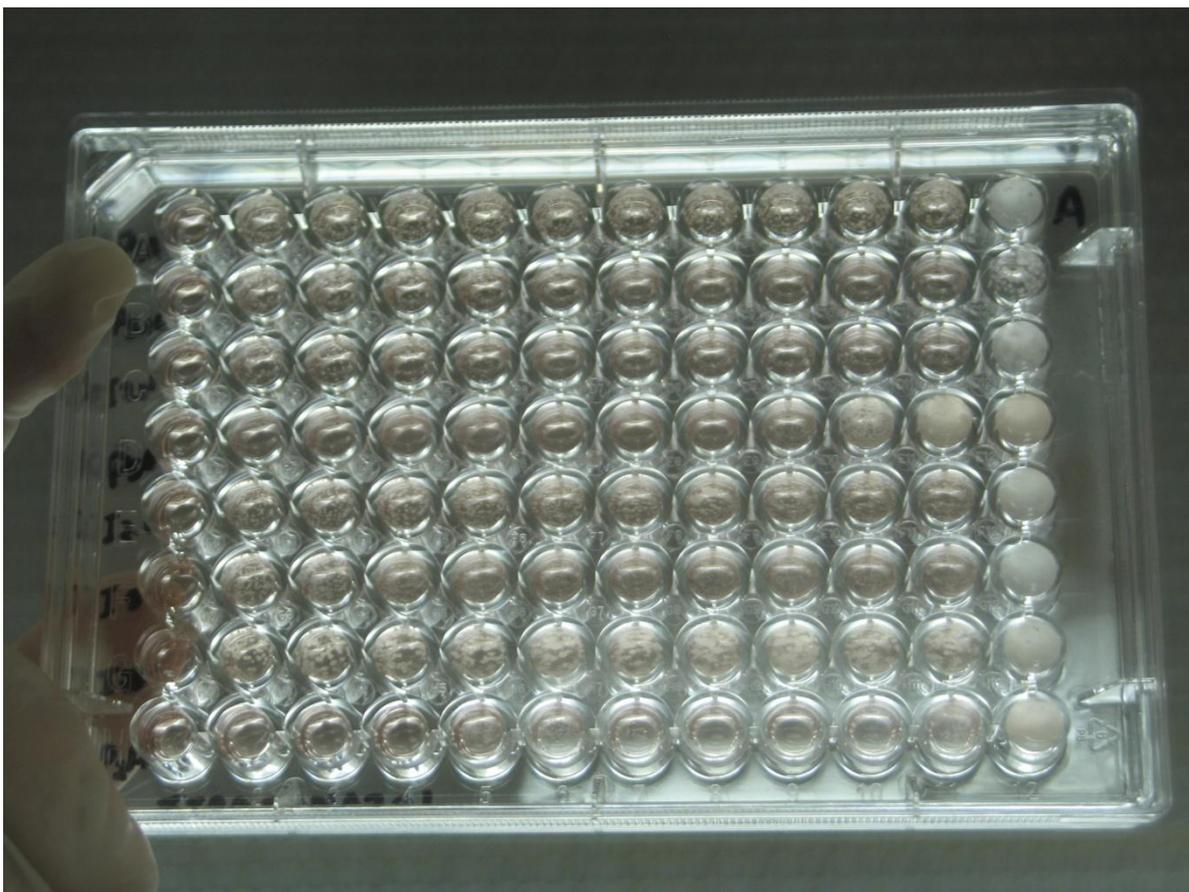


Figura 24: Concentração Inibitória Mínima para o itraconazol: observar o efeito "trailing" em alguns pocinhos.



Figura 25: Teste de resistência aos antifúngicos Candifast®: Positivo para anfotericina B e miconazol

Considerando a técnica da CIM, a anfotericina B teve uma ótima sensibilidade para todas as espécies de *Candida*, tanto no Grupo 1 quanto no Grupo 2, com exceção para as *C. krusei* (n=2), identificadas no Grupo 1 que foram resistentes a este medicamento. Em relação ao cetoconazol, a grande maioria das espécies de *Candida* foram totalmente sensíveis a ele, sendo que no grupo 1, 10% dos isolados *C. albicans* e 40% das *C. tropicalis* mostraram-se resistentes a este antifúngico. No Grupo 2, 29% dos isolados de *C. albicans* e 40% das *C. tropicalis* mostraram-se resistentes ao cetoconazol. As demais espécies isoladas se mostraram sensíveis a ele. Em relação ao fármaco fluconazol as amostras de *C. albicans* do Grupo 1 foram 80% sensíveis e 10% sensíveis dose-dependentes; no entanto em relação ao Grupo 2 as mesmas espécies mostraram 41% de resistência ao fluconazol e as espécies *C. tropicalis* mostraram 40% de resistência. O único isolado de *C. parapsilosis* foi também resistente. Assim, o grupo 2 foi aquele onde o fluconazol foi menos eficaz. As duas espécies identificadas como *C. krusei* foram pela leitura da CIM, dose-dependentes ao fluconazol (faixa de 16-32 µg/mL). No entanto, pelo CLSI (2008) a *C. krusei* não obedece esta regra,

visto que tal levedura já tem uma resistência intrínseca à esta droga. Portanto todas espécies encontradas devem ser consideradas resistentes ao fluconazol. Para o itraconazol, antifúngico que não compõe o kit candifast®, a maioria das espécies de *C. albicans* e *C. tropicalis* foram sensíveis a ele. Porém no Grupo 2 houve uma taxa maior de resistência (40%) para os isolados *C. tropicalis*. Das duas espécies *C. krusei* isoladas (Grupo 1) e das duas *C. glabrata* isoladas (Grupo 2), uma foi susceptível e a outra dose-dependente ao antifúngico. Em relação ao miconazol, as espécies *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* foram 100% sensíveis, no entanto para as espécies *C. albicans* no Grupo 1 foi encontrada uma resistência de 50%, número muito superior à resistência encontrada para os mesmos isolados do Grupo 2 (12%). 100% das leveduras *C. tropicalis* encontradas no Grupo 2 foram sensíveis a este fármaco.

Todos os isolados, nos Grupos 1 e 2 foram sensíveis à nistatina. Esses dados estão descritos na tabela 3. A tabela 4 mostra os valores da CIM encontrados na pesquisa, descrevendo os intervalos apurados para cada levedura em relação ao antifúngico testado. O CIM 50 corresponde ao valor de CIM onde houve inibição de 50% dos isolados. O CIM 90 corresponde ao valor da CIM que inibiu 90% dos isolados. Nas células que se mostram vazias, não foi possível encontrar esses valores.

Tabela 5: Perfis de susceptibilidade *in vitro* (CIM) de isolados clínicos de *Candida* utilizando metodologia CLSI ( $\mu\text{g/mL}$ )

Antifúngico/amostra		anfotericina B (a)			cetonazol (b)			fluconazol (a)			itraconazol (a)			miconazol (c)			nistatina (d)		
		S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R
		< 1	—	$\geq 1$	< 4	—	$\geq 4$	< 8	16 - 32	$\geq 64$	< 0,125	0,25 - 0,5	$\geq 1$	< 4	—	$\geq 4$	$\leq 8$	—	$> 8$
<i>C. albicans</i>																			
Grupo 1	10	10 (100%)	—	0 (0%)	9 (90%)	—	1 (10%)	8 (80%)	1 (10%)	1 (10%)	9 (90%)	0 (0%)	1 (10%)	5 (50%)	—	5 (50%)	10 (100%)	—	0 (0%)
Grupo 2	17	17 (100%)	—	0 (0%)	12 (71%)	—	5 (29%)	9 (53%)	1 (6%)	7 (41%)	12 (71%)	1 (6%)	4 (23%)	15 (88%)	—	2 (12%)	17 (100%)	—	0 (0%)
<i>C. tropicalis</i>																			
Grupo 1	15	15 (100%)	—	0 (0%)	9 (60%)	—	6 (40%)	10 (67%)	0 (0%)	5 (33%)	9 (60%)	1 (7%)	5 (33%)	13 (87%)	—	2 (13%)	15 (100%)	—	0 (0%)
Grupo 2	5	5 (100%)	—	0 (0%)	3 (60%)	—	2 (40%)	3 (60%)	0 (0%)	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)	2 (40%)	5 (100%)	—	0 (0%)	5 (100%)	—	0 (0%)
<i>C. krusei</i>																			
Grupo 1	2	0 (0%)	—	2 (100%)	2 (100%)	—	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	2 (100%)	—	0 (0%)	2 (100%)	—	0 (0%)
Grupo 2	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. glabrata</i>																			
Grupo 1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Grupo 2	2	2 (100%)	—	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	—	0 (0%)
<i>C. parapsilosis</i>																			
Grupo 1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Grupo 2	1	1 (100%)	—	0 (0%)	1 (100%)	—	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	—	0 (0%)	1 (100%)	—	0 (0%)

a - Pontos de susceptibilidade estabelecidos para levedura do gênero *Candida* segundo CSLI (Clinical and Laboratory Standards Institute) de 2008.

b - FIGUEIREDO 2006.

c - GUPTA e KOHLI (2003)

d - RICHTER et al. (2005); BRESCANSIN (2006)

Tabela 6: CIM 50, CIM 90 e intervalo ( $\mu\text{g/mL}$ ) para anfotericina B, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina em relação às espécies de leveduras estudadas (leitura 48 horas)

Micro-organismo (amostra) / Grupo	Pacientes	Isolados	CIM da anfotericina B			CIM do cetoconazol			CIM do fluconazol			CIM do itraconazol			CIM do miconazol			CIM da nistatina		
			CIM 90	CIM 50	Intervalo	CIM 90	CIM 50	Intervalo	CIM 90	CIM 50	Intervalo	CIM 90	CIM 50	Intervalo	CIM 90	CIM 50	Intervalo	CIM 90	CIM 50	Intervalo
Grupo 1	15	27																		
<i>C. albicans</i>	8	10	0,25	-	0,125-0,5	0,015	-	0,015-8	-	0,25	0,125-64	0,031	-	0,031-4	-	4	0,015-4	-	4	0,5-8
<i>C. tropicalis</i>	9	15	0,5	-	0,25-0,5	-	2		-	0,25	0,25-64	-	0,031	0,031-16	-	2	0,125-8	-	0,5	0,5-8
<i>C. krusei</i>	2	2	1	-	1	0,5	0,5	0,5	32	32	32	-	0,125/0,25	0,125-0,25	2	2	2			
Grupo 2	12	25																		
<i>C. albicans</i>	10	17	0,25	0,25	0,125-0,5	-	0,015	0,015-8	-	64	0,25-64	0,031	16	0,031-16	2	-	0,25-8	-	4	0,5-8
<i>C. tropicalis</i>	3	5	0,5	0,25	0,25-0,5	-	2	2-8	0,25	-	0,25-64	-	16	0,031-16	2	0,25	0,25-8	-	2	0,5-8
<i>C. glabrata</i>	2	2	0,5	0,5	0,5	-	0,125/0,25	0,125-0,25	-	1/4	1-4	-	0,062/0,125	0,062-0,125	-	0,125/0,5	0,125-0,5	-	4/8	4-8
<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	64	64	64	0,031	0,031	0,031	1	1	1	2	2	2

Em relação ao teste de susceptibilidade aos antifúngicos usuais, o Kit Candifast® identificou no Grupo 1 sete espécies *C. albicans* e destas, 100% se mostraram resistentes ao miconazol, 28,5% resistentes ao fluconazol e à anfotericina B, 14,2% resistentes a flucitosina e ao cetoconazol. Das 14 espécies isoladas identificadas como *C. albicans* no Grupo 2, 64,2% se mostraram resistentes ao fluconazol e ao miconazol, 21,4% foram resistentes a anfotericina B e 7,1% se mostrou resistente ao econazol. Em relação às *C. tropicalis* identificadas no Grupo 1, 85,7% se mostrou resistente ao miconazol, enquanto que 57,1% foram resistentes ao fluconazol, anfotericina B, econazol e 14,2% (um isolado) se mostrou resistente à nistatina. No Grupo 1 a espécie identificada como *C. krusei* foi resistente ao miconazol e ao fluconazol. A *C. glabrata* identificada no Grupo 1 foi sensível a todos os antifúngicos. A espécie identificada como *C. parapsilosis* se mostrou resistente a anfotericina B e ao miconazol, enquanto que a *Candida* identificada como *C. lusitaniae* foi resistente ao miconazol (Tabela 7).

Quando se analisou o susceptibilidade antifúngica das espécies identificadas pelo Candifast® que coincidiram com a identificação molecular da PCR, outra tabela foi obtida com o intuito de comparar melhor estes resultados. No Grupo 1, onze espécies foram corretamente identificadas com o Candifast® (61,8% de concordância com a PCR). Dessas espécies, 4 foram *C. albicans*, 6 *C. tropicalis* e 1 *C. krusei*. Em relação às espécies *C. albicans*, 100% se mostraram resistentes ao miconazol, 25% à anfotericina B e 25% ao fluconazol. As espécies *C. tropicalis* foram 83,3% resistentes ao miconazol e 50% ao fluconazol, á anfotericina B e ao econazol. 16,6% dos isolados (1 amostra) se mostrou resistente à nistatina. A *C. krusei* isolada foi resistente ao miconazol e ao fluconazol. Na avaliação do Grupo 2, foram encontrados sete isolados de *C. albicans* (50% de concordância com a PCR). Destes, 71,4% se mostraram resistentes ao miconazol, 42,8% ao fluconazol, 14,2% à anfotericina B e à flucitosina. Os dados estão descritos na tabela 8.

Tabela 7: Resistência aos antifúngicos utilizando o Teste bioquímico Candifast®

Amostras	Resistência aos Antifúngicos:	Resistência aos Antifúngicos:
	Grupo 1	Grupo 2
<i>C. albicans</i>	miconazol: 100%	fluconazol: 64,2%
Grupo 1 (7)	anfotericina B: 28,5%	miconazol: 64,2%
Grupo 2 (14)	fluconazol: 28,5%	anfotericina B: 21,4%
	cetoconazol: 14,2%	econazol: 7,1%
	flucitosina: 14,2%	
<i>C. tropicalis</i>	miconazol: 85,7%	
Grupo 1 (7)	anfotericina B: 57,1%	
Grupo 2 (0)	fluconazol: 57,1%	
	econazol: 57,1%	
	nistatina: 14,2%	
<i>C. krusei</i>	miconazol: 100%	
Grupo 1 (1)	fluconazol: 100%	
Grupo 2 (0)		
<i>C. glabrata</i>		
Grupo 1 (1)		
Grupo 2 (0)		
<i>C. parapsilosis</i>	anfotericina B: 100%	
Grupo 1 (1)	miconazol: 100%	
Grupo 2 (0)		
<i>C. lusitaniae</i>	miconazol: 100%	
Grupo 1 (1)		
Grupo 2 (0)		

Tabela 8: Resistência aos antifúngicos em amostras onde a identificação Candifast® foi igual à PCR

Amostras			
<b>Grupo 1: 11(61,8)</b>	<i>C. albicans:</i>	<i>C. tropicalis:</i>	<i>C. krusei:</i>
<i>C. albicans</i> (4)	100% miconazol	83,3% miconazol	100% miconazol
<i>C. tropicalis</i> (6)	25% anfotericina B	50% fluconazol	100% fluconazol
<i>C. krusei</i> (1)	25% fluconazol	50% anfotericina B	
		50% econazol	
		16,6% nistatina	
<b>Grupo 2: 7 (50%)</b>	miconazol: 71,4%		
<i>C. albicans</i> (7)	fluconazol: 42,8%		
	anfotericina B: 14,2%		
	flucitosina: 14,2%		

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo permitiu a identificação das principais espécies de *Candida* que colonizam a cavidade oral por três métodos: o método bioquímico (Candifast®, o meio CHROMagar® *Candida* e a identificação molecular pela PCR EI 1 e pela PCR NLI/NL4. Em relação ao Grupo 1 (Pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço), vários estudos demonstraram que durante a radioterapia, o número de espécies não-*albicans* aumentam significativamente, mas a *C. albicans* ainda é a espécie mais prevalente (BELAZI et al, 2004; JHAM et al, 2007). O presente estudo não confirmou estes achados, demonstrando uma maior prevalência, pelo método da PCR, da *C. tropicalis*, com 55,5% das amostras identificadas, seguidas por *C. albicans* (37,1%) e *C. krusei* (7,4%). Esse aumento da incidência pode atribuída à radioterapia intensa a que o paciente se submete, à associação com a quimioterapia ou ao método por vezes inadequado utilizado na identificação desses micro-organismos pelos diversos autores.

Em relação ao Grupo 2, foram identificadas 68% de *C. albicans*, seguidos de 20% de *C. tropicalis*, 8% de *C. glabrata* e 4% de *C. parapsilosis*. Os resultados dessa pesquisa estão de acordo com o experimento de Oliveira et al. (2010), que encontraram uma maior prevalência de *C. albicans* em pacientes portadores de prótese total, sendo que o palato foi a região mais acometida com as lesões. Em outro trabalho, realizado por Lyon (2006), que tinha como objetivo analisar a variabilidade genética de leveduras do gênero *Candida* na cavidade oral de usuários de prótese total e de indivíduos controle, o autor também concluiu que a *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente encontrada. No entanto, ele cita que a *C. glabrata* foi a segunda espécie mais prevalente, seguida de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Esses resultados diferem dos apurados neste estudo.

Os resultados da identificação utilizando o meio CHROMagar® *Candida* coincidiram em quase 100% com a PCR. Isso mostra que este método pode ser utilizado para a identificação de três tipos de *Candida*: a *C. albicans* (verde), a *C. tropicalis* (azul) e a *C. krusei* (rosa). É um método rápido, e de fácil execução, porém o custo deve ser considerado na sua escolha. Algumas colônias apresentaram pequenas alterações de cores, o que pode ter ocorrido devido a mudanças metabólicas entre os isolados. A maioria dos autores concorda que outras espécies não poderiam ser identificadas com esse método, pois podem apresentar diversos morfotipos e colorações não compatíveis com as descritas pelo fabricante (AUBERTINE et al., 2006; HUNG et al.; 2005).

Embora a *C. dubliniensis* também possa apresentar colorações em tom de verde, Mahanß et al. (2005) fizeram um estudo para diferenciação fenotípica entre as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* e não conseguiram criar um forma precisa de distingui-las utilizando o CHROMágar *Candida*®, o que está de acordo com os nossos resultados.

No presente estudo foi observado que as colônias de *C. glabrata* apresentaram coloração rosa, com aspecto brilhante. Como se tratava de uma colônia rosa, foi identificada pelo CHROMagar® *Candida* como sendo *C. krusei*. No entanto, Madhvan et al. (2011), fizeram em estudo de sensibilidade e especificidade do meio CHROMagar® *Candida* na identificação de leveduras orais e concluíram que a *C. glabrata* poderia também ser identificada por este método, e apresentava morfotipo diferente da *C. krusei*: suas colônias eram convexas, mais puntiformes, bordas regulares e de coloração rosa mais escura. Não tinham o aspecto “seco” de uma *C. krusei*. As espécies que não foram identificadas pelo CHROMagar® *Candida* tinham colorações brancas ou bege. Foram identificadas pelo PCR como *C. albicans*, *C. tropicalis* ou *C. parapsilosis*. Essa última, segundo Madhvan et al. (2011) podem apresentar um número enorme de cores e aspectos diferentes de morfotipo.

O Kit Candifast® mostrou um resultado de 50% de concordância com o método PCR para o Grupo 2 e 61,8% de concordância para o Grupo 1. O fabricante cita um grau de concordância acima de 90% com outros métodos bioquímicos, no entanto não compara com a PCR, que é o padrão ouro na identificação de leveduras. Um aspecto negativo do teste que pode ser citado é a subjetividade na leitura dos resultados do Candifast®. O grau de turbidez do frasco de diluição é medido visualmente, assim como a leitura das cores nos pocinhos. O fabricante elucida que cores “amarelo-alaranjado”, “amarelo” e “fucsina” são “crescimento positivo” e “laranja avermelhado” é “crescimento negativo”. O que se pode avaliar é que muitas vezes essas cores se confundiam. Em relação aos testes de resistência, o Candifast® também se mostra limitado, pois não é possível a determinação da sensibilidade dose-dependente (SDD). Além disso, o fluconazol está presente nos pocinhos com a concentração de 16µg/mL e segundo o CLSI (2008) haveria resistência do isolado se fosse constatado crescimento em uma concentração de 64µg/mL. Seguindo este mesmo raciocínio, espécies que crescem em um meio com concentração acima de 1 µg/mL de anfotericina B são resistentes a este fármaco. No Candifast® a concentração deste está em 4 µg/mL, bem acima do limite estabelecido pelo CLSI (2008), o que pode levar a uma interpretação errada dos resultados. O cetoconazol (FIGUEIREDO, 2006) apresenta perfil de

susceptibilidade semelhante ao miconazol (GRUPTA et al., 2003). Se há crescimento de leveduras em concentração maior ou igual a 4 µg/mL, os isolados são resistentes. Como no kit Candifast® a concentração desses fármacos está em 16 µg/mL, a leitura como “negativo” no pocinho poderia permitir um resultado falso-negativo, no momento em que este teste só mostraria crescimento (mudança de cor no meio) na concentração de 16 µg/mL. De uma forma mais clara, o isolado já poderia se mostrar resistente (crescimento em meio com 4 µg/mL dos antifúngicos), mas o teste bioquímico não permite essa leitura.

O meio ágar Sabouraud é o meio preconizado para se utilizar o Kit Candifast®. Devido ao fato deste meio na maioria das vezes não distinguir os morfotipos das leveduras, o número de isolados determinados pelo Kit Candifast® foi bem menor nos dois grupos em comparação com o meio CHROMagar® *Candida*. Utilizando o meio ágar Sabouraud foram identificadas 18 amostras no Grupo 1 e 14 amostras no Grupo 2. Pelo CHROMagar® *Candida* foram 27 e 25 isolados respectivamente. Assim, o método bioquímico permitiu uma sub-identificação das leveduras e não foi eficiente na diferenciação de outras espécies testadas. Isto sugere que há a necessidade de se reformular a metodologia deste kit. Isso poderia ser feito pela substituição do ágar Sabouraud na primeira etapa da identificação pelo meio CHROMagar® *Candida*. Assim, após haver a identificação de morfotipos diferentes, estas amostras seriam repicadas agora em ágar Sabouraud e o processo de identificação daria prosseguimento seguindo os passos descritos pelo fabricante.

Alguns pacientes testados neste estudo tiveram co-infecção, onde foi possível detectar mais de uma espécie de *Candida* causando a doença. No grupo 1, em quatro pacientes foram detectadas a presença de duas espécies de *Candida*, sendo que em três pacientes ocorreu a co-infecção *C. albicans*-*C. tropicalis* e em um paciente *C. albicans*-*C. krusei*. No Grupo 2, a co-infecção ocorreu em cinco pacientes, sendo que em três pacientes as espécies *C. albicans* e *C. glabrata* estavam presentes simultaneamente, em um ocorreu *C. albicans*-*C. parapsilosis* e em um *C. albicans*-*C. tropicalis*. Vários autores citam a co-infecção em seus trabalhos e sua possível relação com o grau de virulência destes micro-organismos (MAHANB et al., 2005; MADHVAN et al., 2011; PASLIGH et al., 2008; JHAM et al., 2007).

A análise de resistência aos antifúngicos foi feita utilizando dois métodos: O método bioquímico e a técnica da Concentração Inibitória Mínima (CIM). As drogas utilizadas neste trabalho compõem a primeira escolha no tratamento das candidoses

orais. Não existem muitos trabalhos na literatura utilizando o cetoconazol para candidose oral, mas devido à presença deste fármaco no kit Candifast®, ele foi incluído na técnica da CIM. O itraconazol, embora não presente no Kit Candifast® foi incluído na pesquisa por fazer parte de tratamento de candidoses em pacientes imunocomprometidos, neste caso os pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço. O teste de resistência aos antifúngicos é de extrema importância, visto que a partir destes resultados é que a terapia medicamentosa se torna específica e eficaz (CARRILO-MUNOZ et al., 2006; MAKAROVA et al., 2003).

De acordo com os achados desse estudo, o itraconazol poderia ser utilizado na terapia antifúngica nesses pacientes, pois apresentou baixos índices de resistência. Estudos prévios, como o de Resende (1997), confirmam esses achados, no momento em que relata um bom desempenho deste fármaco no tratamento de pacientes hospitalizados.

De todas as espécies identificadas pelo Candifast®, houve um grau de concordância com a PCR de 61,8% no Grupo 1 e 50% no Grupo 2. Considerando a espécie *C. albicans* no Grupo 1, houve 100% de resistência ao miconazol e no CIM esta resistência foi de 50%. No Grupo 2, utilizando a técnica da CIM, somente dois isolados de *C. albicans* se mostraram resistentes ao miconazol (11,7%). Esse resultado difere muito daquele apresentado pelo Candifast®, que foi de 64,2%. Neste mesmo grupo, nenhuma *C. tropicalis* se mostrou resistente ao fármaco. Isso demonstra que o miconazol pode ser utilizado no tratamento da candidose nos pacientes portadores de prótese.

A anfotericina B, que no Candifast® apresentou 25% de resistência, na técnica da CIM demonstrou leveduras totalmente sensíveis. De uma forma geral o Candifast® superestimou a resistência aos antifúngicos, o que pode mostrar mais uma vez a limitação do método, que é subjetivo na visualização da mudança de cor dos pocinhos e não mede a sensibilidade dose-dependente.

Vários autores, dentre eles Pfaller et al. (2007) e Strahilevitz et al. (2000) relatam a maior resistência das espécies *C. krusei* e *C. glabrata* ao fluconazol e ao itraconazol. Tais resultados não foram confirmados neste presente estudo com a CIM, no momento em que as duas espécies de *C. glabrata* (100%) foram sensíveis ao fluconazol e em relação ao itraconazol um isolado se mostrou dose-dependente e o outro totalmente sensível. A CIM mostrou uma sensibilidade dose-dependente da *C. krusei* em relação ao fluconazol, mas para essa espécie a escala não pode ser seguida

pois, já existe uma resistência intrínseca desta espécie ao fluconazol. Assim, todos os isolados *C. krusei* devem ser considerados como resistentes em relação ao fluconazol (CLSI 2002; CLSI 2008). Pelo Kit Candifast®, a *C. krusei* identificada foi resistente ao miconazol e ao fluconazol.

Todas as leveduras testadas foram sensíveis à nistatina. As leveduras são sensíveis à mesma quando a dose até 8µg/mL inibe o crescimento do fungo. Embora várias leveduras apresentassem a CIM nesta faixa, isso mostra que elas ainda são sensíveis. Como a nistatina é um fármaco bem tolerado pelo organismo, com pequenos efeitos colaterais, ele poderia ser utilizado nos dois grupos de pacientes. Uma única levedura, *C. tropicalis*, identificada pelo Candifast®, se mostrou resistente a este medicamento, e no exame clínico foi constatado o seu uso prévio e contínuo (BRESCANSIN, 2006; RICHTER et al., 2005).

Kuriyama (2005) relata em seu trabalho uma tendência à *C. glabrata* e à *C. tropicalis* a serem resistentes à anfotericina B e aos triazóis, no entanto os resultados desta pesquisa não apontam tal resistência.

Neste presente estudo, foi observado o efeito *trailing* (crescimento residual) em algumas amostras quando se utilizou os azólicos. Segundo o CLSI (2008) este efeito pode ser esperado em 5% das amostras testadas. Existe uma controvérsia se os isolados com esse comportamento deveriam ser considerados “sensíveis” ou “resistentes”, mas o documento M27A3 do CLSI (2008) classifica esses isolados como sensíveis. Segundo Tornatore et al. (1997), o efeito *trailing* pode ser influenciado pelo tamanho do inóculo, pelo tempo de incubação e pelo pH do meio. Desta forma, em relação ao ponto de inibição do crescimento, a metodologia visual do CLSI pode-se tornar subjetiva, particularmente quando agentes fungistáticos são utilizados, pois este fenômeno dificulta a determinação da CIM, como observado no presente estudo. Nas amostras onde o efeito *trailing* ocorreu, novos ensaios foram realizados, utilizando um meio RPMI de pH ácido (5) com adição de glicose a 2%. Esse procedimento para a redução do pH do meio é citado no trabalho de Marr et al. (1999).

Na descrição dos resultados, foi constatado que o efeito *trailing* ocorreu em três agentes antifúngicos. São eles o cetoconazol, o fluconazol e o itraconazol. No Grupo 1, foi observado o efeito *trailing* em seis espécies de *C. albicans* (60%) e em oito espécies de *C. tropicalis* (53,3%) utilizando o fluconazol. Em relação ao cetoconazol, sete isolados de *C. albicans* (70%) mostraram também este efeito, enquanto que para o itraconazol o efeito ocorreu em sete isolados de *C. tropicalis* (46,6%). Esses achados

concordam com os estudos de Arthington-Skaggs et al. (2002), que avaliaram este fenômeno em 944 isolados clínicos de *C. albicans* e *C. tropicalis* nos testes com itraconazol (16,3%) e fluconazol (18,2%), no entanto proporcionalmente neste estudo o efeito *trailing* foi maior.

## 7. CONCLUSÕES

- Dentre as formas clínicas de candidose apresentadas, a forma pseudomembranosa foi a mais prevalente no Grupo 1, enquanto que a estomatite por dentadura foi a mais encontrada no Grupo 2.
- A língua, seguida pelo palato, foi o sítio de maior acometimento das lesões no grupo 1, enquanto que no Grupo 2, 83,3% dos pacientes apresentaram a candidose no palato.
- Pela identificação molecular utilizando a PCR, foram identificadas no grupo de pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço (Grupo 1) três espécies de *Candida*: *C. tropicalis* (55,5%), *C. albicans* (37,1%), e *C. krusei* (7,4%). No grupo de pacientes portadores de próteses removíveis (Grupo 2) foram identificadas quatro espécies: *C. albicans* (68 %), *C. tropicalis* (20%), *C. glabrata* (8%) e *C. parapsilosis* (4%).
- A espécie *C. tropicalis* foi a espécie mais encontrada no Grupo 1 (Irradiados em região de cabeça e pescoço). A espécie *C. albicans* foi a espécie mais encontrada no Grupo 2 (portadores de prótese).
- O Kit Candifast® foi falho na identificação de várias espécies de *Candida*, pois comparando com o método de identificação molecular utilizado (PCR E11 e PCR NL1/NL4), houve grande divergência nos resultados apurados.
- O meio CHROMagar® *Candida* foi um bom método para a identificação presuntiva das espécies de *Candida*. Possui limitações quando as cores encontradas nas colônias diferem do verde, do azul ou do rosa.
- O Kit Candifast® mostrou taxas maiores de resistência ao miconazol e ao fluconazol nas leveduras testadas, em relação à técnica da concentração inibitória mínima.
- Utilizando a técnica do CIM, 100% das espécies de *Candida* isoladas foram sensíveis à nistatina, o que mostra que essa droga pode ser utilizada como primeira escolha para o tratamento das candidoses orais em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço e em pacientes portadores de prótese.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, O.; SCULLY, C. Orofacial manifestations of the systemic mycoses. *J Oral Pathol Med*, v. 21, p. 289–294, 1992.

ALMEIDA, S.R. *Apostila de Micologia clínica*. Universidade de São Paulo: 2010. 55p  
Disponível em: [www.portalbrasil.net/downloads/micoses.pdf](http://www.portalbrasil.net/downloads/micoses.pdf)

ARAUJO, C.R.; MIRANDA, K.C.; PASSOS, X.S.; SOUZA, K.H.; LEMOS, J.A.; KHRAIS, C.R.C.; SILVA, M.R.R.S.; FERNANDES, O.F.L. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método Micro-organismo *Candida*. *Revista de Patologia Tropical*, v.34, n.1, p.37-42, jan-abr, 2005.

ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M.A.; FRADE, J.P.; BRANDT, M.E.; HAJJEH, R.A.; HARRISON, L.H.; SOFAIR, A.N.; WARNOCK, A.D. Comparison of visual and spectrofotometric 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.46, p.2477-2481, 2002.

AUBERTINE, C.L.; RIVERA, M.; ROHAN, S.M.; LARONE, D.H. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification versus the older fluorometric card and of microorganism *Candida* as a source medium with the new card. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, n.1, p.227-228, 2006.

AZEVEDO, F.M.A.; SEVERINO, S.; MAGALHÃES, V.D. Detection of clinically relevant yeast in blood: evaluation of methods for RNA extraction and amplification. *Einstein*, v.2, n.4, p.308-310, 2004.

BAILLIE G.S.; DOUGLAS. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother*, v.46, n.3, p.397-403, 2000.

BARADKAR, V.P., KUMAR, S. Species identification of *Candida* isolates obtained from oral lesions of HIV infected patients. *Indian J Dermatol.*, v.54, n.4, p.385-386, Oct/Dec, 2009.

BARROS LOPES, M.A.; SODEN, A.; HENSCHKE, P.A.; LANGRIDGE, P. PCR differentiation of commercial yeasts strains using intron Splice site primers. *Appl Environ Microbiol.*, v.62, n.12, p.4514-4520, dec. 1996.

BELAZI, M.; VELEGRAKI, A.; KOUSSIDOU-EREMONDE, T.; ANDREADIS, D.; HINI, S.; ARSENIS, G.; ELIOPOULOU C.; DESTONI, E.; ANTONIADES, D. Oral *Candida* isolates in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer: prevalence, azole susceptibility profiles and response to antifungal treatment. *Oral Microbiol Immunol*, v.19, p.347-351, 2004.

BONAN, P.R.F.; PIRES, F.R.; LOPES, M.A.; JR, O.D.H. Evaluation of salivary flow in patients during head and neck radiotherapy. *Pesqui Odontol Bras*, v.17, n.2, p.156-160, 2003.

BOSSCHE, H.V., MARICHAL, P. Azole antifungals: mode of action apud YAMAGUCHI, H., KOBAYASHI, G. S., TAKAHASHI, H. Recent progress in antifungal chemotherapy. New York: John Wiley & Sons, p.201, 1980.

BOSSCHE, H.V., MARICHAL, P. Azole antifungals: mode of action apud FIGUEIREDO, V.H.T. *Determinação in vitro de susceptibilidade a drogas antifúngicas de isolados clínicos de Candida spp., provenientes de onicomioses de quirodáctilos, utilizando duas metodologias de microdiluição*. 2006. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25472-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25472-1-0].PDF). Acesso em: 08 de maio de 2012.

BRASIL. EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Electropherogram quality analysis. Disponível em <HTTP://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Acesso em 10 de março de 2012.

BRESCANSIN, E.G. *Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais contendo o fármaco nistatina*. 2006. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BUCHAILLE, L.; FREYDIERE, A.M.; GUINET, R.; GILLE, Y. Evaluation of six commercial systems for identification of medically important yeasts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Wiesbaden, v.17, n.7, p.479-488, July 1998.

BUDTZ-JORGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*, v.48, p.61-69, 1990.

BUDTZ-JORGENSEN, E. Histopathology, immunology and serology of oral yeast infections: diagnosis of oral candidosis. *Acta Odontol Scand*, v.48, p.37-43, 1990.

BUDTZ-JORGENSEN, E, MOJON, E., RENTSCH, A., DESLAURIERS, N. Effects of an oral healthy program on the occurrence of oral candidosis in a long term care facility. *Community Dental Oral Epidemiology*, v.28, p.141-149, 2000.

CAMPOS, V.M. *Efeito dos óleos essenciais de Cymbopogon citratus e Melaleuca alternifolia sobre Candida albicans estudo in vitro e in vivo*. 2011. 98 F. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, São José dos Campos, 2011.

CARRILLO-MUNOZ, A.J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P.A.; QUINDOS, G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter*, v.19, n.2, p. 130-139, 2006.

CHAVASCO, J.K.; PAULA, C.R.; HIRATA, M.H.; ALEVA, N.A.; MELO, C.E.; GAMBALE, W.; RUIZ, L.S. & FRANCO, M.C. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop*, São Paulo, v.48, n.1, p.21-26, Jan./Feb.2006.

*CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI)*. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. Second edition, Wayne, PA, 2002.

*CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI)*. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3. Third edition, v.28, n.14, Wayne, PA, 2008.

COSTA-SILVA, R.B.; MELO-JUNIOR, M.R.; MORAES JUNIOR, M.A. Utilização do Intron Splice Site primer EI-1 na discriminação de leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v.30, n.3, p.761-765, jul./set. 2010.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. CIMicrobial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.64, n.4, p.847-867, 2000.

DENIS, P. Oral Manifestations of HIV Disease: An Update. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, v.116, n. 4, p.257-264, Dec. 1997.

EPSTEIN et al. Prophylaxis of candidiasis in patients with leukemia and bone marrow transplants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* . Vancouver, n.81, p.291-296, 1996.

EPSTEIN J.B.; FREILICH, M.M.; LE, N.D. Risk factors for oropharyngeal candidiasis in patients who receive radiation therapy for malignant conditions of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v.76, p.169-174, 1993.

EPSTEIN J.B.; GORSKY, M.; CALDWELL, J. Fluconazole mouthrinses for oral candidiasis in postirradiation, transplant, and other patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, Vancouver, v.93, p.671-675, 2002.

FIGUEIREDO, V.H.T. *Determinação in vitro de susceptibilidade a drogas antifúngicas de isolados clínicos de Candida spp., provenientes de onicomioses de quirodáctilos, utilizando duas metodologias de microdiluição*. 2006. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

GRIFFITHS A.J.F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C., GELBART, W. M. *An introduction to genetic analysis*. 7th edition. Freeman, 1999.

GUPTA , A.K., KOHLI, Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and evaluation of combination antifungal activity. *British Journal of Dermatology*, v.149, p.296-305, 2003.

HOSPENTHAL, D. R., BECKIUS, M. L., FLOYD, K. L., HORVATH, L. L. & MURRAY, C. K. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium microorganism *Candida*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, v.5, 2006.

HUNG, C.C.; YANG, Y.L.; LAUDERHALE, T.L.; MCDONALD, L.C.; HSIAO, C.F.; CHENG, H.H.; HO, Y.A.; LO, H.J. Colonization of human immunodeficiency virus-infected outpatients in Taiwan with *Candida* species. *J. Clin. Microbiolol.*, v.43, n.4, p.1600-1603, 2005.

ILKIT, M., HILMIOGLU, S., TASBAKAN, M. & AYDEMIR, S. Evaluation of Albicans ID2 and Biggy agar for the isolation and direct identification of vaginal yeast isolates. *J Med Microbiol* v.56, p. 762–765, 2007.

JEAN, J.B. *et al.* Reassussing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Rev. Oral. Surgery Oral. Medicine Oral Pathology*, v.95, n.1, p.51-9, Jan. 2003.

JHAM, B.C.; FRANÇA, E.C.; OLIVEIRA, R.R.; SANTOS, V.R.; KOWALSKI, M.D., FREIRE, A.R.S. *Candida* oral colonization and infection in Brazilian patients undergoing head and neck radiotherapy: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.103, n.3, p.355-358, Mar. 2007.

KOENIG H., WALLER J., KREMER M. Diagnostic et aspects épidémiologiques de 70000 levures isolées en 8 ans. *Rev. Fr. Lab.*, v.197, p-34-38, 1989.

KOGA-ITO, C.Y.; LYON, J.P.; RESENDE, M.A. Comparison between e-test and CLSI broth CIMrodilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* oral isolates. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, v.50, n.1, p.7-10, Jan./Fev., 2008.

KOKJONH, K., BRADLEY, M., GRIFFITHA, B., GHANNOUM, M. Evaluation of in vitro activity of ciclopirox olamina, butenafine HCL and econazole against dermatophytes and bacteria. *International Journal of Dermatology*, v.42, p.11-17, 2003.

KUMAR, C.P.G.; HANAFY, A.M.; KATSU, M.; MIKAMI, Y.; MENON, T. Molecular analysis and susceptibility profiling in South India. *Mycopathologia*, v.161, p.153-159, 2006.

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D.W.; BAGG, J.; COULTER, W.A.; READY, D.; LEWIS, M.A. *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.20, n.6, p.349-353, 2005.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The Yeasts: A taxonomic study*. 4rd ed. Amsterdam, Elsevier Science Publisher, 1998. 1035p.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. BOEKHOUT, T. *The Yeasts: A taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam, Elsevier Science Publisher, 2010. 1075p.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26 S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.73, n.4, p.331-371, 1998.

LEMONS, M. M. C.; MIRANDA, J. L.; SOUZA, M. S. G. S. Estudo clínico, Microbiológico e histopatológico da estomatite por dentadura. *Rev. bras. patol. oral*, n.2, v.1, p.3-10, jan. 2003.

LYMAN, C.A., WALSH, T.J. Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. *Drugs*, v.44, n.1, p.9-35, 1992.

LYMAN, C.A., WALSH, T.J. Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. *Drugs*, v.44, n.1, p.9-35, 1992 apud FIGUEIREDO, V.H.T. *Determinação in vitro de susceptibilidade a drogas antifúngicas de isolados clínicos de Candida spp., provenientes de onicomicoses de quirodáctilos, utilizando duas metodologias de microdiluição*. 2006. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

LYNCH, D.P. Oral candidiasis: history, classification and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v.78, p.189-193, 1994.

LYON, J.P. *Prevalência, fatores de virulência, susceptibilidade a drogas antifúngicas e variabilidade genética de leveduras do gênero Candida isoladas da cavidade oral de usuários de prótese total e indivíduos controle*. 2006. 94f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

MADHAVAN, P.; JAMAL, F.; CHONG, P.P.; NG, K.P. Identification of local clinical *Candida* isolates using microorganism *Candida*™ as a primary identification method for various *Candida* species. *Tropical Biomedicine*, v.28, n.2, p.269-274, 2011.

MÄHNß, B.; STEHR, F.; SCHÄFER, W.; NEUBER, K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*, v.48, v.55-61, 2005.

MAKAROVVA, N.U.; POKROVSKY, V.V.; KRAVCHENKO, L.V.; SEREBROVSKAYA, L.V.; JAMES, M.J.; MCNEIL, M.M.; LASKER, B.A.; WARNOCK, D.W.; REISS, E. Persistence of oropharyngeal *Candida albicans* strains with reduced susceptibilities to fluconazole among human immunodeficiency virus seropositive children and adults in a long-term care facility. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, n.5, p.1833-1837, 2003.

MARR, K. A., RUSTAD, T.R., REX, J.H. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. *Antimicrob Agents Chemother*, v.43, p.1383-1386, 1999.

MARTIN, M.V. Germ-tube formation by oral strains of *Candida tropicalis*. *J. Med. Microbiol.*, v.12, 1979.

MARTINDALE. *The complete drug reference*. 34 ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 2005, p.398-9.

MAUTONI, M.C. *Estudo clínico, laboratorial e terapêutico da candidose oral em pacientes com sistema imunológico deprimido pelo HIV/ Clinical, laboratorial and therapeutical study of oral candidosis in HIV compromised patients*. 1997. 41 p. Tese – São Paulo, 1997.

MENICHETTI, F.; DEL FAVERO, A.; MARTINO, P. Preventing fungal infection in neutropenic patients with acute leukemia: fluconazole compared with oral amphotericin B. *The Program. Ann Intern Med* , v.120, p.913-918,1994 apud STRAHILEVITZ, J.; SUGAR, A.M.; ENGELHARD, D. Fluconazole in transplant recipients: options and limitations. *Transpl Infect Dis*, v.2, p.62-71, 2000.

MESA, L.M.; ARCAYA, N.; CANAS,O.; MACHADO, Y.; CALVO, B. Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. *Rev Iberoam CIMol*, v.21, p.135-138, 2004.

MESQUITA, R.A. et al. Candidíase oral e a infecção HIV. *Rev Cons Reg Odontol Minas Gerais*, v.4, n.1, p.27-31, jan/jun. 1998.

MIROWSKI, G.W.; BETTENCOURT, J. D.; HOOD, ANTOINETTE F. Oral Infections in the Immunocompromised Host. *Seminars In Cutaneous Medicine and Surgery*, v.16, n.4, p.249-256, Dec. 1997.

NEVILLE, B.W. et al. *Patologia Oral e Maxilofacial*. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2009. 798p.

NEWTON, A.V. Denture sore mouth: a possible etiology. *Br. Dent. J.*, v.1, p.357-60, May, 1962. Apud: LEMOS, M.M.C.; MIRANDA, J.L.; SOUZA, M.S.G.S. Estudo clínico, Microbiológico e histopatológico da estomatite por dentadura. *Revista Brasileira de Patologia Oral*, v.2, n.1, p.3, jan./mar. 2003.

ODDS, F.C. Factors that predispose the host to candidosis. In: ODDS, F.C. *Candida and Candidosis*. 2 ed. London: Bailliere Tindall, 1988. p.93-114.

OLIVEIRA, C.E.; PORTO, V.C.; LARA, *Candida albicans* and denture stomatitis: evaluation of its presence in the lesion, prosthesis, and blood. *Int J Prosthodont*,v.23, p.158-159, 2010.

OLIVEIRA, M.S.M.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M.; GABAS, R.; MORETTI, M.L. Determinação da frequência de *Candida* spp na cavidade oral de pacientes graves internados no Hospital de Clínicas - Unicamp, através de testes fenotípicos. *Rev Panam Infectol*, v.8, n.4, p.16-20, 2006.

OLIVEIRA, R.C.; BRUM, S.C.; OLIVEIRA, R.S.; GOYATÁ, F.R. Aspectos clínicos relacionados à estomatite protética. *International journal of dentistry*, Recife, v.6, n.2, p. 51-54 abr./jun. 2007.

PASLIGH, J.; RADECKE, C.; FLEISCHHACKER, M.; RUHNKE, M. Comparison of Phenotypic Methods for the Identification of *Candida dubliniensis*. *J Microbiol Immunol Infect*, v.43, n.2, p.147-154, 2010.

PEREIRA-CENCI, T.; DEL BEL CURY, A.A.; CRIELAARD, W.; TEN CATE, J.M. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci*, v.16, n.2, p. 86-94, 2008.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; PROCOP, G.W.; RINALDI, M.G. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida spp*. *J. Clin. Microbiol.*, v.45, n.11, p.3522-3528, 2007.

PINTO, E.; RIBEIRO, I.C.; FERREIRA, N.J.; FORTES, C.E.; FONSECA, P.A.; FIGUEIRAL, M.A. Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in *Candida* species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. *J Oral Pathol Med*, v. 37, p. 587–592, 2008.

PUBMED: BLAST( BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL). disponível em : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B.M.; KRISHNAPPA, G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Curr Sci.*, v. 85, n.9, p.1299-1307, 2003.

REDDING, W.S. et al. Epidemiology of oropharyngeal *Candida* colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer. *J Clin Microbiol*, v.37, p.3896-3900, 1999.

REDDING, W.S.; BAILEY, C.W.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; KIRKPATRICK, W.R.; FOTHERGILL, A.W.; RINALD, M.G.; PATTERSON, T.F. *Candida dubliniensis* in radiation-induced oropharyngeal candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, San Antonio, v.91, p.659-662, 2001.

REGEZI, J.A., SCIUBA, J. J. *Patologia Bucal: correlações clinicopatológicas*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008, 390 p.

RESENDE, J.C.P. *Identificação, sorotipagem e susceptibilidade a agentes antifúngicos de amostras de Candida spp isoladas de pacientes hospitalizados na Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte*. 1997. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

RICHTER, S.S.; GALASK, R.P.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A. Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.5, p.2155-2162, May 2005.

ROSSIE, K.M.; TAYLOR, J.; BECK, F.M.; HODGSON, S.E.; BLOZIS, G.G. Influence of radiation therapy on oral *C. albicans* colonization: a quantitative assessment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 64, p. 698–701, 1987.

SAHAND, I.H.; MAZA, J.L.; ERASO, E. ; MONTEJO, M.; MORAGUES, M.D.; AGUIRRE, J.M.; QUINDO, G.; PONTO, J. Evaluation of CHROM-Pal medium for the isolation and direct identification of *Candida dubliniensis* in primary cultures from the oral cavity. *Journal of Medical Microbiology*, v.58, p.1437-1442, 2009.

SAN-MILLÁN, R.; RIBACOBÁ, L.; PONTÓN, J.; QUINDÓS, G. Evaluation of a commercial medium for identification of *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Wiesbaden. v.15, n.2, p.153-158, Feb.1996.

SHIBUYA, K.; MATHERS, C.D.; BOSCHI-PINTO, C., LOPES, A.D., MURRAY, C.J.L. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease. *BMC Cancer*, v.2, n.37, 2002.

SHOLAPURKAR, A.A.; PAI, K.M.; RAO, S. Comparison of efficacy of fluconazole mouthrinse and Clotrimazole mouthpaint in the treatment of oral candidiasis. *Australian Dental Journal*, v.54, p.341-346, 2009.

SLAVIN, M.A.; OSBORNE B.; ADAMS, R. et al. Efficacy and safety of fluconazole prophylaxis for fungal infection after marrow transplantation – a prospective, randomized, double-blind study. *J Infect Dis*, v.171, p.1545-1552, 1995.

SOYSA, S.N.; SAMARANAYAKE, L.P.; ELLEPOLA, A.N.B. Cytotoxic drugs, radiotherapy and oral candidiasis. *Oral Oncology*, v.40, p.971-978, 2004.

STRAHILEVITZ, J.; SUGAR, A.M.; ENGELHARD, D. Fluconazole in transplant recipients: options and limitations. *Transpl Infect Dis*, v.2, p.62-71, 2000.

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol*, v.36, p.329–334, 1998.

TORNATORE, M.A., NOSKIN, G.A., HACEK, D.M., OBIAS, A.A., PETERSON, L.R. Effects of incubation time and buffer concentration on in vitro activities of antifungal agents against *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol*, v.35, p.1473-1476, 1997.

VARGUES, L.B.; GARCIA, A.C.; TANAKA, L.V.; GARCIA, S.S.; CEPEDA, L.A.G.; VARGAS, L.O.S.; QUINDÓS, G.; RODRIGUEZ, C.H. Comparison of a randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and ATB ID 32C system for identification of clinical isolates of different *Candida* species. *Rev. Iberoam. Micol.*, Mexico City, v. 24, p.148-151, 2007.

VELEGRAKI, A.; PAPALAMBROU, P.; SOREMI, S.; LEGAKIS, N.J. Variable antifungal susceptibility of wild-type *C. albicans* phenotypes from neutropenic hosts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v.15, p.854–860, 1996.

VERWEIJ, P.E.; BREUKER, I.M.; RIJS, A.J.M.M.; MEIS, J.F.G.M. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J Clin Pathol, London*, v.52, n.4, p.271-273, Apr. 1999.

WALENS, J. Wikipedia, the free encyclopedia [online]. Aug.2010. Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Epsilometer\\_test](http://en.wikipedia.org/wiki/Epsilometer_test)>. Acesso em 26 out. 2010.

WILLIAMS, D.W.; KURIYAMA, T.; SILVA, S., MALIC, S.; LEWIS, M.A.O. Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology*, v.55, p.250-265, 2011.

WILSON, J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J*, v.185, n.8, p.380-384, Oct.1998.

WINGRARD J.R.; MERZ, W.G.; RINALDI, M.G., JOHNSON, T.R; KARP, J.E & SARAL, R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med*, v.325, p.1274-1277, 1991.

WINGRARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis*, v.20, p.115-125, 1995.

## **Anexo 1**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Faculdade de Odontologia  
Av. Antônio Carlos, 6627. Campus Pampulha

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Você está sendo convidado a participar da Pesquisa denominada:**

**“ESTUDO COMPARATIVO DE IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE CANDIDA NA CAVIDADE BUCAL E SUSCEPTIBILIDADE AO TRATAMENTO EM PACIENTES IRRADIADOS EM REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO E PORTADORES DE PRÓTESE REMOVÍVEL”.**

Neste termo pode haver palavras que você não compreenda. Se tiver alguma dúvida, por favor, pergunte ao pesquisador e ele lhe explicará as palavras.

Essa pesquisa tem como objetivo avaliar as manifestações clínicas da candidose bucal (doença provocada por fungos) e avaliar a prevalência dessa doença nos pacientes irradiados de cabeça e pescoço e nos pacientes que utilizam próteses odontológicas.

A sua participação constará em:

1. Responder perguntas a respeito da sua saúde
2. Responder perguntas relativas à candidose (doença provocada por fungos)
3. Participar de um estudo onde serão coletadas através de raspagens da mucosa, amostras contendo esses fungos para que os pesquisadores possam identificá-los e saber a melhor forma de tratamento dessa doença
4. Após a coleta você será orientado em relação a como proceder a higienização da cavidade bucal
5. Fotografias do interior da boca poderão ser tiradas, constituindo propriedade exclusiva dos pesquisadores, e o seu uso será destinado para fins de ensino (finalidade acadêmica), sendo preservado o direito do paciente de não-identificação (o rosto ou qualquer outra parte do seu corpo não aparecerão)
6. Quando os resultados de identificação dos fungos e testes de susceptibilidade aos antifúngicos estiverem prontos, os pacientes serão informados, orientados sobre a doença e o tratamento será instituído de acordo com os resultados obtidos no Kit Candifast<sup>®</sup>. Durante todo o tratamento da candidose o paciente será acompanhado pelos pesquisadores até a completa remissão dos sintomas.
7. Na ocorrência de reações indesejáveis como alergias ou mal-estar ocasionado pelos antifúngicos utilizados durante o tratamento, você deverá comunicar-se com os pesquisadores e suspender o uso até que a equipe decida se será utilizado ou não outro medicamento.
8. Será de responsabilidade da equipe de pesquisadores o tratamento de reações indesejáveis decorrentes do tratamento da sua candidose (doença provocada por fungos)

9. As consultas, os exames e os procedimentos relacionados ao estudo serão gratuitos e você não receberá pagamento algum.
10. A sua participação neste estudo é completamente voluntária e você tem o direito de não aceitar ou desistir do mesmo a qualquer momento, sem prejuízo ou perdas de benefício a que tenha direito. As informações obtidas e a coleta dos seus dados são confidenciais. É importante que você comunique a mudança de endereço e telefone.
11. Você poderá fazer perguntas a qualquer momento em relação à pesquisa a qual está participando. Caso tenha dúvidas, você poderá tirá-las com a pesquisadora Mara Cristina Lopes Amorim pelo tel. (31)8795 5443, com o Prof. Vagner Rodrigues Santos pelo tel. (31) 3409-2497 ou com o Prof. Evandro Neves Abdo pelo tel. (31) 91529291. Em caso de dúvidas em relação aos seus direitos como participante, você poderá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, através do número 3409-4592.

Declaro que tive tempo de ler as informações contidas neste documento antes de assiná-lo e declaro que fui informado sobre a pesquisa. Autorizo a realização do exame clínico segundo os padrões de biossegurança e a raspagem das mucosas (citologia) com finalidade de coletar os fungos da candidose.

Declaro que a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi satisfatoriamente explicada e que recebi resposta para as minhas dúvidas. Confirmando também que recebi uma cópia deste formulário de consentimento.

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade para participar deste estudo.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20

\_\_\_\_\_  
Nome do(a) participante (letra de forma) e RG

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) participante

Atesto que expliquei cuidadosamente a natureza e o objetivo deste estudo, os possíveis riscos e benefícios da participação no mesmo, junto ao participante e /ou representante legal. Acredito que forneci todas as informações necessárias, em linguagem adequada e compreensível

\_\_\_\_\_  
Mara Cristina Lopes Amorim (pesquisadora) Tel (31) 87955443 - (31)34092497

\_\_\_\_\_  
Vagner Rodrigues dos Santos (pesquisador) Tel (31) 97326697 - (31)34092497

\_\_\_\_\_  
Evandro Neves Abdo (pesquisador) Tel (31) 91529291 - (31)34092497

**Prof. Dr. Vagner  
Rodrigues Santos**  
**Faculdade de  
Odontologia UFMG**  
Av. Antônio Carlos,  
6627  
UFMG Campos  
Pampulha  
CEP: 31015-430

**Prof. Dr. Evandro  
Neves Abdo**  
**Faculdade de  
Odontologia UFMG**  
Av. Antônio Carlos,  
6627  
UFMG Campos  
Pampulha  
CEP: 31015-430

**Pesquisadora: Mara  
Cristina Lopes Amorim**  
**Faculdade de  
Odontologia UFMG**  
Av. Antônio Carlos,  
6627  
UFMG Campos  
Pampulha  
CEP: 31015-430

**Comitê de Ética em Pesquisa  
COEP- UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627  
UFMG Campos Pampulha  
CEP: 31270-901  
Belo Horizonte \_ MG  
[WWW.ufmg.br/bioetica/coep](http://WWW.ufmg.br/bioetica/coep)  
Tel: (31) 3409 4592



Está tomando algum medicamento?

( ) anticonvulsivante ( ) imunossupressor ( ) anti-hipertensivo

( ) antiinflamatório ( ) anticoncepcional ( ) antidepressivo

OBS: \_\_\_\_\_

—  
Internações: ( ) sim ( ) não Data:

Motivo

Hábitos: Quantas vezes escova os dentes por dia?

( ) nenhuma ( ) 1 vez ( ) 2 vezes ( ) 3 vezes ( ) 4 vezes ( ) + de 4 vezes

Você é: ( ) Fumante ( ) ex fumante ( ) não fumante

Se sim quantos cigarros/ dia: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo?

Se é ex fumante, há quanto tempo parou? ( ) 0 a 2 anos ( ) 3 a 5 anos ( ) 6 a 10 anos

( ) 11 a 20 anos ( ) mais de 20 anos

Já usou algum tipo de droga? ( ) Sim ( ) Não Qual ?:

Ingere bebidas alcoólicas? ( ) sim ( ) não Qual ?:

Qual a frequência?

### **Exame Objetivo Geral:**

Fácies: ( ) típica ( ) atípica

Edemas: ( ) sim ( ) não Assimetria: ( ) sim ( ) não

P.A.: Pulso: Respiração:

Linfonodos: ATM:

### **Exame objetivo intra-bucal:**

Lábios:

Língua:

Assoalho bucal:

Gengiva:

Palato:

Bochecha:

Orofaringe:

Mucosa Alveolar e sulcos vestibulares:

OBS: \_\_\_\_\_

**CANDIDOSE:** ( ) sim ( ) não

Localização da candidose: ( ) localizada ( ) generalizada ( ) ignorada

Local específico:

Sintomas:

Descrição clínica da candidose:

**Pacientes com Estomatite por Dentadura:**

- **Tipo de prótese** \_\_\_\_\_
- **Tempo de uso de prótese** \_\_\_\_\_
- **Uso contínuo ou não** \_\_\_\_\_

**Pacientes Irrradiados:**

- **Radiação recebida:** \_\_\_\_\_ **cGy**
- **Tempo de Irradiação, número de sessões** \_\_\_\_\_
- **Área de irradiação** \_\_\_\_\_

Fez uso de antifúngico:

Espécie de *Candida* encontrada: ( ) *c.albicans* ( ) *c.tropicallis* ( ) *c.parapsilosis*  
( ) *c.glabrata* ( ) *c.krusei* ( ) *c.dublinsiensis*  
( ) outra espécie

Área da coleta: \_\_\_\_\_

**Anexo 3****Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo COEP**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

**Projeto: CAAE – 0561.0.203.438-11**

**Interessado(a): Prof. Wagner Rodrigues Santos  
Depto. de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas  
Faculdade de Odontologia - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 10 de janeiro de 2012, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudo comparativo de identificação das espécies de cândida na cavidade bucal e susceptibilidade ao tratamento em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço e portadores de prótese"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maria Teresa Marques Amaral", is written over a horizontal line.

**Profª. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**

### Anexo 4

Identificação de espécies de *Candida* através dos kits Candifast®,  
meio CHROMagar® *Candida* e PCR-EI1 em pacientes portadores de prótese

Amostra	Candifast®	CHROMagar®			PCR-EI1
		Espécie	Cor	n° UFC	
P1 *	<i>C. albicans</i>				
P1A #		–	branca	13	<i>C. albicans</i>
P1B #		<i>C. albicans</i>	verde	112	<i>C. albicans</i>
P2 (comissura) *	<i>C. albicans</i>				
P2A #		<i>C. krusei</i>	rosa brilhante	± 500	<i>C. glabrata</i>
P2B #		<i>C. albicans</i>	verde	120	<i>C. albicans</i>
P2.1 (palato) *	<i>C. albicans</i>				
P2.1A #		–	rosa arroxeadada	1	<i>C. tropicalis</i>
P2.1B #		<i>C. tropicalis</i>	azul	14	<i>C. tropicalis</i>
P3 *	<i>C. albicans</i>				
P3A *	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	verde clara	7	<i>C. albicans</i>
P3B #		<i>C. albicans</i>	verde escura	16	<i>C. albicans</i>
P3C #		–	bege	5	<i>C. albicans</i>
P4 *	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	verde	5	<i>C. albicans</i>
P5 *	<i>C. albicans</i>				
P5A #		<i>C. albicans</i>	verde	5	<i>C. albicans</i>
P5B #		<i>C. krusei</i>	rosa	102	<i>C. glabrata</i>
P6 *	<i>C. albicans</i>				
P6A #		<i>C. tropicalis</i>	roxa	>100	<i>C. tropicalis</i>
P6B #		<i>C. albicans</i>	verde	± 10	<i>C. albicans</i>
P7 *	<i>C. albicans</i>				
P7A #		<i>C. albicans</i>	verde clara	2	<i>C. albicans</i>
P7B #		<i>C. tropicalis</i>	roxa	2	<i>C. tropicalis</i>
P7C #		<i>C. tropicalis</i>	roxa halo claro	8	<i>C. tropicalis</i>
P8 *	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	verde clara	14	<i>C. albicans</i>
P9 *	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	verde clara	9	<i>C. albicans</i>
P10 *	<i>C. albicans</i>				
P10A #		<i>C. albicans</i>	verde	>100	<i>C. albicans</i>
P10B #		–	bege	2	<i>C. parapsilosis</i>
P11 *	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	verde	>100	<i>C. albicans</i>
P12 *	<i>C. albicans</i>				
P12A #		<i>C. albicans</i>	verde rugosa	2	<i>C. albicans</i>
P12B #		<i>C. albicans</i>	verde escura	1	<i>C. albicans</i>
P12C #		<i>C. albicans</i>	verde opaca	3	<i>C. albicans</i>

(\*) Amostras identificadas pelo Candifast®

(#) Amostras identificadas pelo CHROMagar® e pelo PCR-EI1

## Anexo 5

Identificação de espécies de *Candida* através dos kits Candifast®,  
meio CHROMagar® *Candida* e PCR-EI1 em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço

Amostra	Candifast®	CHROMagar®			PCR-EI1
		Espécie	Cor	n° UFC	
I1*	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Verde	>100	<i>C. albicans</i>
I2*	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	roxa halo claro	>100	<i>C. tropicalis</i>
I3*	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	azul grandes centro roxo	>100	<i>C. tropicalis</i>
I3A#		<i>C. tropicalis</i>	Azul	>100	<i>C. tropicalis</i>
I3B#		<i>C. albicans</i>	verde escura	2	<i>C. albicans</i>
I4*	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Azul	>100	<i>C. tropicalis</i>
I5*	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	azul com halo claro	>100	<i>C. tropicalis</i>
I6*	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Azul	>100	<i>C. tropicalis</i>
I7(língua)*	<i>C. tropicalis</i>				
I7A#		<i>C. albicans</i>	Verde	5	<i>C. albicans</i>
I7B#		<i>C. tropicalis</i>	Azul	57	<i>C. tropicalis</i>
I7.1(palato)*	<i>C. tropicalis</i>				
I7.1A#		<i>C. tropicalis</i>	azul arroxeadado pequeno	10	<i>C. tropicalis</i>
I7.1B#		<i>C. tropicalis</i>	azul arroxeadado grande	>100	<i>C. tropicalis</i>
I8*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	Rosa	>100	<i>C. krusei</i>
I9*	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	verde claro	51	<i>C. albicans</i>
I9A#	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Verde	>100	<i>C. albicans</i>
I10*	<i>C. albicans</i>				
I10A#		<i>C. tropicalis</i>	Azul	108	<i>C. tropicalis</i>
I10B#		–	Branças	3	<i>C. tropicalis</i>
I10A.1#		<i>C. tropicalis</i>	azul rugoso	10	<i>C. tropicalis</i>
I10A.2#		<i>C. tropicalis</i>	azul lisa	>100	<i>C. tropicalis</i>
I11*	<i>C. parapsilosis</i>				
I11A#		–	bege pequena	57	<i>C. albicans</i>
I11B#		<i>C. albicans</i>	verde escuro	158	<i>C. albicans</i>
I12*	<i>C. albicans</i>				
I12A#		<i>C. albicans</i>	Verde	>100	<i>C. albicans</i>
I12B#		<i>C. tropicalis</i>	azul arroxeadado	57	<i>C. tropicalis</i>
I13*	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Verde	>100	<i>C. albicans</i>
I14					
I14A*#	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	Rosa	20	<i>C. krusei</i>
I14B*#	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. albicans</i>	Verde	4	<i>C. albicans</i>
I15*	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	azul esverdeado	>100	<i>C. tropicalis</i>

(\*) Amostras identificadas pelo Candifast®

(#) Amostras identificadas pelo CHROMagar® e pelo PCR-EI1

## Anexo 6

### Susceptibilidade antifúngica das amostras – Grupo 1

Amostra	Candifast®	CIM	Amostra	Candifast®	CIM
I1	miconazol –R	cetoconazol – trailing miconazol –R	I10	anfotericina B – R miconazol –R	
I2	anfotericina B – R econazol – R miconazol – R		I10A		
I3	miconazol –R	cetoconazol – R fluconazol - R miconazol –R	I10A.1		fluconazol – R itraconazol – R
I3A		cetoconazol – trailing fluconazol – trailing itraconazol – SDD	I10A.2		
I3B			I10B		itraconazol – trailing
I4	anfotericina B – R fluconazol - R miconazol –R nistatina – R	cetoconazol – R fluconazol - R	I11	anfotericina B – R miconazol –R	
I5	econazol – R fluconazol - R miconazol –R	cetoconazol – R itraconazol – R	I11A		miconazol –R
I6	anfotericina B – R econazol – R miconazol –R	cetoconazol – R fluconazol – trailing	I11B		cetoconazol – trailing fluconazol – SDD
I7(língua)	anfotericina B – R econazol – R fluconazol - R miconazol –R		I12	cetoconazol – R fluconazol – R fluocitosina - R miconazol –R	
I7A		cetoconazol – trailing fluconazol - trailing miconazol –R	I12A		cetoconazol – trailing fluconazol - R itraconazol – trailing
I7B		fluconazol – trailing	I12B		fluconazol – R itraconazol – R
I7.1 (palato)			I13	fluconazol - R miconazol –R	
I7.1A		cetoconazol – R	I14		
I7.1B		cetoconazol – R itraconazol - R miconazol –R	I14A	fluconazol - R miconazol –R	anfotericina B – R fluconazol – SDD
I8		anfotericina B – R fluconazol – SDD itraconazol – SDD	I14B	miconazol –R	fluconazol – trailing itraconazol – R
I9	anfotericina B – R miconazol –R	cetoconazol – R miconazol –R	I15	fluconazol - R miconazol –R	cetoconazol – R fluconazol - R itraconazol – R
I9A	miconazol –R	miconazol –R			

Célula vazia – sensível a anfotericina B, cetoconazol, econazol, flucitosina, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina

R – resistência

SDD – Susceptibilidade Dose Dependente

## Anexo 7

## Susceptibilidade antifúngica das amostras – Grupo 2

Amostra	Candifast®	CIM	Amostra	Candifast®	CIM
P1	fluconazol – R miconazol –R		P6	econazol – R fluconazol – R miconazol –R	
P1A			P6A		itraconazol – SDD
P1B		cetoconazol – trailing fluconazol - trailing itraconazol –trailing	P6B		
P2(comissura)	anfotericina B – R fluconazol - R miconazol –R		P7	fluconazol - R miconazol –R	
P2A			P7A		cetoconazol – R fluconazol - R itraconazol – R
P2B		cetoconazol – R fluconazol - R	P7B		cetoconazol – R fluconazol - R itraconazol – R
P2.1(palato)	fluconazol – R miconazol –R		P7C		
P2.1A		anfotericina B – SDD fluconazol - R itraconazol – R	P8	miconazol – R flucitosina – R	cetoconazol – trailing fluconazol – trailing miconazol – R
P2.1B			P9	miconazol –R	miconazol –R
P3	anfotericina B – R miconazol –R		P10	anfotericina B – R fluconazol – R	
P3A		cetoconazol – R fluconazol – R	P10A		fluconazol – R
P3B		fluconazol – SDD itraconazol – SDD	P10B		fluconazol – R
P3C			P11		
P4	fluconazol – R miconazol –R	cetoconazol – R fluconazol - R itraconazol - R	P12	fluconazol – R	
P5	fluconazol – R		P12A		cetoconazol – R fluconazol - R itraconazol – R miconazol -R
P5A		cetoconazol – trailing itraconazol –trailing	P12B		cetoconazol – R fluconazol - R itraconazol – R miconazol -R
P5B		itraconazol – SDD	P12C		cetoconazol – trailing fluconazol - trailing itraconazol – trailing miconazol –trailing

Célula vazia – sensível a anfotericina B, cetoconazol, econazol, flucitosina, fluconazol, itraconazol, miconazol e nistatina

R – resistência

SDD – Susceptibilidade Dose Dependente