

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RALCIANE DE PAULA MENEZES

Avaliação da frequência, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes portadores do HIV

Uberlândia

2014

RALCIANE DE PAULA MENEZES

Avaliação da frequência, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes portadores do HIV

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador:

Prof. Dra. Denise von Dollinger de Brito

Uberlândia

2014

Ficha Catalográfica

M543a Menezes, Ralciane de Paula, 1990-

Avaliação da frequência, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes portadores do HIV / Ralciane de Paula Menezes. - 2014.

106 f.: il

Orientador: Denise Von Dollinger de Brito.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de

Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Inclui bibliografia.

1. *Candida*. 2. HIV (Vírus). 3. Colonização bucal 4. Exoenzimas. 5. Sensibilidade a antifúngicos.

I. Brito, Denise von Dollinger de. II. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.
III. Título.

CDU: 616.31

FICHA DE APROVAÇÃO

RALCIANE DE PAULA MENEZES

Avaliação da frequência, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes portadores do HIV

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Aprovado em 28 de fevereiro de 2014

Profa. Dra. Denise von Dollinger de Brito – UFU

Profa. Dra. Karine Spirandelli Carvalho – UFU

Prof. Dr. Roberto Martinez – USP

Dedico essa vitória tão importante para mim aos
meus pais Julio e Sandra, pelo apoio incondicional,
dedicação, carinho, amor, incentivo e por nunca
medirem esforços para me ajudar .

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que mais este sonho se tornasse realidade, por sempre iluminar os meus caminhos e me dar forças para vencer os obstáculos que surgiram no decorrer dessa caminhada e por me fazer entender que todas as coisas, de uma forma ou de outra, cooperam para o bem daqueles que O amam;

Aos meus pais, Julio e Sandra, pelo amor, carinho, paciência, dedicação e por sempre estarem prontos a me ajudar;

À minha irmã, Tawane, por estar sempre presente na minha vida;

Ao Rodrigo, que apesar de ter aparecido na minha vida esta etapa já ter se iniciado, sempre me apoiou, ajudou e acreditou em mim incondicionalmente. Obrigada pela compreensão, companheirismo, paciência e pelo seu amor e carinho;

À minha orientadora, professora Denise, por sempre ser tão atenciosa e gentil, pela oportunidade do trabalho e pela contribuição para o meu crescimento científico e intelectual;

Ao meu co-orientador e amigo, professor Reginaldo, por me permitir conhecer e trabalhar com uma área tão apaixonante da microbiologia que é a micologia, pela colaboração, apoio, paciência, dedicação, coragem, incentivo, amizade e por sempre confiar na minha capacidade durante os anos em que trabalhamos juntos;

Aos professores e técnicos do Curso Técnico de Análises Clínicas da Escola Técnica de Saúde, por sempre torcerem por mim e por sempre acreditarem na minha capacidade;

Às alunas de Iniciação Científica, Érika, Bruna e Thaís, pela enorme ajuda na realização de todas as etapas deste trabalho, sem vocês eu não teria conseguido terminar tudo em tempo hábil, pela amizade que surgiu e se fortaleceu durante esses dois anos, pelo companheirismo, apoio e sempre me animarem e me colocarem para cima em meio às dificuldades;

Ao Dr. Aécio, professor e médico do setor de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, pela permissão e ajuda na realização deste trabalho e pelas dúvidas esclarecidas;

Ao professor Lúcio, da Faculdade de Matemática – UFU, pela enorme ajuda na análise estatística de todos os dados;

Aos pacientes HIV positivos do setor de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, por aceitarem participar da pesquisa, por sempre me receberem e tratarem com muito carinho e educação durante suas consultas de rotina. Sem a participação de vocês este trabalho não teria sido feito e nem faria sentido;

À Capes pelo apoio financeiro;

A todas as pessoas que de alguma forma estiveram presentes durante essa caminhada e que de alguma forma contribuíram para a concretização desse sonho, o meu muito obrigado.

**Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram,
nem jamais penetrou em coração humano
o que Deus tem preparado para
aqueles que O amam." *1 Coríntios 2:9***

**“Necessitamos sempre ambicionar
alguma coisa que, quando alcançada, não nos
torne sem ambição!”**

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A prevalência de *Candida* spp. como comensal da cavidade oral pode chegar a 70%. Entretanto, a colonização da cavidade oral nem sempre culmina na candidíase bucal, porém pode ser considerada uma condição preliminar para o desenvolvimento da mesma. A candidíase bucal é a infecção fúngica mais comum entre os indivíduos portadores do HIV, resultado do comprometimento imunológico dos mesmos. Considerando a importância desse tipo de infecção em HIV positivos, propusemos a realização do presente trabalho com os seguintes objetivos: determinar a frequência de indivíduos HIV positivos colonizados por *Candida* spp., bem como as espécies de *Candida* isoladas; determinar os principais fatores predisponentes para a colonização oral por *Candida* spp., relacionar a carga microbiana de colonização com a contagem de linfócitos T CD4+, carga viral e terapia antirretroviral utilizada no momento da coleta; determinar a sensibilidade dos isolados de *Candida* spp. aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B e nistatina, pela metodologia de difusão de disco e pesquisar as exoenzimas proteinases, fosfolipases, DNase e hemolisina nos isolados de *Candida* spp. No período de maio a outubro de 2012 foram coletadas amostras de saliva de portadores do HIV atendidos no HC-UFU e de indivíduos HIV negativos, as quais foram semeadas em placas contendo Ágar Sabouraud Dextrose e em placas com CHROMÁgar *Candida* e incubadas em estufa bacteriológica à 30°C por 72 horas. A identificação dos isolados foi feita pela metodologia clássica, utilização de ágar cromogênico e assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, sendo a diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* feita através de PCR. Os testes de sensibilidade e pesquisa de fatores de virulência foram feitos conforme descrito no documento da CLSI (2009) e na literatura. *Candida* spp. foram isoladas de 89 dos 147 pacientes estudados, totalizando 111 isolados, sendo *C. albicans* a espécie mais frequente entre os isolados (67,6%). A contagem média de colônias foi de $8,8 \times 10^3$ UFC/mL. Já no grupo controle 51 das 150 amostras de saliva foram positivas para gênero *Candida*, obtendo 57 isolados, dos quais 77,2% eram *C. albicans*. A média de UFC/mL foi de $9,8 \times 10^2$. Os fatores predisponentes para colonização bucal foram uso de antibióticos e prótese oral, bem como uma baixa contagem de CD4+ e alta carga viral. O uso combinado de antirretrovirais da classe dos inibidores de transcriptase reversa apresentou um maior efeito protetor para a colonização do que o uso desses medicamentos associados com inibidores de protease. Os antifúngicos nistatina, voriconazol e anfotericina B apresentaram o maior número de amostras de *Candida* spp. sensíveis em ambos os grupos, seguidos pelo fluconazol e itraconazol. A produção de fosfolipase foi observada em 69,3% e 72,6% dos isolados provenientes do grupo de pacientes e de HIV negativos, respectivamente. Proteinase foi produzida por 77,5% e 90,7% das espécies de *Candida* obtidas do grupo de pacientes e de HIV negativos, respectivamente.

A produção de hemolisina pelos isolados do grupo de HIV positivos e não portadores, respectivamente, foi igual a 98,2% e 96,5%. DNase foi produzida por 27% e 21% dos isolados proveniente dos pacientes e dos não HIV. Por fim, com exceção da DNase, não houve diferença estatisticamente significativa entre os isolados dos dois grupos de estudo em relação às características estudadas.

Palavras-chaves: *Candida*, HIV, colonização bucal, exoenzimas, sensibilidade a antifúngicos.

ABSTRACT

The prevalence of *Candida* spp. as commensal of the oral cavity can reach 70%. However, oral cavity colonization not always culminates in oral candidiasis, however it can be considered a preliminary condition for the development of it. Oral candidiasis is the most common fungal infection among individuals with HIV, due the result of immune deficiency. Considering the importance of this type of infection in HIV-positive, we proposed to carry out this work with the following objectives: determine the frequency of HIV positive individuals colonized by *Candida* spp., *Candida* species isolated; determine the main predisposing factors for oral colonization by *Candida* spp., to relate the microbial load of colonization with the count of lymphocytes TCD4+, viral load and antiretroviral therapy used at the time of collection; determine the sensitivity of isolates of *Candida* spp. antifungal fluconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B and nystatin, by the methodology of disk diffusion and search for the exoenzymes proteinases, phospholipases, hemolysin and DNase in isolates of *Candida* spp. From May to October 2012 saliva samples from HIV patients attended at Clinical Hospital - Federal University of Uberlândia and HIV negative individuals were collected, which were seeded onto plates containing Sabouraud Dextrose Agar and CHROMagar *Candida* plates and incubated in a bacteriological incubator at 30°C for 72 hours. The identification of the isolates was done by classical methodology, using chromogenic agar and assimilation of carbon sources and nitrogen, the differentiation between *C. dubliniensis* and *C. albicans* was made by PCR. *Candida* spp. were isolated from 89 of the 147 patients studied, a total of 111 isolates, *C. albicans* the most common species among the isolates (67.6%). The average colony count was 8.8×10^3 CFU/mL. In the control group 51 of the 150 saliva samples were positive for *Candida*, obtained 57 isolates, of which 77.2% were *C. albicans*. The average of CFU/mL was 9.8×10^2 . The predisposing factors for oral colonization were use of antibiotics and oral prosthesis and a low CD4 + cells count and high viral load. The combined use of antiretroviral class of reverse transcriptase inhibitors had a greater protective effect on the colonization than the use of these drugs associated with protease inhibitors. The nystatin antifungal, voriconazole and amphotericin B showed the highest number of samples of *Candida* spp. sensitive in both groups followed by fluconazole and itraconazole. The phospholipase production was observed in 69.3% and 72.6% of the isolates from the group of patients and HIV negative, respectively. The production of haemolysin by isolates of HIV positive and non-positive patients, respectively, was to 98.2% and 96.5%, DNase was produced by 27% and 21% of the isolates from patients and non-patients of HIV. Finally, with the exception of DNase, there was no statistically significant difference between isolates from the two study groups in the characters studied.

Keywords: *Candida*, HIV, oral colonization, exoenzymes, sensitivity to antifungal drugs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fluxograma do processo de isolamento e quantificação.....	37
Figura 2. Fluxograma do processo de realização do teste de sensibilidade aos antifúngicos pela técnica de disco-difusão em ágar.....	42
Figura 3. Fluxograma do processo de realização dos testes de pesquisa de atividade enzimática.....	44
Figura 4. Placa de ágar Müeller-Hinton mostrando o teste de sensibilidade aos antifúngicos pela metodologia de difusão do disco em ágar para as amostras de <i>Candida</i> spp.: 1) Anfotericina B; 2) Itraconazol; 3) Fluconazol; 4) Voriconazol; 5) Nistatina.....	59
Figura 5. Frequência das espécies de <i>Candida</i> , para atividade de fosfolipase, isoladas da cavidade bucal dos pacientes portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012.....	60
Figura 6. Frequência das espécies de <i>Candida</i> , para atividade de fosfolipase, isoladas da cavidade bucal dos indivíduos pertencentes ao grupo de HIV negativos.....	61
Figura 7. Placa de ágar fosfolipase mostrando o crescimento de colônias de <i>Candida</i> spp. positivas para atividade de fosfolipase, após 4 dias de incubação à 30°C.....	61
Figura 8. Frequência das espécies de <i>Candida</i> , para atividade de proteinase, isoladas da cavidade bucal dos pacientes portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012.....	62
Figura 9. Frequência das espécies de <i>Candida</i> , para atividade proteolítica, isoladas da cavidade bucal dos indivíduos pertencentes ao grupo de HIV negativos.....	63
Figura 10. Placa de ágar proteinase mostrando o crescimento de colônias de leveduras do gênero <i>Candida</i> spp. após sete dias de incubação à 30°C. O diâmetro da colônia e do halo proteolítico está representado por A e B, respectivamente.....	64

Figura 11. Frequência das espécies de <i>Candida</i> , para produção de hemolisina, isoladas da cavidade bucal dos pacientes portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012.....	65
Figura 12. Frequência das espécies de <i>Candida</i> , para atividade hemolítica, isoladas da cavidade bucal dos indivíduos pertencentes ao grupo de HIV negativos.....	66
Figura 13. Placa de ágar Saboraud Dextrose acrescido de 7% de sangue de carneiro evidenciando a atividade hemolítica por <i>Candida</i> spp. após 48 H de incubação à 30°C. A e B representam o diâmetro da colônia e o halo de hemólise, respectivamente.....	66
Figura 14. Frequência das espécies de <i>Candida</i> , para a atividade de DNase, isoladas da cavidade bucal dos pacientes portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012.....	67
Figura 15. Frequência das espécies de <i>Candida</i> , para atividade de DNase, isoladas da cavidade bucal dos indivíduos pertencentes ao grupo de HIV negativos.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critério de interpretação dos halos dos discos de antifúngicos.....	41
Tabela 2. Distribuição das espécies de <i>Candida</i> isoladas da cavidade bucal de portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012.....	47
Tabela 3. Frequência da associação de <i>Candida</i> em indivíduos portadores do HIV atendidos no HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012.....	48
Tabela 4. Fatores predisponentes envolvidos na colonização bucal por espécies de <i>Candida</i> spp. dos 147 pacientes portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, em 2012.....	49
Tabela 5. Frequência de indivíduos HIV positivos colonizados e não colonizados por <i>Candida</i> spp. de acordo com a contagem de linfócitos T CD4+ atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, em 2012.....	50
Tabela 6. Frequência de indivíduos HIV positivos colonizados e não colonizados por <i>Candida</i> spp. de acordo com a carga viral atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, em 2012.....	51
Tabela 7. Relação da contagem de linfócitos T CD4+ e concentração de leveduras (UFC/mL) na saliva dos pacientes HIV positivos atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012.....	51
Tabela 8. Relação da carga viral e concentração de leveduras (UFC/mL) na saliva dos pacientes HIV positivos atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012.....	52
Tabela 9. Distribuição das espécies de <i>Candida</i> isoladas da cavidade bucal no grupo de indivíduos HIV negativos do estudo.....	53

Tabela 10. Frequência da associação de <i>Candida</i> spp. no grupo de indivíduos HIV negativos do estudo.....	54
Tabela 11. Fatores envolvidos na colonização oral por espécies de <i>Candida</i> spp. dos 150 pertencentes ao grupo de indivíduos HIV negativos do estudo.....	55
Tabela 12. Comparação entre características observadas nos dois grupos estudados.....	56
Tabela 13. Perfil de sensibilidade de <i>Candida</i> spp. isoladas da cavidade bucal de portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas gerais, Brasil, no ano de 2012.....	57
Tabela 14. Perfil de sensibilidade de <i>Candida</i> spp. isoladas da cavidade bucal do grupo de indivíduos HIV negativos do estudo.....	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	HIV/AIDS.....	20
1.2	Espécies de <i>Candida</i> e microbiota.....	21
1.3	Gênero <i>Candida</i>.....	22
1.4	Fatores predisponentes para a colonização por <i>Candida</i> spp.....	23
1.5	Candidíase bucal.....	25
1.6	Terapia Antirretroviral.....	26
1.7	Quantificação e identificação de espécies de <i>Candida</i> spp.....	27
1.8	Antifúngicos e teste de sensibilidade.....	29
1.9	Fatores de patogenicidade: produção de exoenzimas.....	31
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	34
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	Tipo do estudo.....	35
3.2	Sujeitos da pesquisa.....	35
3.3	Coleta das amostras.....	35
3.4	Processamento das amostras e quantificação das colônias.....	36
3.5	Identificação dos isolados.....	37
3.5.1	<i>Formação de tubo germinativo.....</i>	38
3.5.2	<i>Microcultivo em ágar fubá.....</i>	38
3.5.3	<i>Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (Auxanograma).....</i>	38
3.5.4	<i>Diferenciação de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>.....</i>	39

3.6	Armazenamento das amostras.....	40
3.7	Determinação da sensibilidade às drogas antifúngicas.....	40
3.8	Pesquisa de exoenzimas.....	42
3.8.1	<i>Fosfolipase</i>.....	42
3.8.2	<i>Proteinase</i>.....	43
3.8.3	<i>Hemolisina</i>.....	43
3.8.4	<i>DNase</i>.....	44
3.9	Estatística.....	45
3.10	Comite de Ética.....	45
4	RESULTADOS.....	46
4.1	Características dos grupos de estudo.....	46
4.1.1	<i>Pacientes</i>.....	46
4.1.2	<i>Grupo indivíduos HIV negativos</i>.....	52
4.2	Comparação entre o grupo de pacientes e HIV negativos.....	56
4.3	Teste de sensibilidade.....	56
4.4	Atividade enzimática.....	59
4.4.1	<i>Fosfolipase</i>.....	59
4.4.2	<i>Proteinase</i>.....	62
4.4.3	<i>Hemolisina</i>.....	64
4.4.4	<i>DNase</i>.....	67
5	DISCUSSÃO.....	69
5.1	Sensibilidade aos antifúngicos.....	74
5.2	Atividade enzimática.....	77

6	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS.....	82
	ANEXO A - Carta de aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP/UFU.....	95
	ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	96
	APÊNDICE A - Ficha epidemiológica.....	98
	APÊNDICE B - Meios de cultura.....	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIV/AIDS

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae* e tem afinidade pelos receptores presentes na superfície de algumas células do sistema imune, tais como linfócitos T CD4+, macrófagos e células dendríticas. Esse vírus necessita invadir as células do sistema imune e dominar o material genético das mesmas para replicarem. Terminado o processo de replicação, os vírus recém-formados promovem a lise da célula infectada, sendo liberados na corrente sanguínea prontos para invadirem outras células de defesa e iniciarem o processo de replicação mais uma vez (MILLER, 1997).

Em virtude desse processo de replicação, observa-se no indivíduo infectado pelo HIV uma queda progressiva no número linfócitos T CD4+, favorecendo o desenvolvimento de infecções oportunistas, fúngicas ou bacterianas, como a candidíase, criptococose, histoplasmose e pneumocistose. A instalação dessas ou de outras doenças oportunistas caracteriza o início da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (LUQUE et al., 2008; BROOKS et al., 2010; ESEBELAHIE et a., 2013).

A transmissão do HIV se dá através de relação sexual desprotegida com parceiro portador do vírus, transfusão sanguínea, acidente de trabalho com sangue infectado, via congênita e uso de drogas injetáveis (BRASIL, 2013b).

No Brasil, desde 1980, quando se iniciou a epidemia da AIDS no mundo, até o fim de 2012, foram registrados 656.701 casos de AIDS, sendo a taxa de incidência em 2011 de 20,2 casos para cada 100.000 habitantes e a região sudeste a que possui a maior concentração de casos, 56% do total (BRASIL, 2013b).

Atualmente ainda há mais casos da doença entre os homens do que nas mulheres, entretanto essa proporção vem diminuindo nos últimos anos, já que em 1989 eram 6 casos de AIDS entre os indivíduos do sexo masculino para 1 caso no sexo feminino e em 2011 essa proporção chegou a 1,7 casos entre os homens para 1 caso entre as mulheres (BRASIL, 2012).

De acordo com o Ministério da Saúde a taxa de mortalidade entre os indivíduos portadores da AIDS sinaliza queda, visto que em 2002 era 6,3 por 100.000 habitantes, passando para 5,6 em 2011, o que significa uma queda de aproximadamente 12% no período de 9 anos (BRASIL, 2012). Essa redução deve-se, provavelmente, à introdução da Terapia Antirretroviral de Alta Potência (TAAP, também conhecida como HAART - Highly Active Antiretroviral Therapy) no tratamento da AIDS, de distribuição gratuita pelo Ministério da Saúde no Brasil.

Há diferenças entre o portador do HIV e o doente de AIDS, sendo que os indivíduos são considerados apenas portadores quando apenas possuem a infecção pelo vírus, sendo que, na maioria das vezes, têm uma vida completamente saudável, sem nenhuma doença. Já os doentes de AIDS são aqueles indivíduos que estão na fase da infecção pelo vírus onde se observa o desenvolvimento de várias infecções oportunistas em virtude do comprometimento imunológico do mesmo, dentre as quais as mais comuns são: candidíase, criptococose, tuberculose disseminada, neurotoxoplasmose, pneumonia e pneumocistose, além de condições como astenia prolongada e perda de peso progressiva (BRASIL, 2013c).

1.2 Espécies de *Candida* e microbiota

A colonização das mucosas, como a oral e vaginal, e das superfícies de outros sítios anatômicos, inicia-se logo após o nascimento, em virtude da exposição aos microrganismos presentes tanto no ambiente quanto em outros seres humanos. Porém, devido às propriedades físicas e biológicas particulares de cada sítio anatômico, observa-se o desenvolvimento de uma microbiota específica de cada região, que geralmente convive em harmonia com o indivíduo (COSTA, 2006).

A cavidade oral é uma das regiões do corpo com maior diversidade de microrganismos, sendo que já foram identificadas cerca de 500 espécies diferentes colonizando a superfície desse sítio (TAKAHASHI, 2005). Os fungos correspondem a uma pequena porcentagem dessa microbiota, sendo que as leveduras do gênero *Candida* são as mais comuns (LACAZ et al., 2002; LONDERO et al., 2004).

Na cavidade bucal, as leveduras são encontradas com maior frequência no dorso da língua, considerado o reservatório primário, sendo que estruturas como as papilas gustativas e fissura mediana favorecem o desenvolvimento do fungo. Essas leveduras podem colonizar também, de forma secundária, gengiva, dentina, mucosa oral e saliva (SOUZA, 2007). *Candida* spp. compõem a microbiota oral de cerca de 5 a 70% dos indivíduos saudáveis, sendo *C. albicans* a espécie mais comum. Entretanto, já foram isoladas mais de 27 espécies de *Candida* desse sítio anatômico (AKPAN; MORGAN, 2002; AKDENIZ et al., 2002; KADIR et al., 2005).

Quando há um desequilíbrio da microbiota local, ou o comprometimento imunológico ou ainda uma disfunção hormonal associada com a presença de fatores como: uso de prótese oral ou aparelho ortodôntico, xerostomia, ingestão excessiva de carboidratos, dieta hipovitamínica e uso de antibióticos ou contraceptivos orais, *Candida* spp. pode invadir os tecidos e passar da condição de comensal para patogênica e desencadear desde infecções superficiais até processos infecciosos profundos (FONSECA, 1980).

1.3 Gênero *Candida*

Taxonomicamente, o gênero *Candida* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae (DIEZMANN et al., 2004). São conhecidas mais de 150 espécies pertencentes a este gênero, das quais apenas um pequeno número desencadeia infecções no homem (KURTZMAN; ROBNETT, 1998).

As principais espécies de interesse clínico são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. No entanto, espécies emergentes têm sido descritas, como *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis* e *C. inconspicua* (LOPEZ et al., 2005; PFALLER, 1996; REX et al., 1994, WINGARD, 1995). Algumas características das principais espécies estão descritas a seguir.

C. albicans é uma espécie comensal encontrada na cavidade oral, no trato gastrointestinal, no trato respiratório superior, na vagina e na uretra de muitos seres humanos saudáveis (ALONSO-VALLE et al., 2003; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). É a espécie mais frequente em infecções fúngicas superficiais e invasivas. A maioria dos isolados é sensível a todos os antifúngicos de uso sistêmico, entretanto foram descritos casos de resistência adquirida a alguns azólicos, principalmente naqueles pacientes expostos a estes fármacos por um longo intervalo de tempo (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; SANGLLARD et al., 2002; PFALLER, 1996; WINGARD, 1995).

C. parapsilosis é comumente encontrada colonizando a pele, podendo desencadear infecções sistêmicas em pacientes com uso prolongado de cateter sistêmico e/ou sonda parenteral, devido à capacidade de reproduzir em soluções contendo glicose e produzir biofilme (CANTÓN et al., 2001; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; LEVY et al., 1998; VOSS et al., 1999).

C. tropicalis está presente tanto no ambiente quanto na microbiota humana, e o mecanismo de transmissão é predominantemente endógeno. Cerca de 50% dos pacientes colonizados por esta espécie desenvolvem infecções sistêmicas (BARCHIESI et al., 2000).

C. glabrata é uma levedura importante no ambiente hospitalar, sendo a terceira espécie do gênero mais frequente em hemoculturas e a espécie mais isolada, depois de *C. albicans*, da cavidade oral de indivíduos HIV positivos (DIEKEMA et al., 2002; FERNANDES et al., 2009; SANGUINETTI et al., 2005). Pesquisas mostram que, dos isolados clínicos de *C. glabrata*, cerca de 9% apresentam resistência ao fluconazol e 37 a 40% ao itraconazol, além de serem menos susceptíveis à ação da anfotericina B (DIEKEMA et al., 2002; PFALLER et al., 2002; SANGUINETTI et al., 2005).

Considerado um patógeno hospitalar ocasional, *C. krusei* é responsável por 2 a 3% dos casos de candidemia (WINGARD, 2002). Está associada a indivíduos que realizaram transplante de medula óssea, a neutropênicos e ao uso prévio de fluconazol (IWEN et al, 1995; PFALLER et al., 2008; WINGARD, 1995). Apresenta sensibilidade reduzida à anfotericina B, além de ser resistente intrinsecamente ao fluconazol, porém permanece susceptível *in vitro* ao voriconazol e às equinocandinas (DIEKEMA et al., 2002; HAKKI et al., 2006; OROZCO et al., 1998).

C. dubliniensis é fenotipicamente semelhante à *C. albicans*, porém pode desenvolver mais facilmente resistência aos azóis, todavia é menos virulenta (KIRKPATRICK et al., 1998; NOEL et al., 2003; PINJOL et al., 1998; SULLIVAN et al., 1997). Essa espécie foi relatada pela primeira vez no Brasil, no estado de São Paulo, em 1999 por Millan et al. (1999) em uma amostra proveniente de um indivíduo HIV positivo que apresentava candidíase oral. Está relacionada a infecções em pacientes portadores da AIDS, sendo isolada com frequência da mucosa oral e vaginal desses indivíduos, e por isso, acredita-se que ela pode fazer parte da microbiota desses sítios anatômicos (NOEL et al., 2003).

C. guilliermondii é uma espécie emergente que está associada com onicomicoses, podendo também causar osteomielite e candidemia (TIETZ et al., 1999). Na literatura há relatos de isolados com resistência *in vitro* à anfotericina B (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

1.4 Fatores predisponentes para a colonização por *Candida* spp.

Sabe-se que a prevalência de *Candida* spp. como comensal da cavidade oral de crianças e adultos saudáveis varia de 5 a 70% (AKDENIZ et al., 2002; KADIR et al., 2005). Essa extensa faixa de variação pode ser justificada pela técnica utilizada na coleta do material (swab, bochecho, saliva pura), pelo meio de cultura utilizado no isolamento desses microrganismos e a forma com que os resultados são analisados (FOTOS; HELLSTEIN, 1992).

A colonização da cavidade oral nem sempre culmina na candidíase bucal, porém pode ser considerada uma condição preliminar para o desenvolvimento da mesma, já que antes do surgimento dos sintomas da infecção há uma intensa colonização por *Candida* spp. (VARGAS; JOLY, 2002; COLLINS et al., 2011).

A instalação da candidíase bucal ocorre quando há um desequilíbrio da microbiota local associado com a presença de alguns fatores, dentre eles: imunocomprometimento, uso de antibióticos de amplo espectro, dieta, uso de prótese oral e aparelho ortodôntico, idade, xerostomia, presença de tumores malignos e disfunção hormonal (ODDS, 1994).

A administração prolongada de antibióticos, principalmente os de amplo espectro, pode ocasionar um desequilíbrio na microbiota oral ao eliminar grande parte das bactérias comensais, permitindo, assim, uma proliferação de outros microrganismos ali presentes, como as leveduras do gênero *Candida*, já que a competição por nutrientes e sítios de colonização reduz de forma significativa e, conseqüentemente, os núcleos disponíveis aumentam (CISTERNA et al., 2010).

A dieta do indivíduo também pode influenciar na colonização da cavidade oral por *Candida* spp., principalmente aquelas que são ricas em carboidratos, já que os açúcares, como a sacarose, facilitam a adesão das leveduras à mucosa oral (JIN et al., 2004). Esse fato pode ser explicado pela hipótese de que as bactérias comensais da cavidade bucal metabolizam o carboidrato ingerido pelo indivíduo, tornando o pH bucal mais ácido em virtude dos metabólitos resultantes dessa degradação, o que, conseqüentemente, favorece o crescimento das espécies de *Candida* (JIN et al., 2004).

O uso de prótese oral, bem como o de aparelhos ortodônticos, são fatores importantes para a colonização devido aos traumas que podem ocasionar na mucosa, quando não adaptadas de forma correta, e também devido à má higienização local. Esses traumas podem levar a formação de lesões, que além de servir como porta de entrada do microrganismo nos tecidos, também permite a formação de um meio ácido e microaerófilo que é favorável à proliferação dos fungos, além de provocar uma alteração no ambiente bucal podendo levar a formação de novos sítios de retenção de biofilme (URIZAR, 2002; FALCÃO et al., 2004).

A idade também pode ser considerada um fator predisponente para a colonização bucal por espécies de *Candida*, principalmente no caso de recém nascidos, que podem se tornarem colonizados em virtude da imaturidade do sistema imunológico e da presença de uma microbiota bacteriana pouco complexa (ODDS, 1994; SCHERMA et al., 2004).

Um estudo com intuito de avaliar o aleitamento materno como fator protetor para a colonização bucal por *Candida* spp. em crianças com menos de 6 meses foi realizado por Zöllner e Jorge (2003). Verificou-se que no grupo de crianças que recebiam leite materno (não usavam mamadeiras), *Candida* spp. foi isolada de 34,55% dos indivíduos ao passo que no grupo que recebia outro tipo de leite essa porcentagem foi de 66,67%. Isso mostra que o aleitamento materno pode conferir uma proteção à colonização por *Candida* spp. ao lactente, visto que esse leite contém imunoglobulinas e leucócitos que inibem a adesão e, assim, o desenvolvimento dessas leveduras (SCHERMA et al., 2004; KADIR et al., 2005).

1.5 Candidíase bucal

De modo geral, a candidíase desenvolve quando ocorre a interação de fatores relacionados tanto ao hospedeiro quanto ao fungo. Desse modo, o fungo tem que possuir a habilidade de driblar o sistema imunológico do hospedeiro. Para isso, eles devem ser capazes de crescer à temperatura de 37°C, aderir e colonizar superfícies e órgãos e produzir enzimas (proteases, fosfolipases, hemolisina) que auxiliam na invasão dos tecidos (HENRIQUES et al., 2006; MOHAN-DAS; BALLAL, 2008; RAPPLEYE; GLODMAN, 2006; VARTIVARIAN, 1992). A maioria das infecções por *Candida* spp. envolve a formação de uma matriz de pequenas colônias de leveduras e pseudo-hifas dispostas em uma estrutura bilateral, denominada biofilme, promovendo maior resistência aos antifúngicos. As hifas e pseudohifas são estruturas invasivas expressas nos estágios iniciais da infecção (AQUINO et al., 2005; NUCCI; COLOMBO, 2002; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

As infecções por *Candida* spp. são geralmente endógenas, pois podem resultar de proliferação ou alterações da microbiota humana, determinada por fatores de risco tais como imunossupressão, administração prolongada de antimicrobianos de amplo espectro, cirurgia, prematuridade, queimaduras e outros tratamentos prolongados e intensivos, como a quimioterapia, que comprometem o estado imunológico dos indivíduos. Essas condições permitem que esses microrganismos se comportem como oportunistas, sendo capazes de desencadear quadros infecciosos de alta letalidade (BLUMBERG et al., 2001; KOJIC; DAROUICHE, 2004; PAUW; PICAZO, 2008; PEMÁN et al., 2002).

A candidíase bucal é considerada a infecção fúngica oportunista mais comum entre os portadores do HIV, sendo que há uma intensa colonização antes da instalação da mesma (LINARES, 2002). Aproximadamente 90% dos indivíduos HIV positivos desenvolvem esse tipo de infecção ao menos uma vez durante o curso da AIDS (KORTING et al., 1999). Essa incidência tão elevada pode ser explicada pelo fato de que a infecção pelo HIV está diretamente relacionada com a alta frequência de indivíduos colonizados por espécies de *Candida*, antes mesmo de ser observado um estado de imunossupressão importante. Quanto mais comprometido estiver o sistema imunológico, mais frequente será o isolamento de *Candida* spp. da cavidade bucal dos portadores do HIV, sendo que a passagem do indivíduo do estado de colonizado para à condição de infecção se dá na presença da imunossupressão (POWDERLY et al., 1993).

Os portadores do HIV com baixa contagem de linfócitos CD4+ (<200cel/mm³) tem um risco mais elevado de serem colonizados e, conseqüentemente, de desenvolver candidíase oral do que aqueles pacientes com contagem de células CD4+ superior a 350cel/mm³ (VARGAS; JOLY, 2002).

A recorrência desse tipo de infecção, assim como o isolamento de espécies de *Candida* colonizando a cavidade oral dos HIV positivos, pode aumentar à medida que a infecção pelo HIV progride, o que, provavelmente, resulta do maior comprometimento imunológico e do uso prolongado de antifúngicos, que leva a seleção de cepas resistentes (BARCHIESI et al., 1995; REX et al., 1995).

1.6 Terapia Antirretroviral

Os antirretrovirais surgiram na década de 1980, logo após a descoberta do HIV, com intuito de impedir a multiplicação do vírus no indivíduo. Desse modo, esses medicamentos não destroem o vírus, mas ajudam a evitar o comprometimento do sistema imune aumentando a sobrevivência dos portadores do mesmo (BRASIL, 2013a).

Desde 1996, o Brasil realiza a distribuição gratuita desse tipo de medicamento pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Atualmente estão disponíveis seis classes de antirretrovirais no Brasil: inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa, inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa, inibidores de protease, inibidores da integrase, inibidores de fusão e co-receptores (Brasil, 2013a).

Os inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa atuam na enzima transcriptase reversa, incorporando-se à cadeia de DNA que o vírus cria, tornando-a defeituosa e dessa forma impedindo a multiplicação do vírus. Já os inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa bloqueiam diretamente a ação da enzima em questão e conseqüentemente a multiplicação do vírus. Os inibidores de protease atuam sobre a enzima protease do HIV bloqueando sua ação, o que resulta na formação de partículas virais não infectantes. Os inibidores de integrase bloqueiam a atividade da enzima integrase, a qual é responsável pela inserção do material genético do vírus no DNA da célula CD4+, desse modo, impede a replicação do vírus e sua capacidade de infectar novas células. Os inibidores de fusão impedem a reprodução do vírus ao impedir a entrada desses nas células de defesa. Por fim, os co-receptores se ligam de modo reversível e seletivo no mesmo receptor presente na membrana da célula T CD4+ que o HIV se liga, desse modo ao impedir a ligação do vírus na célula, evita a fusão da membrana de ambos e conseqüentemente a replicação do vírus (BRASIL, 2013a). Assim, ao impedir a multiplicação do HIV por qualquer um dos mecanismos citados anteriormente, observa-se uma redução da carga viral e aumento dos linfócitos T CD4+, levando ao restabelecimento do sistema imunológico (DEEKS et al., 1997).

Os medicamentos das diferentes classes de antirretrovirais não são prescritos isoladamente, mas sim associados uns com os outros, sendo comum a associação de dois inibidores da

transcriptase reversa ou nucleosídeos análogos com um inibidor de protease ou a combinação de 3 inibidores da transcriptase reversa. Essa associação permite uma redução significativa na carga viral e uma elevação dos linfócitos CD4+, resultando na redução da ocorrência de infecções oportunistas, diminuição do número de internações dos pacientes e aumentando a sobrevivência dos mesmos, além de reduzir em até 60% a taxa de mortalidade desses pacientes (TORRES; BARR, 1997; PALLELA et al., 1998).

Com a introdução dos antirretrovirais no tratamento do HIV, principalmente dos inibidores de protease, a ocorrência de candidíase oral entre os indivíduos HIV positivos reduziu de forma significativa (KORTING et al., 1999; DIZ DIOS et al., 2001). Isso, porque além de normalizar o sistema imune, como já foi dito anteriormente, os inibidores de protease também atuam sobre a proteinase produzida por *Candida* spp., pois essa enzima é da mesma classe da proteinase do HIV (KORTING et al., 1999; VARGAS; JOLY, 2002). Testes *in vitro* com o objetivo de avaliar a ação de diferentes drogas da classe de inibidores de protease sob a ação da enzima proteinase produzida por *Candida* spp., mostraram uma redução de 30 a 85% na atividade da enzima em questão, sendo que nos experimentos foram utilizadas concentrações das drogas correspondentes aos níveis séricos dos pacientes que faziam uso dessa classe de antirretroviral (CASSONE et al., 1999; GRUBER et al., 1999; KORTING et al., 1999).

1.7 Quantificação e identificação de espécies de *Candida* spp.

Um marcador importante para o estado de portador ou de infecção é a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de leveduras na cavidade bucal. Os indivíduos que são apenas portadores de *Candida* spp. apresentam uma contagem de colônias inferior a 10^3 UFC/mL, ao passo que os indivíduos que tem a infecção apresentam uma contagem de colônias superior a 4×10^3 UFC/mL (FARAH et al., 2000).

A identificação correta do agente etiológico da candidíase é de grande valia na escolha do antifúngico mais eficaz e no tempo de administração do mesmo no tratamento da infecção fúngica. Isso, porque nos últimos anos, apesar de ainda existir uma prevalência de *C. albicans* em infecções fúngicas, as espécies não-*albicans* tem sido isoladas com uma frequência maior nos casos de candidíase, as quais possuem características e comportamento diferentes frente aos tratamentos existentes (ALVES et al., 2010).

As espécies de *Candida* podem ser identificadas através de testes fenotípicos, análise da morfologia e provas bioquímicas, e testes genotípicos (LACAZ et al., 2002). Os testes fenotípicos clássicos incluem a assimilação de carboidratos e nitrogênio e fermentação de carboidratos, e a

observação da macro (colônias) e micromorfologia (prova do tubo germinativo e microcultivo) dos isolados (LACAZ et al., 2002).

Em relação aos métodos de tipagem moleculares que têm sido utilizados, destacam-se os que avaliam DNA *fingerprinting*, a eletroforese de enzima multilocus (MLEE), cariotipagem eletroforética (EK), DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) com e sem hibridação, e a análise com enzima de restrição (REA) (BACELO et al., 2010).

Em virtude do aumento no número de infecções desencadeadas por *Candida* spp. nos últimos anos e da gravidade dessas, vários meios diferenciais e mecanismos automatizados foram desenvolvidos com intuito de permitir uma identificação mais rápida desses isolados fúngicos. Os meios diferenciais possuem substâncias indicadoras que permitem a identificação presuntiva dos isolados, sendo os mais comuns, os meios cromogênicos, como o CHROMagar[®] *Candida* (Paris, França), cujo princípio se baseia na formação de colônias de diferentes cores, resultado da degradação do substrato cromogênico por uma enzima específica (FREYDIÈRE; GUINET, 1997). Esse meio de cultura permite a identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (HOPPE; FREY, 1999; OODS; DAVIDSON, 2000). Já os métodos automatizados, como o Auxacolor 2[®] (Bio-Rad, França), baseiam-se na assimilação e fermentação bioquímica e a leitura pode ser feita por um aparelho específico, o que permite uma leitura com menores chances de erro e a realização de um maior número de leituras em um pequeno intervalo de tempo (FREYDIÈRE; GUINET, 1997).

Os testes moleculares são importantes para diferenciação do complexo *C. parapsilosis*, e *C. albicans* de *C. dubliniensis* que, fenotipicamente, são muito semelhantes. Essas semelhanças morfológicas e bioquímicas fizeram com que muitos isolados identificados inicialmente como *C. albicans*, após serem submetidos a testes moleculares e fenotípicos específicos, fossem reclassificados (SULLIVAN; COLEMAN, 1998; JABRA-RIZK et al., 2000).

A diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* é importante visto que *C. dubliniensis* desenvolve de forma mais rápida resistência ao fluconazol, muito utilizado no tratamento das candidíases, e é um importante agente etiológico da candidíase bucal em portadores do HIV, sendo a reincidência da infecção muito comum quando desencadeada por *C. dubliniensis* (SCHORLING et al., 2000). Em virtude da relevância dessa espécie de *Candida* muitos pesquisadores visam o desenvolvimento e a padronização de testes para diferenciação das duas espécies em questão, os quais sejam de fácil execução e de baixo custo (OODS; DAVIDSON, 2000; AL MOSAID et al., 2003).

1.8 Antifúngicos e teste de sensibilidade

As drogas com ação antifúngica utilizadas no tratamento de infecções podem ser classificadas de acordo com o modo como atuam sobre as células fúngicas (REX et al., 1994; REX et al., 2011). Os antifúngicos mais utilizados pertencem à classe dos polienos, como a anfotericina B, dos nucleosídeos análogos, como a 5-fluorocitosina, e dos azóis, como o fluconazol e itraconazol, e no início da década de 1990 surgiram as equinocandinas e outros azóis de terceira geração (ANDRIOLE, 1999).

A anfotericina B e a nistatina atuam na membrana celular do microrganismo, combinam-se com os esteróis da membrana e interferem na sua permeabilidade. Isto resulta em instabilidade osmótica, perda de componentes citoplasmáticos vitais e conseqüente morte do microrganismo (ACUÑA, 2008).

Os azóis constituem o maior grupo de antifúngicos disponíveis comercialmente. Possuem largo espectro de ação antifúngica, inibindo a biossíntese do ergosterol, através da inibição da enzima 14- α -demetilase do citocromo P-450, o qual é responsável pela demetilação do lanosterol (ANDRIOLE, 1999). Fluconazol, itraconazol e voriconazol são alguns exemplos dessa classe de antifúngicos.

As equinocandinas são uma classe especial de antifúngicos que atuam inibindo a síntese de β -(1,3)-D-glucano, um componente da parede celular de várias espécies fúngicas patogênicas, provocando alterações estruturais (instabilidade osmótica) que resultam na lise das células (REX et al., 1994). A caspofungina é o representante mais conhecido das equinocandinas. A 1,3- β -D-glucana não é encontrada nas células dos mamíferos, por isso apresenta baixa toxicidade sobre as células humanas (LUMBRERAS et al., 2003).

A resistência ao tratamento depende da interação entre o sistema imune do hospedeiro, agente antifúngico e microrganismo, sendo que os fatores relacionados com o hospedeiro são considerados os mais importantes para o surgimento de resistência (MARR et al., 2000; NUCCI et al., 2002; SILVA et al., 2002).

Fluconazol e itraconazol são os azóis mais utilizados no tratamento e profilaxia (no caso dos pacientes com risco elevado de desenvolver infecções nosocomiais, como os neoplásicos) de micoses invasivas (BURGESS et al., 2000).

A escolha de uma terapia antifúngica apropriada leva em consideração critérios como o estado imunológico do hospedeiro, o sítio da infecção, a espécie fúngica envolvida e a sensibilidade às diferentes drogas (LOEFFLER; STEVENS, 2003). Relatos de resistência aos agentes antifúngicos foram raros até os finais da década de 1980, no entanto devido à ampla utilização de derivados

azólicos, como o fluconazol, tem-se observado o aparecimento de resistência a essa classe de drogas. Além disso, o aumento do número de infecções causadas por espécies não-*albicans*, que apresentam sensibilidade variável aos antifúngicos, como é o caso de *C. krusei*, que é intrinsecamente resistente ao fluconazol, tem contribuído para a maior atenção com que o assunto tem sido tratado (GUINEA et al., 2006; ALEXANDER et al., 2007; MOTTA et al., 2010).

Nos últimos anos tem sido relatado, em menor ou maior intensidade, o isolamento de espécies de leveduras com baixa sensibilidade ou resistência *in vitro* e *in vivo* a alguns antifúngicos. A resistência *in vivo* pode resultar de uma concentração reduzida do antifúngico devido à sua interação com outros fármacos ou ao enfraquecimento ou mesmo supressão da ação do sistema imune do indivíduo. A resistência *in vitro* pode ser secundária, onde espécies susceptíveis adquirem resistência, em virtude de uma seleção ocasionada pelo contato prévio com o agente antifúngico (NUCCI et al., 2002; SILVA et al., 2002).

Os principais mecanismos descritos para explicar a resistência desenvolvida pelas leveduras do gênero *Candida* são: alteração na parede celular e membrana, que dificulta a penetração do antifúngico; bomba de efluxo, que promove a remoção do antifúngico da célula; mutação dos alvos dos antifúngicos, diminuindo sua afinidade para a ligação; ativação de vias alternativas que aumentam o metabolismo dos antifúngicos; captura dos antifúngicos em organelas semelhantes a vacúolos e alteração cromossômica (EGGIMANN et al., 2003).

O surgimento de isolados resistentes, a disponibilidade de novas drogas e as falhas na quimioterapia das infecções fúngicas invasivas estimularam o desenvolvimento de métodos para a investigação da sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos (ARIKAN, 2007; SANGLARD e ODDS, 2002). No entanto, por ser um procedimento relativamente novo, a padronização da metodologia e os critérios de interpretação dos resultados dos testes *in vitro* ainda requerem análise cuidadosa por parte de pesquisadores e clínicos. O National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), atual Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), propôs a primeira norma de padronização para a execução do antifungigrama em 1992, sendo que a uniformização da metodologia ocorreu somente em 2002, quando foram criados os documentos M27-A2 e M38-A2, descrevendo as metodologias de referência para execução dos testes de sensibilidade de fungos leveduriformes e filamentosos, respectivamente (NCCLS, 1997; CLSI, 2009).

Nesses documentos foram definidos parâmetros laboratoriais, como: tamanho do inóculo, formulação do meio, tempo e temperatura de incubação e critérios de determinação dos pontos de corte, que quando não seguidos, podem interferir de forma significativa nos resultados dos testes de sensibilidade. Além disso, os fatores ligados ao hospedeiro podem ter mais impacto sobre o

comportamento da infecção do que o resultado da avaliação da sensibilidade (ARIKAN, 2007; ESPINEL-INGROFF, 1998; ESPINEL-INGROFF et al., 2005).

Os métodos de referência mais atuais propostos pelo CLSI são microdiluição e difusão do disco (CLSI, 2009). O método de microdiluição é vantajoso, quando comparado ao método anterior que era denominado macrodiluição e utilizava tubos e grandes quantidades de meio de cultura. O método de microdiluição utiliza microplacas e pequena quantidade de antifúngicos e meios de cultura, sendo o ponto de corte de leitura definido visual ou com auxílio de espectrofotômetro. Porém é requerido um tempo de incubação final de 48 horas, o qual é considerado elevado, principalmente para pacientes graves que necessitam de tratamento imediato.

O método de disco difusão, por sua vez, apresenta como vantagens a fácil realização e a similaridade com o antibiograma de rotina (realizado para bactérias), inclusive utilizando-se como meio de cultura básico o ágar Müeller-Hinton. Os critérios de interpretação e padronização foram definidos inicialmente somente para o fluconazol e em 2005 foram propostos pontos de corte para o voriconazol (PFALLER et al., 2005; CLSI, 2009).

Entretanto, em ambas as metodologias, algumas espécies de *Candida*, quando testadas frente aos derivados azólicos, podem apresentar um crescimento residual em todas as concentrações da droga utilizada, fenômeno este denominado “trailing” (“trailing growth”) (ARTHINGTON-SKAGGS et al., 2000), o qual pode comprometer seriamente a leitura do antifungigrama e, conseqüentemente resultar em uma interpretação errônea dos resultados (GIRMENIA et al., 2000). Alguns pesquisadores atribuíram esse efeito “trailing” à ação fungistática dos azólicos, parecido com o fenômeno de crescimento residual já conhecido em bactérias testadas frente às sulfonamidas (REVANKAR et al., 1998). Com intuito de reduzir esse efeito, algumas alterações na metodologia do CLSI foram propostas, dentre as quais se incluem: a variação do pH, tempo de incubação, tamponamento do meio, adição de glicose ao meio e tempo de leitura associado com um critério de ponto de corte (MARR et al., 1999).

1.9 Fatores de patogenicidade: produção de exoenzimas

A capacidade que um microrganismo tem de desencadear um processo infeccioso é denominada de patogenicidade e a instalação ou não desse processo depende da interação parasito-hospedeiro. Desse modo, a virulência de um microrganismo não está relacionada apenas com ele, mas também com o hospedeiro e com a relação que pode ser estabelecida entre eles (CASADEVALL; PIROFSKI, 2001).

Devido à importância clínica da candidíase, estudos têm sido desenvolvidos com intuito de compreender os mecanismos de patogenicidade, identificando os fatores de patogenicidade das espécies de *Candida* (NAGLIK et al., 2003). É de grande valia caracterizar a virulência dos isolados fúngicos, como leveduras do gênero *Candida*, pois assim não só é possível entender as diferenças na forma com que a doença se apresenta na clínica e na gravidade do processo infeccioso, como também estabelecer critérios para a escolha da terapia antifúngica mais apropriada para cada caso (BRANCO et al., 2012).

Dentre as propriedades das espécies de *Candida*, chamadas de fatores de virulência, estão: adesão à superfície dos tecidos, formação de tubo germinativo, variabilidade fenotípica, variabilidade genotípica, produção de toxinas e enzimas extracelulares hidrolíticas, que constituem fatores importantes no desencadeamento e manutenção da infecção. As principais enzimas hidrolíticas produzidas são as proteinases e as fosfolipases. A atividade hemolítica também é citada por alguns autores como importante para a virulência, assim como a propriedade de multiplicação em temperaturas mais altas, como 39°C e 42°C (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A produção de fatores de virulência pelo microrganismo facilita a invasão dos tecidos do hospedeiro e a evasão de seus mecanismos de defesa. Há indícios de que as enzimas hidrolíticas atacam células e moléculas do sistema imune como forma de resistir à ação antimicrobiana (SCHALLER et al., 2005).

As enzimas hidrolíticas extracelulares, como proteinase e fosfolipase, são consideradas importantes fatores de virulência das espécies de *Candida* (NAGLIK et al., 2003). Entretanto, essas enzimas que fazem parte do metabolismo do fungo, só são consideradas fatores de virulência quando a levedura é capaz de utilizar essa propriedade bioquímica durante o processo infeccioso (KUROGAWA, 1998; NAGLIK et al., 2004).

A enzima proteinase atua na instalação e sobrevivência da levedura, e na capacidade de driblar o sistema imunológico do hospedeiro, quebrando várias proteínas importantes como imunoglobulinas e citocinas (D'EÇA JUNIOR et al., 2011; MANE et al., 2011; SARDI et al., 2013). A proteinase confere à levedura, não só a capacidade de degradar queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina, proteínas da matriz extracelular e cadeia pesada de imunoglobulinas, como ainda a capacidade de aderir e destruir as células do hospedeiro (PICHOVÁ et al., 2001). Atualmente são conhecidas quatro tipos de proteinases: serinas, cisteínas, aspárticas e metaloproteinases (NAGLIK et al., 2004, COSTA, 2006). A produção dessa enzima ocorre principalmente em *C. albicans* seguida de *C. tropicalis*, mas também já foi observada em alguns isolados de *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa* e *C. lipolytica* (HOEGL et al., 1996).

A enzima fosfolipase tem a capacidade de hidrolisar o éster ligado aos glicerofosfolipídios. São conhecidos quatro tipos de fosfolipases, denominadas A, B, C, D, que diferem entre si quanto ao tipo da ligação éster que hidrolisam na molécula de fosfolipídio. A enzima em questão causa danos teciduais nas células hospedeiras e promove a liberação de lipídios através da lise de membranas celulares (D'EÇA JUNIOR et al., 2011; MANE et al., 2011; SARDI et al., 2013). A atividade elevada de fosfolipase está diretamente ligada ao alto grau de virulência, aumento da capacidade de adesão da levedura às células do hospedeiro e elevada porcentagem de mortalidade dos modelos de estudo *in vivo* (IVANOVSKA, 2003).

A atividade hemolítica contribui de forma significativa para a virulência das espécies de *Candida* facilitando a instalação de um processo infeccioso (FAVERO et al., 2013). Essa atividade é dita como a capacidade que a levedura tem em destruir as hemácias para a obtenção do ferro, o qual facilita a invasão das hifas e, conseqüentemente, a disseminação da candidíase (FAVERO et al., 2013). A hemoglobina é importante para o processo de diferenciação da levedura e desencadear a infecção (FAVERO et al., 2013; PENDRAK et al., 2005). A levedura produz hemolisinas, que compreendem dois tipos de hemólise: hemólise incompleta ou parcial e hemólise completa ou total (FAVERO et al., 2013; GIOLO e SVIDZINSKI, 2010; LUO et al., 2001). Estudos mostram que *C. albicans* possui maior capacidade hemolítica que outras espécies, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* (FRANÇA et al., 2010; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; RORIG et al., 2009). *C. tropicalis* apresenta uma capacidade significativa de adesão ao epitélio, de formar biofilmes e de expressar atividade hemolítica (NEGRI et al., 2010).

A atividade extracelular de DNase (desoxirribonuclease) foi descrita para isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, e discute-se o real envolvimento desta enzima na virulência. O fato de que isolados clínicos de *C. neoformans* apresentam atividade de DNase mais acentuada do que a demonstrada por isolados ambientais tem sugerido que essa enzima pode contribuir com a virulência, degradando DNA do hospedeiro (SÁNCHEZ; COLOM, 2010). Na literatura não foram encontrados estudos relatando a atividade DNase em isolados de *Candida* spp.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A literatura brasileira não possui muitos dados acerca da epidemiologia, microbiologia e perfil de sensibilidade dos isolados de candidíase bucal em pacientes imunocomprometidos. A partir dos dados apresentados e da importância de se analisar o perfil dos isolamentos de espécies de *Candida* que colonizam a cavidade bucal de pacientes portadores do HIV, e determinar a frequência das diferentes espécies em Uberlândia e região, foi proposto este trabalho com a finalidade de estudar os isolados clínicos de espécies de *Candida* da cavidade bucal de pacientes soropositivos para o HIV atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Determinar a frequência de indivíduos HIV positivos colonizados por *Candida* spp., bem como as espécies de *Candida* isoladas nestes pacientes;
- 2) Relacionar a carga microbiana de colonização com a contagem de linfócitos T CD4+, carga viral e terapia antirretroviral utilizada no momento da coleta, no caso dos portadores do HIV;
- 3) Determinar os principais fatores predisponentes para a colonização oral por *Candida* spp.;
- 4) Determinar a sensibilidade dos isolados de *Candida* spp. aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B e nistatina, pela metodologia de difusão de disco;
- 5) Pesquisar as exoenzimas proteinases, fosfolipases, DNase e hemolisina nos isolados de *Candida* spp.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo do estudo

O presente estudo foi classificado como transversal, uma vez que verificou a ocorrência de isolados de *Candida* spp. em um único momento, sem ter ocorrido acompanhamento dos pacientes após a coleta das amostras de saliva.

3.2 Sujeitos da pesquisa

Foram constituídos dois grupos de estudo, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II), sendo um grupo composto por 147 pacientes portadores do HIV, atendido no Ambulatório do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) que relataram não apresentar nenhum tipo de lesão bucal no momento da coleta, e outro grupo (denominado grupo de HIV negativos) constituído por 150 indivíduos não portadores do HIV, pertencentes à comunidade UFU, que relataram não possuir lesão bucal no momento da coleta.

3.3 Coleta das amostras

No período de maio a outubro de 2012 foram coletadas amostras de saliva dos dois grupos de estudo. A amostra de saliva dos pacientes portadores do HIV foi coletada durante as consultas de rotina dos mesmos no setor de Moléstias Infecciosas, ao passo que as amostras do grupo controle foram coletadas no local de trabalho dos mesmos, no caso dos profissionais, e durante o intervalo das aulas, no caso dos estudantes. Todas as amostras de saliva foram coletadas no período da tarde, sempre após às 13 horas, horário do atendimento ambulatorial dos pacientes HIV positivos. Os indivíduos tinham cerca de 5 a 10 minutos para realizarem a coleta das amostras de saliva.

Em ambos os casos os indivíduos foram convidados a participar da pesquisa e receberam as orientações pertinentes ao estudo e, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os indivíduos foram instruídos a coletar cerca de 2 mL de saliva não estimulada em frascos (12x100mm) esterilizados.

Após a coleta da saliva, os participantes da pesquisa preencheram, por meio de entrevista, uma ficha epidemiológica (Anexo 3) contendo dados demográficos, epidemiológicos e clínicos. No caso dos pacientes, alguns dados referentes à clínica foram obtidos através da consulta aos prontuários. Foram coletados dados como: idade, sexo, hábito de fumar, ingestão de bebida alcoólica, histórico de candidíase bucal, uso de prótese oral, uso de antifúngicos e antibióticos até

30 e 7 dias, respectivamente, antes da coleta da amostra de saliva, para os indivíduos de ambos os grupos de pesquisa; esquema antirretroviral utilizado e valores de CD4+ e carga viral, apenas para o grupo de HIV positivos.

Os indivíduos incluídos no estudo, pertencentes tanto ao grupo de pacientes quanto ao grupo controle, foram subdivididos em dois grupos de acordo com os resultados da cultura da amostra de saliva, em colonizados e não colonizados. No primeiro grupo foram incluídos todos os indivíduos que apresentaram o crescimento de pelo menos uma colônia de *Candida* spp. nos meios de cultura. No grupo de não colonizados foram incluídos todos os indivíduos com cultura negativa para espécies de *Candida*.

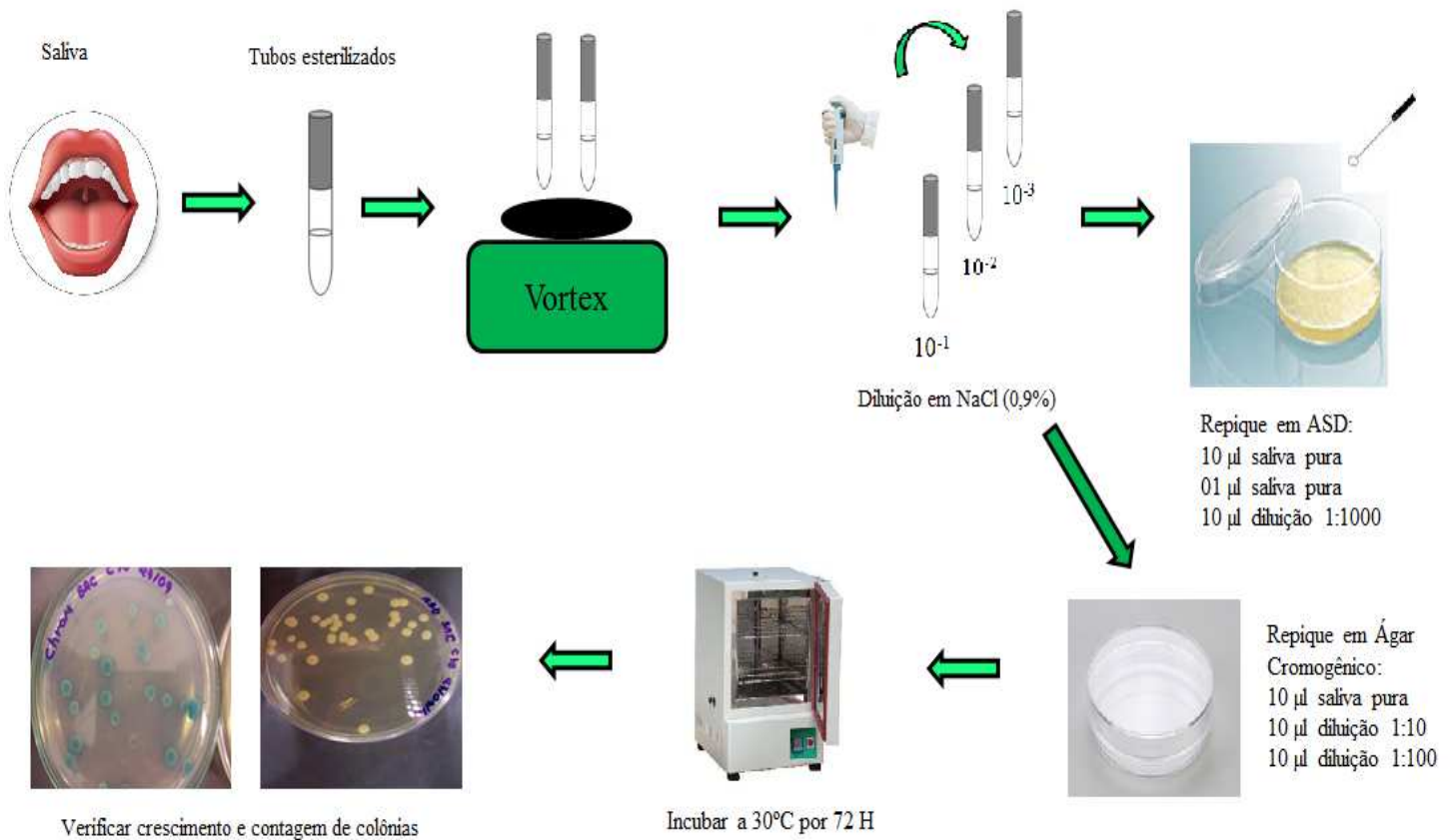
3.4 Processamento das amostras e quantificação das colônias

Após a coleta, o material foi levado para o laboratório do Curso Técnico em Análises Clínicas da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia (ESTES-UFU) para ser processado, sob orientação do professor Reginaldo dos Santos Pedroso, coordenador do curso em questão.

Em cabine de fluxo laminar, nível 1, classe 2, a saliva de cada sujeito da pesquisa foi homogeneizada com pérolas de vidro até a obtenção de uma suspensão uniforme e, em seguida, foram feitas diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-3}) em solução salina (0,9%) esterilizada. Alíquotas de 10 μ l da saliva pura e das diluições foram semeadas com alça de platina calibrada em placas contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (Sigma, EUA) adicionado de cloranfenicol, e em placas com Ágar Cromogênico (Conda, Espanha). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à 30°C por 72 horas, acompanhando o crescimento de colônias diariamente, conforme mostrado na Figura 1.

As colônias com morfologia semelhante em ambos os meios foram contadas e o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro de saliva (UFC/mL). Foi considerada para contagem das colônias a placa em que foi observado o crescimento do maior número de colônias.

Figura 1: Fluxograma do processo de isolamento e quantificação



Fonte: A autora.

3.5 Identificação dos isolados

Após repique das culturas positivas em ágar cromogênico para confirmar a pureza dos isolados, foram selecionados para repiques em tubos com ASD, e posterior identificação, as colônias com aspecto macromorfológico compatível com aquele apresentado por leveduras do gênero *Candida* no meio Cromogênico, sendo esse: colônias com coloração verde, azul, roxa e rosa, com superfície e bordas lisas e secas. As colônias individuais de cada amostra foram identificadas em nível de espécie com base na produção de tubo germinativo em soro humano, micromorfologia em ágar fubá acrescido de *tween* 80 e assimilação de carboidratos (LACAZ et al., 2002) e pelo sistema Auxacolor 2® (Bio-Rad, França).

3.5.1 Formação de tubo germinativo

A partir de cultura de 24 horas em ASD das leveduras isoladas, foram feitas suspensões, separadamente, em tubos contendo 500 µl de soro. Em seguida as suspensões foram incubadas em banho maria a 37°C por 2 horas. Posteriormente, 10 µl de cada inóculo foram colocados em lâmina, recoberto com lamínula, e observado no microscópio óptico para identificar a presença de tubo germinativo, característico de *C. albicans* (LACAZ; PORTO; MARTINS 1991).

3.5.2 Microcultivo em ágar fubá

O ágar fubá acrescido de *tween* 80 (Apêndice) foi fundido em micro-ondas e, após atingir temperatura aproximada de 50°C, cerca de 3 mL do meio foi depositado em lâmina esterilizada que estava contida em uma placa de Petri (90x15mm), também esterilizada. Após a solidificação do meio, foram feitas três estrias horizontais na superfície do ágar com alça descartável contendo pequena quantidade da amostra de levedura, obtida de cultura de 24 horas em meio ASD acrescido de cloranfenicol. As estrias foram recobertas com lamínula e o material incubado em câmara úmida, à temperatura ambiente por 5 dias. Decorrido esse período, as lâminas foram examinadas no microscópio óptico (aumento de 100 e 400x) com intuito de observar estruturas como: células leveduriformes, hifas, pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídios (LACAZ; PORTO; MARTINS 1991).

3.5.3 Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (Auxanograma)

A partir de cultura de 24 horas em meio ASD, foram preparados 4 mL de suspensão de leveduras em tubos contendo água destilada esterilizada, cuja turvação foi ajustada por comparação visual, sendo equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland (1×10^8 a 5×10^8 UFC/mL). Em seguida, o meio isento de fontes de carbono (meio C – Apêndice) foi fundido em micro-ondas e vertido em placas de Petri esterilizadas (150x15mm), sendo adicionado a esse cerca de 2 mL da suspensão feita anteriormente e homogeneizada. Após a solidificação do meio, alíquotas com aproximadamente 15 mg de diferentes carboidratos foram depositadas em pontos equidistantes marcados anteriormente na parte externa da base das placas. Os carboidratos utilizados foram: glicose, galactose, xilose, arabinose, lactose, maltose, melibiose, rafinose, raminose, sacarose, trealose, celobiose (LACAZ; PORTO; MARTINS 1991).

Para assimilação de fontes de nitrogênio, o meio N (Apêndice) também foi fundido em micro-ondas e vertido em placas de Petri esterilizadas (90x15mm), sendo que, após atingir temperatura de aproximadamente 50°C, foi adicionado os outros 2 mL restantes da suspensão de leveduras feita anteriormente e homogeneizado. Após a solidificação, cerca de 15 mg de das duas fontes de nitrogênio utilizadas (peptona e nitrato de potássio) foram depositados em pontos equidistantes, como foi feito para as placas de assimilação de carboidratos.

Após a aplicação das fontes de carboidrato ou nitrogênio, as placas foram incubadas a 30°C por 24-48 horas, sendo realizada a leitura das placas diariamente (LACAZ, 1991).

Os testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio foram considerados positivos quando se observou a formação de um halo de crescimento em volta do ponto onde foi depositado o carboidrato ou nitrato de potássio. Os testes foram considerados negativos quando não houve formação de halo de crescimento.

3.5.4 Diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis*

As amostras identificadas como *C. albicans* foram submetidas a testes moleculares pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação da espécie ou identificação de *C. dubliniensis*. O DNA utilizado nas reações foi obtido a partir de uma suspensão em 50 µl de água destilada esterilizada, utilizando as colônias que cresceram em 24 horas de cultivo (LUO; MITCHELL, 2002). Utilizou-se para realização da PCR *primers* específicos para *C. albicans*: (3'TTT ATC AAC TTG TCA CAC CAG A5', 5'ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG3') e *C. dubliniensis*: (3'AAA TGG GTT TGG TGC CAA ATT A5', 5'GTT GGC ATT GGC AAT AGC TCT A3'), de acordo com Estrada-Barraza et al. (2011).

Para um volume de 25 µl de PCR, foram utilizadas as seguintes quantidades de reagentes: 2,5 µl de tampão, 0,75 µl de cloreto de magnésio, 2,5 µl de dNTPs, 1,5 µl de cada um dos *primers* (verso e reverso), 0,25 µl da enzima Taq-polimerase (Ludwing Biotec, Brasil), 2 µl da suspensão de cada amostra e 14 µl de água MiliQ esterilizada. O termociclador (Biocycler, EUA) foi programado da seguinte forma: um ciclo inicial com temperatura de 95°C, com duração de 5 minutos, 38 ciclos com temperatura de 94°C por 30 segundos, seguido de temperatura de 54°C também por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, por fim, um ciclo com temperatura de 72°C durante 10 minutos, com estabilização da temperatura em 4°C.

Terminada a PCR, foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% adicionado de 1,5 µl do corante Easygen, com corrente elétrica de 90V e tempo de corrida em torno de 40 minutos. O tampão de corrida utilizado foi o TBE (0,89 M Tris-Base, 0,89 M ácido bórico, 20mM EDTA, pH

igual a 8,0). Para a corrida do gel foi utilizado 5 µl do produto da PCR e 5 µl do corante loading (1 µ de corante Buffer – Invitrogen Life, EUA; 4 µ de água ultra pura para biologia molecular – Pht), o qual permite o acompanhamento da corrida a olho nu e possibilita que o produto de PCR permaneça no poço do gel. Além disso, no primeiro poço de cada gel foi colocado um marcador de peso molecular (Ladder 100 pb, Ludwig Biotec, Brasil). Cerca de 40 minutos após o início da corrida o aparelho foi desligado, quando o corante já havia percorrido cerca de 2/3 do gel ou mais. Em seguida, os produtos foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta UV (Loccus biotecnologia, Brasil).

C. albicans apresentaram bandas de tamanho igual a 273 pb, enquanto *C. dubliniensis* apresentaram bandas de tamanho igual a 816 pb. (ESTRADA-BARRAZA et al., 2011).

Como controle positivo de cada espécie, foram utilizadas as cepas: *Candida albicans* ATCC-90028 (gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Regina Célia Candido, FCFRP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e *Candida dubliniensis* INCQS 40172 (gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, INCQS, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

3.6 Armazenamento das amostras

As amostras foram armazenadas em caldo BHI-glicerol a -20°C, e em água destilada esterilizada, mantidas à temperatura ambiente. Os experimentos foram realizados após ativação das amostras em ASD acrescido de cloranfenicol, e incubação de 24 a 48 horas em temperatura de 35°C.

3.7 Determinação da sensibilidade às drogas antifúngicas

A determinação da sensibilidade dos isolados de *Candida* spp. aos antifúngicos foi feita pela metodologia de disco-difusão em ágar, realizado conforme descrita no documento M44-A2 (CLSI, 2009).

Para avaliação da sensibilidade aos antifúngicos foram utilizados os discos dos antifúngicos fluconazol, itraconazol, anfotericina B, nistatina (Cecon, Brasil) e voriconazol (Bio Rad, Brasil), que foram mantidos armazenados em geladeira à 4°C.

O meio de cultura utilizado para execução dos testes de sensibilidade foi o ágar Müeller-Hinton (Isofar, Brasil) suplementado com 2% de glicose (Isofar, Brasil) e 0,5µg/mL de azul de metileno (Merck, Brasil), pH 7,2-7,4. O meio foi preparado segundo a recomendação descrita no documento

M44-A2 do CLSI (2009), dispensado em placas de Petri (90x10mm) e armazenado lacrado em geladeira à temperatura de 4°C por até 10 dias.

A partir da cultura de cada amostra de *Candida* spp. em placas contendo ASD, incubadas à temperatura de 35-37°C por 24 horas, foram suspensas cinco colônias em 5 mL de salina (0,9%) esterilizada. A turbidez da suspensão foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland (10^6 UFC/mL), por comparação visual.

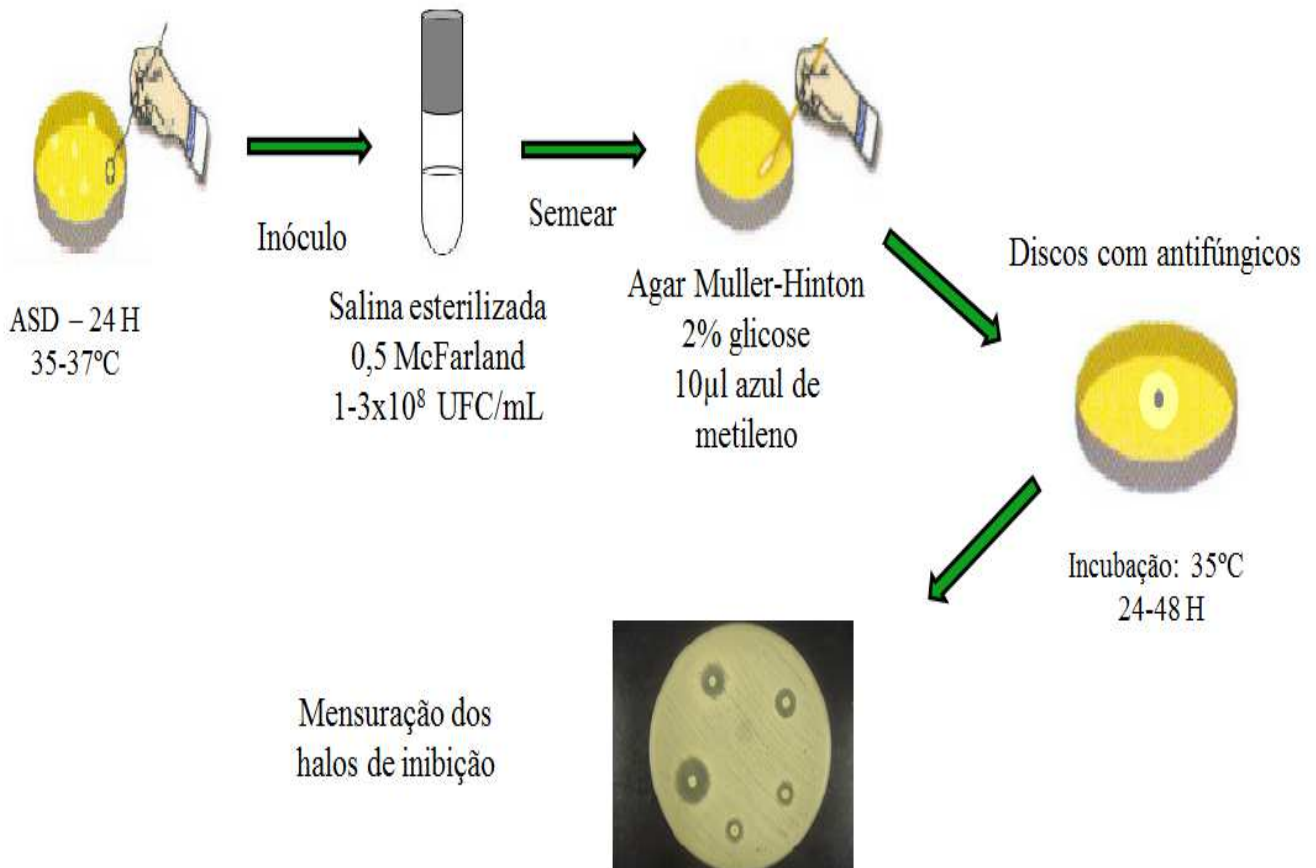
Antes da realização dos testes, os frascos contendo os discos de antifúngicos foram retirados da geladeira e mantidos por 30 minutos à temperatura ambiente. Um swab esterilizado foi introduzido na suspensão de leveduras, embebendo pesadamente as fibras de algodão e pressionado firmemente contra as paredes do tubo de ensaio, a fim de retirar o excesso. A inoculação na superfície do ágar Müeller-Hinton foi feita pela técnica de esgotamento em estria, com rotação da placa em ângulos de 60° por seis vezes. Em seguida, os discos contendo os antifúngicos foram distribuídos de forma equidistante com auxílio de uma pinça de metal esterilizada, por deposição sobre o ágar, fazendo-se, em seguida, uma suave compressão. Após 15 minutos da deposição dos discos no meio, as placas foram incubadas aerobicamente de forma invertida à 35°C por 24 horas (CLSI, 2009) (Figura 2). As cepas controle *C. albicans* ATCC 90028 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 (gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Regina Célia Cândido, FCFRP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil) foram utilizadas em cada lote de meio preparado. Os testes foram realizados em duplicata.

Após o período de incubação de 24 horas, foi realizada a mensuração do diâmetro da zona de inibição para determinação da sensibilidade, conforme as referências descritas na Tabela 1. Quando o crescimento foi insuficiente ou escasso, uma nova leitura foi realizada em 48 horas.

Tabela 1 – Critérios de interpretação dos halos dos discos de antifúngicos.

Antifúngico	Sensível (mm)	Sensível dose- dependente (mm)	Intermediário (mm)	Resistente (mm)	Referência
Itraconazol 10µg	≥ 20	-	12-19	≤ 11	CECON, 2010
Fluconazol 25µg	≥ 19	15-18	-	≤ 14	CLSI, 2009
Voriconazol 10µg	≥ 17	14-16	-	≤ 13	CLSI, 2009
AnfotericinaB 100µg	≥ 10	-	-	< 10	CECON, 2010
Nistatina 100µg	≥ 10	-	-	< 10	CECON, 2010

Figura 2: Fluxograma do processo de realização do teste de sensibilidade aos antifúngicos pela técnica de disco-difusão em ágar



Fonte: A autora.

3.8 Pesquisa de exoenzimas

3.8.1 Fosfolipase

A pesquisa de fosfolipase foi feita conforme descrito por Price et al. (1982) e Williamson et al. (1986). Cinco microlitros de cada suspensão de leveduras, em solução fisiológica, com turvação equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland (1×10^8 a 5×10^8 UFC/mL) foram depositados em pontos equidistantes no meio ágar fosfolipase (Apêndice). O teste foi realizado em duplicata. As placas contendo inóculos de diferentes culturas foram incubadas a 30°C, durante quatro dias. A atividade enzimática foi evidenciada pela formação de um halo opaco ao redor da colônia (precipitação de complexos de cálcio). A atividade de fosfolipase foi dada pela razão entre o

diâmetro da colônia (dc) e o mesmo somado com a zona de precipitação (dcp), assim, $Pz=dc/dcp$ (PRICE et al., 1982).

Os resultados foram classificados como negativo ($Pz = 1$), moderado ($0,63 < Pz < 1$) e acentuado ($Pz \leq 0,63$). De acordo com essa classificação, quanto menor o valor de Pz mais intensa a atividade enzimática.

O esquema de realização do teste está exemplificado na Figura 3.

3.8.2 *Proteinase*

Cinco microlitros dos isolados em suspensão igual à preparada no item anterior foram semeados em meio ágar proteinase (Apêndice) e incubadas a 30°C por sete dias. A atividade enzimática foi caracterizada pela presença de halo de clareamento ao redor da colônia no meio ágar albumina, resultante da degradação da proteína. A atividade enzimática foi dada pela razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o mesmo somado com a zona de clareamento (dcp), sendo, portanto, $Prz=dc/dcp$ (PRICE et al., 1982).

O escore para determinação da intensidade da atividade de proteinase foi igual àquele utilizado para determinar a atividade de fosfolipase. O teste também foi feito em duplicata.

O esquema de realização do teste está exemplificado na Figura 3.

3.8.3 *Hemolisina*

Os testes foram realizados de acordo com Rorig et al. (2009). Foi utilizado Ágar Saboraud Dextrose, acrescida 7% de sangue de carneiro (Apêndice). Cinco microlitros da suspensão de leveduras, preparada do mesmo modo daquela utilizada para a pesquisa de fosfolipase, foram depositados em pontos equidistantes no meio ágar sangue. O teste foi realizado em duplicata e as placas foram incubadas a 30°C, durante 48 horas. A atividade hemolítica (H_i) foi determinada pela razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o mesmo acrescido da zona de hemólise (dcp), dessa forma, $H_i=dc/dcp$. Os resultados foram expressos em ausência de hemólise ($H_i=1$), hemólise moderada ($0,63 < H_i < 1$) ou hemólise acentuada ($H_i \leq 0,63$).

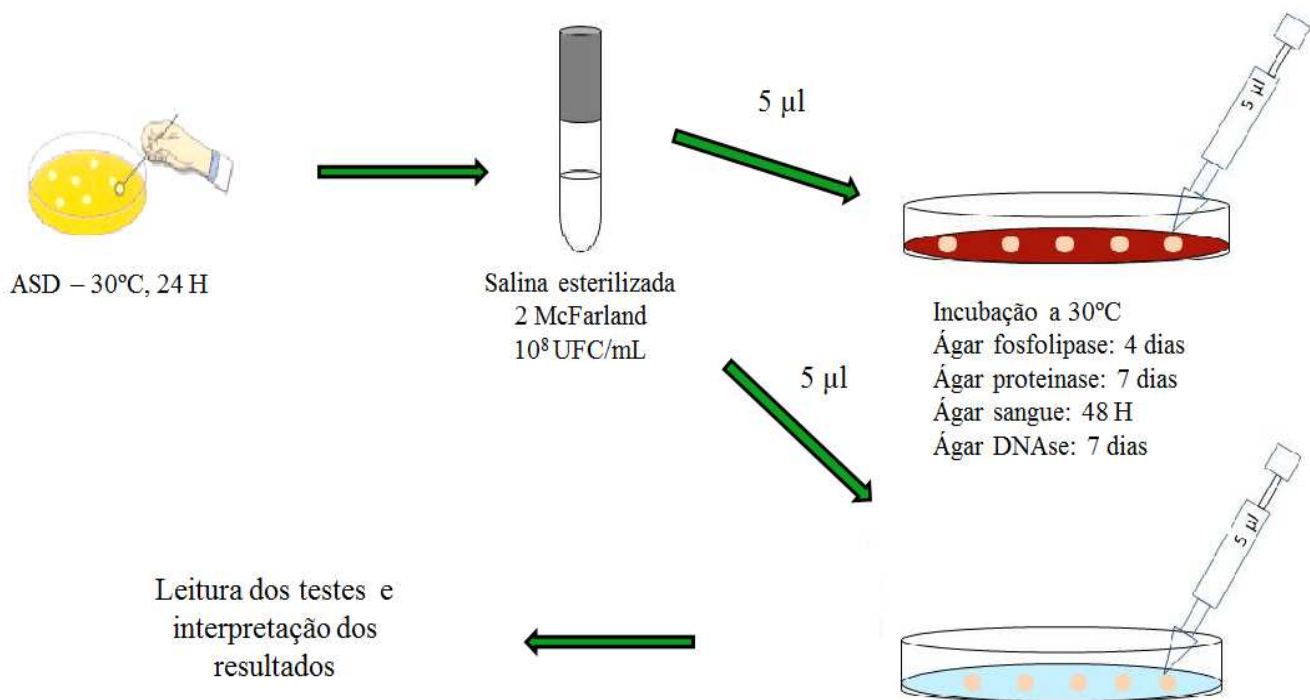
O esquema de realização do teste está exemplificado na Figura 3.

3.8.4 DNase

Os testes foram realizados utilizando o método semelhante ao utilizado para detecção de DNase em espécies de *Staphylococcus* (SÁNCHEZ; COLOM, 2010). As placas foram preparadas com meio teste de DNase (Apêndice). Cinco microlitros da suspensão de leveduras, preparada do mesmo modo daquela utilizada para a pesquisa de fosfolipase, foram depositados em pontos equidistantes na superfície do meio contido em Placas de Petri (150x15mm). As culturas foram incubadas a 30°C por sete dias. Depois desse período, as placas foram colocadas em um fundo branco para visualização da colônia e do halo de clareamento ao redor da colônia. Os resultados do teste foram expressos em forma de sinais positivo e negativo. O experimento foi realizado em duplicata, em dois experimentos independentes.

O esquema de realização do teste está exemplificado na Figura 3.

Figura 3: Fluxograma do processo de realização dos testes de pesquisa de atividade enzimática



Fonte: A autora.

3.9 Estatística

Na comparação entre o grupo de indivíduos colonizados e não colonizados, em ambos os grupos de estudo, para as variáveis qualitativas, foram calculados os valores de p e os valores da *odds ratio* (OR) como indicação de possíveis associações. Para análise das variáveis qualitativas entre os grupos de colonizados e não colonizados, tanto dos pacientes quanto dos indivíduos HIV negativos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A comparação da média de UFC/mL entre as contagens de linfócitos T CD4+ e carga viral foi feita através do teste de Kruskal-Wallis seguindo do teste *pos-hoc* de Student-Newman-Keuls. Na comparação das características analisadas entre os grupos de HIV positivo e negativo, bem como da produção de atividade enzimática pelos isolados desses grupos, foi utilizado o teste do qui-quadrado. Os testes não-paramétricos foram aplicados para análise das variáveis quantitativas que não apresentaram distribuição normal de probabilidade. Todos os testes foram aplicados utilizando um nível de significância de 5%.

3.10 Comitê de Ética

O presente estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia, com número 368/11 (Anexo I).

4 RESULTADOS

4.1 Características dos grupos de estudo

4.1.1 Pacientes

Dos 147 pacientes incluídos no estudo, 84 foram do sexo masculino e 63 do sexo feminino. A idade variou de 17 a 73 anos, com média de 44,7 anos e mediana de 44 anos. Em relação à forma como adquiriram o HIV, 101 (68,7%) foi através de contato heterossexual, 19 (12,9%) por contato homossexual, 1 (0,7%) por via congênita, 1 (0,7%) por acidente de trabalho, 1 (0,7%) através de transfusão de sangue e 24 (16,3%) pacientes não souberam informar a forma de infecção pelo HIV. O tempo médio de infecção foi 8,4 anos. Além disso, 51 (37,7%) indivíduos eram apenas portadores do HIV, e os outros 96 (62,3%) pacientes eram doentes de AIDS.

Do total de pacientes, treze (8,8%) não faziam uso de nenhuma terapia antirretroviral no momento da coleta da amostra de saliva. Sessenta e oito pacientes (46,3%) utilizavam inibidores de transcriptase reversa, 61 (41,5%) faziam uso de inibidor de protease associado com um inibidor de transcriptase e cinco indivíduos (3,4%) combinavam o uso dos inibidores de protease e transcriptase com um antirretroviral inibidor de integrase.

Durante a aplicação do questionário, foram feitas perguntas sobre a forma como os pacientes realizavam a higiene bucal e verificou-se que 65 (44,2%) indivíduos apenas escovavam os dentes e os 82 (55,8%) restantes, além de escovarem os dentes, utilizam fio dental, sendo que desse total 54 (36,7%) faziam essa higiene pelo menos três vezes ao dia. Além disso, observou-se que 15,6% dos pacientes utilizavam algum tipo de enxaguante bucal pelo menos uma vez ao dia durante o período da coleta da amostra. Verificou-se também que dos 147 pacientes, 38,6% eram fumantes.

Os pacientes foram indagados também em relação ao consumo de bebida alcoólica e verificou-se que 39 (26,5%) desses indivíduos ingeriam algum tipo de bebida pelo menos uma vez durante o mês.

Em relação à presença de outros problemas de saúde, observou-se que 57 (38,8%) portadores do HIV possuíam alguma comorbidade, sendo as mais comuns: hipertensão arterial (59,6%), diabetes (24,5%), cardiopatias (21%), obesidade (19,3%) e hipotireoidismo (15,7%).

A ocorrência de candidíase oral, em momentos anteriores à coleta da amostra de saliva, pelo menos uma vez, foi relatada por 43 (29,2%) pacientes.

Candida spp. foram isoladas de 89 (60,5%) pacientes, totalizando 111 isolados, sendo *C. albicans* a espécie mais frequente entre os isolados (67,6%). As espécies não-*albicans* somaram 32,4% do total de isolados (Tabela 2). Dos 89 indivíduos com cultura positiva para leveduras do

gênero *Candida*, 69 (77,5%) estavam colonizados por apenas uma espécie de *Candida*, e 20 (22,5%) apresentaram associação de duas ou mais espécies (Tabela 3).

A contagem média de colônias por mililitro de saliva foi de $8,8 \times 10^3$ UFC/mL e mediana de 8×10^2 UFC/mL, variando de 10^2 a 5×10^5 UFC/mL, das quais 23 (25,8%) tiveram uma concentração de leveduras por mL de saliva superior a 4×10^3 e 66 (74,2%) apresentaram uma contagem entre 10^2 e 4×10^3 UFC/mL.

Tabela 2: Distribuição das espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal de portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012

Espécies	Número de isolados	Frequência (%)
<i>C. albicans</i>	75	67,6
<i>C. parapsilosis</i>	10	9,0
<i>C. tropicalis</i>	8	7,2
<i>C. glabrata</i>	5	4,5
<i>C. krusei</i>	4	3,6
<i>C. dubliniensis</i>	3	2,7
<i>C. kefyr</i>	2	1,8
<i>C. famata</i>	1	0,9
<i>C. guilliermondii</i>	1	0,9
<i>C. lusitaniae</i>	1	0,9
<i>C. peliculosa</i>	1	0,9
	111	100

Fonte: A autora.

Tabela 3: Frequência da associação de *Candida* spp. em indivíduos portadores do HIV atendidos no HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012

Associação de diferentes espécies	N°	%
<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i>	6	30
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>	5	25
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	2	10
<i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i>	2	10
<i>C. albicans</i> + <i>C. kefyr</i>	1	5
<i>C. dubliniensis</i> + <i>C. lusitaniae</i>	1	5
<i>C. albicans</i> + <i>C. dubliniensis</i>	1	5
<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i> + <i>C. tropicalis</i>	1	5
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i> + <i>C. tropicalis</i>	1	5
	20	100

Fonte: A autora.

Os fatores predisponentes para a colonização da cavidade bucal por leveduras do gênero *Candida* estão relacionados na Tabela 4. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos colonizados e não colonizados quando analisamos o uso de antibióticos pelos dois grupos ($p = 0,0254$, $OR = 3,2$) e o uso de prótese dentária ($p = 0,0173$, $OR = 2,46$). Entretanto, para o uso de HAART ($p = 0,5671$), uso de antifúngicos ($p = 0,7102$), hábito de fumar ($p = 0,3868$), sexo ($p = 0,4215$), idade ($p = 0,2529$), contagem de CD4+ ($p = 0,5234$), carga viral ($p = 0,2954$), histórico de candidíase ($p = 0,8628$), e tempo de diagnóstico do HIV ($p = 0,2758$) não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre pacientes colonizados e não colonizados.

Ao analisar a relação do esquema HAART, que inclui diferentes classes de antirretrovirais, e a colonização bucal por *Candida* spp., verificou-se que os indivíduos que faziam uso combinado de inibidores de transcriptase reversa e inibidor de protease apresentaram maior probabilidade de serem colonizados do que aqueles que utilizaram inibidores de transcriptase reversa ($p = 0,0315$).

Quando foram comparados os outros esquemas, e aqueles que não utilizavam terapia HAART, nenhuma diferença estatística significativa foi observada ($p > 0,05$).

Tabela 4: Fatores predisponentes envolvidos na colonização bucal por espécies de *Candida* spp. dos 147 pacientes portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, em 2012

Fatores predisponentes	Colonizados (89)	Não colonizados (58)	p – valor	OR
Uso de antibióticos	24 (27%)	6 (10,3%)	0,0254	3,2000
Uso de antifúngicos	5 (5,6%)	5 (8,6%)	0,7102	0,6310
Fumante			0,3868	
Sim	27 (30,3%)	13 (22,4%)		1,5074
Não	62 (69,7%)	45 (77,6%)		0,6634
Uso de prótese dentária			0,0173	
Sim	45 (50,6%)	17 (29,3%)		2,4666
Não	44 (49,4%)	41 (70,7%)		0,4054
Uso de HAART	80 (89,9%)	54 (93,1%)	0,5671	1,5146
Sexo			0,4215	
Feminino	41 (46%)	22 (37,9%)		1,3977
Masculino	48 (54%)	36 (62,1%)		0,7154
Idade	45,6 Max 73 Min 17	43,5 Max 61 Min 27	0,2529	
CD4+	544 ± 331	562 ± 319	0,5234	
Carga viral	20215,7	5387,2	0,2954	
Histórico de candidíase oral				
Sim	27 (30,4%)	16 (27,6%)	0,8628	1,1431
Não	62 (69,6%)	42 (72,4%)		0,8748
Tempo médio da doença	8,03 anos ± 5,44	8,9 anos ± 5,08	0,2758	

Fonte: A autora.

A contagem média de linfócitos T CD4+ foi de 551 cel/mm³ e mediana de 557 cel/mm³, variando de 3 a 1619 cel/mm³, 25 (17%) pacientes possuíam CD4+ menor que 200 cel/mm³ no período em que ocorreu a coleta da saliva. Cento e oito (73,4%) pacientes apresentaram carga viral indetectável (<50 cópias/mL), ao passo que treze (8,8%) apresentaram carga viral superior a 20.000 cópias/mL.

Comparando a contagem de linfócitos T CD4+ e carga viral dos pacientes que apresentaram pelo menos um isolado de *Candida* spp. da cavidade oral com aqueles que tiveram cultura negativa, observou-se um valor de *p* bem próximo de 0,05 na faixa entre 0-200 cel/mm³ no caso do CD4+ (*p* = 0,0546) (Tabela 5). Já em relação à carga viral, não foi encontrado diferença estatisticamente significativa entre o número de indivíduos colonizados e não colonizados (Tabela 6).

Tabela 5: Frequência de indivíduos HIV positivos colonizados e não colonizados por *Candida* spp. de acordo com a contagem de linfócitos T CD4+ atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, em 2012

CD4 (cels/mm ³)	Colonizados (89)		Não colonizados (58)		<i>P</i>
	Nº de indivíduos	Média (CD4+)	Nº de indivíduos	Média (CD4+)	
0-200	17 (19,1%)	123,7	8 (13,8%)	70,3	0,0546
201-350	9 (10,1%)	273,2	11 (18,9%)	271,3	1,0000
>350	63 (70,8%)	694,6	39 (67,3%)	743,5	0,1164
Total	89 (100%)	544,1	58 (100%)	561,1	0,5234

Fonte: A autora.

Tabela 6: Frequência de indivíduos HIV positivos colonizados e não colonizados por *Candida* spp. de acordo com a carga viral atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, em 2012

Carga viral (cópias/mL)	Colonizados (89)		Não colonizados (58)		<i>P</i>
	Nº de indivíduos	Média (carga viral)	Nº de indivíduos	Média (carga viral)	
<50	62	0	46	0	1.0000
51-20000	18	4,3 x 10 ³	8	6,0 x 10 ³	0.4899
>20000	9	1,9 x 10 ⁵	4	6,6 x 10 ⁴	0.1474

Fonte: A autora.

Comparando a média de unidades formadoras de colônias por mililitro de saliva entre diferentes faixas de contagem de linfócitos T CD4+, observou-se que aqueles que tiveram CD4+ inferior a 200 cel/mm³ tenderam a apresentar um maior número de UFC/mL do que aqueles pacientes com CD4+ maior do que 350 cel/mm³ ($p = 0,0001$) (Tabela 7).

Tabela 7: Relação da contagem de linfócitos T CD4+ e concentração de leveduras (UFC/mL) na saliva dos pacientes HIV positivos atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012

CD4+ (cels/mm ³)	Colonizados	UFC/mL (média)	<i>P</i>
0-200 ^a	17	7,4x10 ³	ab: 0,2631
201-350 ^b	9	5,5x10 ³	ac: 0,0001
>350 ^c	63	9,7x10 ³	bc: 0,0948
Total	89	8,9x10 ³	

Nota: a, b, c: faixas de variação de CD4+ usada como referência no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU para início, manutenção ou alteração da terapia antirretroviral, até a finalização deste estudo. ab, ac, bc: resultado da comparação estatística entre as médias de UFC/mL das 3 faixas de linfócitos TCD4+.

Fonte: A autora.

Já quando foi comparada a média de UFC/mL dos grupos de diferentes faixas de carga viral, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos (Tabela 8).

Tabela 8: Relação da carga viral e concentração de leveduras (UFC/mL) na saliva dos pacientes HIV positivos atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012

Carga viral (cópias/mL)	Colonizados	UFC/mL (média)	P
<50 ^a	62	9,8x10 ³	ab: 0,2259
51-20000 ^b	18	3,6x10 ³	ac: 0,4549
>20000 ^c	9	8,0x10 ³	bc: 0,1270
Total	89	8,8x10 ³	

Nota: a, b, c: faixas de variação de carga viral. ab, ac, bc: resultado da comparação estatística entre as médias de UFC/mL das 3 faixas de carga viral.

Fonte: A autora.

4.1.2 Grupo indivíduos HIV negativos

Em relação aos 150 indivíduos não portadores do HIV que participaram deste estudo, observou-se que 120 eram mulheres e 30 eram do sexo masculino. A idade média deste grupo foi igual a 31,2 anos e mediana de 27 anos, variando de 18 a 60 anos.

Os indivíduos também foram indagados sobre como realizavam a higiene bucal, e 23 (15,3%) alegaram apenas escovar os dentes diariamente, enquanto que os 127 (84,7%) restantes escovavam e faziam uso do fio dental todos os dias, sendo que dessa parcela, a grande maioria (88,2%) faziam essa higienização três vezes ou mais durante o dia. Sobre o uso de enxaguante bucal, 38,6% dos indivíduos alegaram utilizá-lo pelo menos uma vez ao dia no período em que a amostra de saliva foi coletada.

Sobre o consumo de bebida alcoólica, 69 (46%) participantes deste grupo afirmaram ingerir algum tipo de bebida contendo álcool pelo menos uma vez no mês. Em relação à condição de ser ou não fumante, apenas oito (5,3%) indivíduos disseram ser fumantes.

Em relação à presença de alguma comorbidade, observou-se que 17 (11,3%) indivíduos que pertenciam a este grupo afirmaram possuir alguma alteração nas condições de saúde, sendo que os mais comuns foram hipertensão arterial (47%) e rinite alérgica (17,6%).

Não foi relatada a ocorrência de episódios de candidíase oral em momentos anteriores à coleta de amostra de saliva por nenhum dos indivíduos pertencentes ao grupo em questão.

Das 150 amostras de saliva obtidas dos indivíduos pertencentes a este grupo, 51 (34%) foram positivas para o gênero *Candida*. O número de UFC/mL de saliva foi superior a 4×10^3 para apenas 5 (9,8%) amostras, sendo que as 46 amostras restantes apresentaram contagem entre 10^2 e 4×10^3 UFC/mL. A média de unidades formadoras de colônias por mililitro de saliva foi de $9,8 \times 10^2$ e mediana de 4×10^2 UFC/mL, sendo observada uma variação de 10^2 a $5,7 \times 10^3$ UFC/mL.

A partir das 51 amostras de saliva que apresentaram crescimento de colônias, foram obtidos 57 isolados do gênero *Candida*, dos quais 77,2% foram identificados como *C. albicans* e, conseqüentemente, os 32,9% restantes corresponderam às espécies não-*albicans* (Tabela 9). A associação de pelo menos duas espécies foi observada em 6 (11,7%) dos 51 indivíduos colonizados (Tabela 10).

Tabela 9: Distribuição das espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal no grupo de indivíduos HIV negativos do estudo

Espécies	Número de isolados	Porcentagem (%) espécies
<i>C. albicans</i>	44	77,2
<i>C. parapsilosis</i>	5	8,8
<i>C. tropicalis</i>	3	5,25
<i>C. dubliniensis</i>	1	1,75
<i>C. famata</i>	1	1,75
<i>C. glabrata</i>	1	1,75
<i>C. guilliermondii</i>	1	1,75
<i>C. kefyr</i>	1	1,75
	57	100

Fonte: A autora.

Tabela 10: Frequência da associação de *Candida* spp. no grupo de indivíduos HIV negativos do estudo

Associação de diferentes espécies	Nº	%
<i>C. albicans</i> + <i>C. Tropicalis</i>	2	33,2
<i>C. albicans</i> + <i>C. Parapsilosis</i>	1	16,7
<i>C. albicans</i> + <i>C. Guilliermondii</i>	1	16,7
<i>C. albicans</i> + <i>C. Kefyr</i>	1	16,7
<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. Tropicalis</i>	1	16,7
	6	100

Fonte: A autora.

Quando se comparou a presença de alguns fatores que podem ser considerados predisponentes para a colonização da cavidade bucal, entre os indivíduos colonizados e não colonizados pertencentes ao grupo de indivíduos HIV negativos, não foi encontrada diferença estatística entre os dois grupos (Tabela 11).

Tabela 11: Fatores envolvidos na colonização oral por espécies de *Candida* spp. dos 150 pertencentes ao grupo de indivíduos HIV negativos do estudo

Fatores predisponentes	Colonizados (51)	Não colonizados (99)	P – valor	OR
Uso de antibióticos	4 (7,8%)	3 (3%)	0,1815	2,70
Uso de antifúngicos	1 (1,9%)	2 (2%)	0,9803	0,9701
Fumante				
Sim	3 (5,9%)	5 (5,1%)	0,8299	1,17
Não	48 (94,1%)	94 (94,9%)		
Sexo				
Feminino	37 (72,5%)	83 (83,9%)	0,1015	0,51
Masculino	14 (27,5%)	16 (16,1%)		
Idade	32,3 Max 57 Min 18	30,6 Max 60 Min 18		
Uso de bebida alcoólica				
Sim	25 (49%)	44 (44,5%)	0,5943	1,20
Não	26 (51%)	55 (55,5%)		-
Uso de prótese dentária				
Sim	5 (9,8%)	8 (8,1%)	0,7223	1,23
Não	46 (90,2%)	91 (91,9%)		
Uso de enxaguante bucal				
Sim	21 (41,8%)	37 (37,4%)	0,6505	1,17
Não	30 (58,2%)	62 (62,6%)		
Higiene bucal				
Escovação	9 (17,6%)	14 (14,1%)	0,5724	1,29
Escova+fio dental	42 (82,4%)	85 (85,9%)		

Fonte: A autora.

4.2 Comparação entre o grupo de pacientes e HIV negativos

A tabela 12 mostra a comparação entre as principais características observadas nos dois grupos de estudo.

Tabela 12: Comparação entre características observadas no grupo de pacientes e no grupo de HIV negativos

Condição	Pacientes (147)	HIV negativos (150)	P
Fumante	40 (27,2%)	8 (5,3%)	0,0001
Uso de bebida alcoólica	39 (26,5%)	69 (46%)	0,0007
Presença de comorbidades	57 (38,7%)	17 (11,3%)	0,0001
Uso de antibióticos	30 (20,4%)	7 (4,6%)	0,0001
Uso de antifúngico	10 (6,8%)	3 (2%)	0,0820
Média de idade	44,7	31,2	0,0001
Média de UFC/mL	$5,3 \times 10^4$ UFC/mL	$9,7 \times 10^2$ UFC/mL	0,0001

Fonte: A autora.

4.3 Teste de sensibilidade

Os testes de sensibilidade às drogas antifúngicas mostraram que todos os isolados dos dois grupos de estudo foram sensíveis à nistatina e ao voriconazol. Em relação ao fluconazol, todos os isolados de *Candida* spp. pertencentes ao grupo controle foram sensíveis. Entretanto, um isolado de *C. albicans* e 2 de *C. krusei*, provenientes de amostras de saliva dos indivíduos portadores do HIV apresentaram sensibilidade dose dependente em relação ao fluconazol.

Em relação à anfotericina B, a maioria dos isolados do grupo de indivíduos HIV negativos e dos pacientes foram sensíveis, com exceção de cinco isolados de *C. albicans* do grupo dos portadores do HIV que apresentou resistência *in vitro* ao antifúngico em questão.

Em relação ao itraconazol, a maioria dos isolados provenientes do grupo de indivíduos não portadores do HIV (77,2%) e do grupo de pacientes (51,4%) apresentaram sensibilidade dose dependente. Apenas um isolado de *C. glabrata* e *C. peliculosa*, advindo da amostra de saliva de um indivíduo HIV positivo, apresentou resistência *in vitro* ao itraconazol. Os resultados do teste de sensibilidade aos antifúngicos estão expressos nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13: Perfil de sensibilidade de *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal de portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas gerais, Brasil, no ano de 2012

Espécie (n°)	Anfotericina B		Fluconazol			Itraconazol			Nistatina		Voriconazol	
	S	R	S	SDD	R	S	I	R	S	R	S	R
<i>C. albicans</i> (75)	70(93,3%)	5(6,7%)	74(98,7%)	1(1,3%)	0	34(45,4%)	41(54,6%)	0	75(100%)	0	75(100%)	0
<i>C. parapsilosis</i> (10)	10(100%)	0	10(100%)	0	0	6(60%)	4(40%)	0	10(100%)	0	10(100%)	0
<i>C. tropicalis</i> (8)	8(100%)	0	8(100%)	0	0	4(50%)	4(50%)	0	8(100%)	0	8(100%)	0
<i>C. glabrata</i> (5)	5(100%)	0	5(100%)	0	0	4(80%)	0	1(20%)	5(100%)	0	5(100%)	0
<i>C. krusei</i> (4)	4(100%)	0	2(50%)	2(50%)	0	1(25%)	4(75%)	0	4(100%)	0	4(100%)	0
<i>C. kefyr</i> (2)	2(100%)	0	2(100%)	0	0	0	2(100%)	0	2(100%)	0	2(100%)	0
<i>C. dubliniensis</i> (3)	3(100%)	0	3(100%)	0	0	3(100%)	0	0	3(100%)	0	3(100%)	0
<i>C. famata</i> (1)	1(100%)	0	1(100%)	0	0	1(100%)	0	0	1(100%)	0	1(100%)	0
<i>C. guilliermondii</i> (1)	1(100%)	0	1(100%)	0	0	1(100%)	0	0	1(100%)	0	1(100%)	0
<i>C. lusitaniae</i> (1)	1(100%)	0	1(100%)	0	0	0	1(100%)	0	1(100%)	0	1(100%)	0
<i>C. peliculosa</i> (1)	1(100%)	0	1(100%)	0	0	0	0	1(100%)	1(100%)	0	1(100%)	0

Nota: S – sensível; R – resistente; I – intermediário; SDD – sensível dose dependente.

Fonte: A autora.

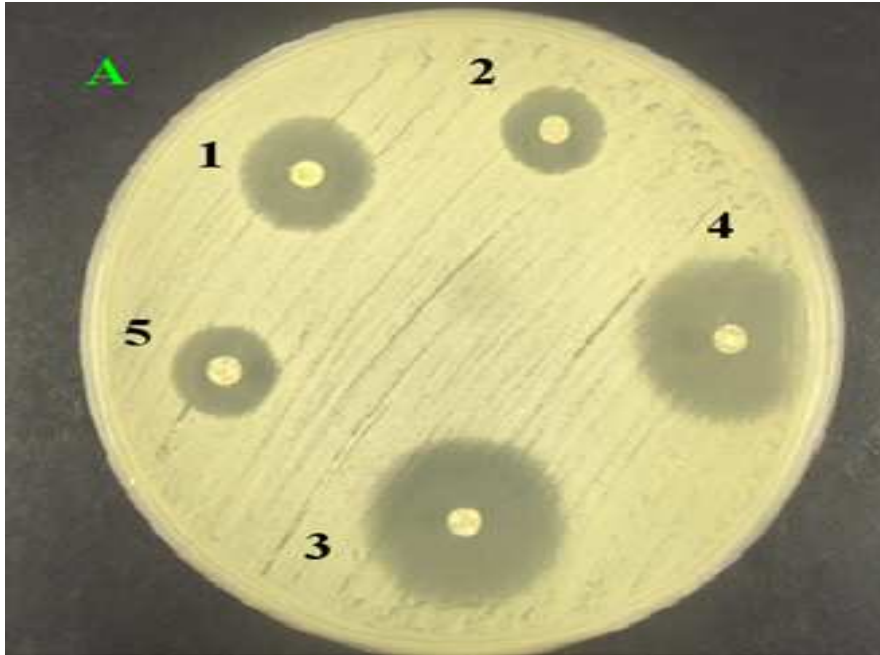
Tabela 14: Perfil de sensibilidade de *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal do grupo de indivíduos HIV negativos do estudo

Espécie (n°)	Anfotericina B		Fluconazol			Itraconazol			Nistatina		Voriconazol	
	S	R	S	SDD	R	S	I	R	S	R	S	R
<i>C. albicans</i> (44)	44(100%)	0	44(100%)	0	0	10(22,7%)	34(77,3%)	0	44(100%)	0	44(100%)	0
<i>C. parapsilosis</i> (5)	5(100%)	0	5(100%)	0	0	2(40%)	3(60%)	0	5(100%)	0	5(100%)	0
<i>C. tropicalis</i> (3)	3(100%)	0	3(100%)	0	0	1(33,3%)	2(66,7%)	0	3(100%)	0	3(100%)	0
<i>C. dubliniensis</i> (1)	1(100%)	0	1(100%)	0	0	0	1(100%)	0	1(100%)	0	1(100%)	0
<i>C. famata</i> (1)	1(100%)	0	1(100%)	0	0	0	1(100%)	0	1(100%)	0	1(100%)	0
<i>C. glabrata</i> (1)	1(100%)	0	1(100%)	0	0	0	1(100%)	0	1(100%)	0	1(100%)	0
<i>C. guilliermondii</i> (1)	1(100%)	0	1(100%)	0	0	0	1(100%)	0	1(100%)	0	1(100%)	0
<i>C. kefyr</i> (1)	1(100%)	0	1(100%)	0	0	0	1(100%)	0	1(100%)	0	1(100%)	0

Nota: S – sensível; R – resistente; I – intermediário; SDD – sensível dose dependente.

Fonte: A autora.

Figura 4: Placa de ágar Müeller-Hinton mostrando o teste de sensibilidade aos antifúngicos pela metodologia de difusão do disco em ágar para as amostras de *Candida* spp.: 1) Anfotericina B; 2) Itraconazol; 3) Fluconazol; 4) Voriconazol; 5) Nistatina



Fonte: A autora.

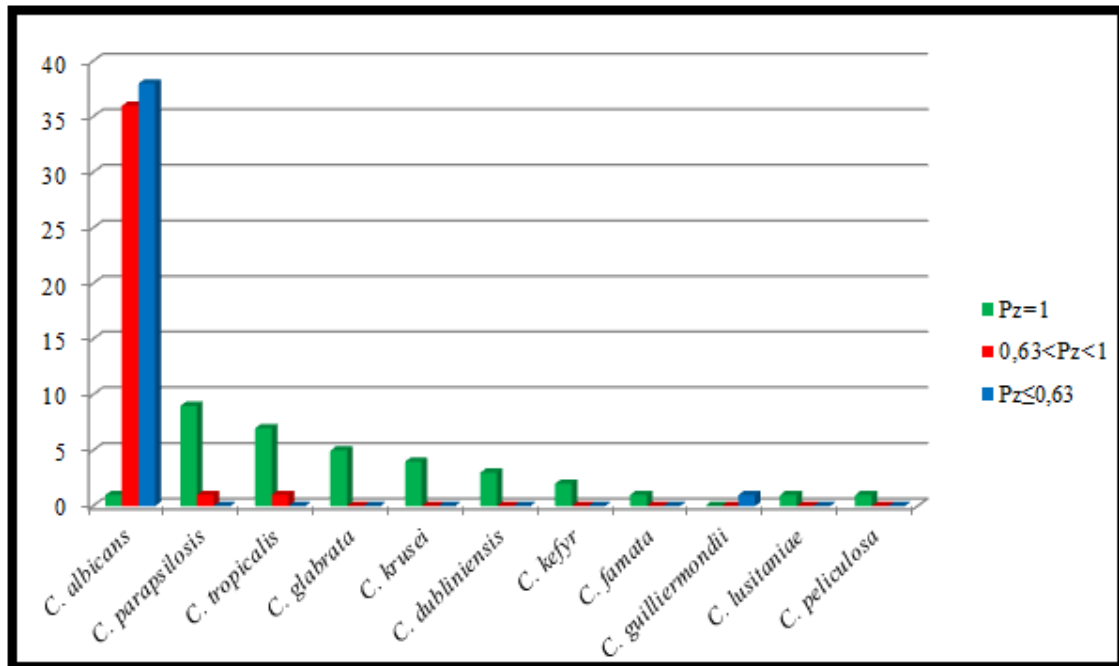
4.4 Atividade enzimática

4.4.1 Fosfolipase

Dos 111 isolados provenientes da cavidade bucal dos indivíduos infectados pelo HIV, 77 (69,3%) foram positivos para a atividade de fosfolipase, dos quais 39 apresentaram atividade enzimática acentuada ($Pz \leq 0,63$) e 38 atividade moderada ($0,63 < Pz < 1$).

Quando foi analisada a produção dessa enzima pelas espécies, verificou-se que apenas os isolados de *C. albicans* (98,7%), *C. parapsilosis* (10%), *C. tropicalis* (12,5%) e *C. guilliermondii* (100%) foram positivos para atividade de fosfolipase (Figura 5).

Figura 5: Frequência das espécies de *Candida*, para atividade de fosfolipase, isoladas da cavidade bucal dos pacientes portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012



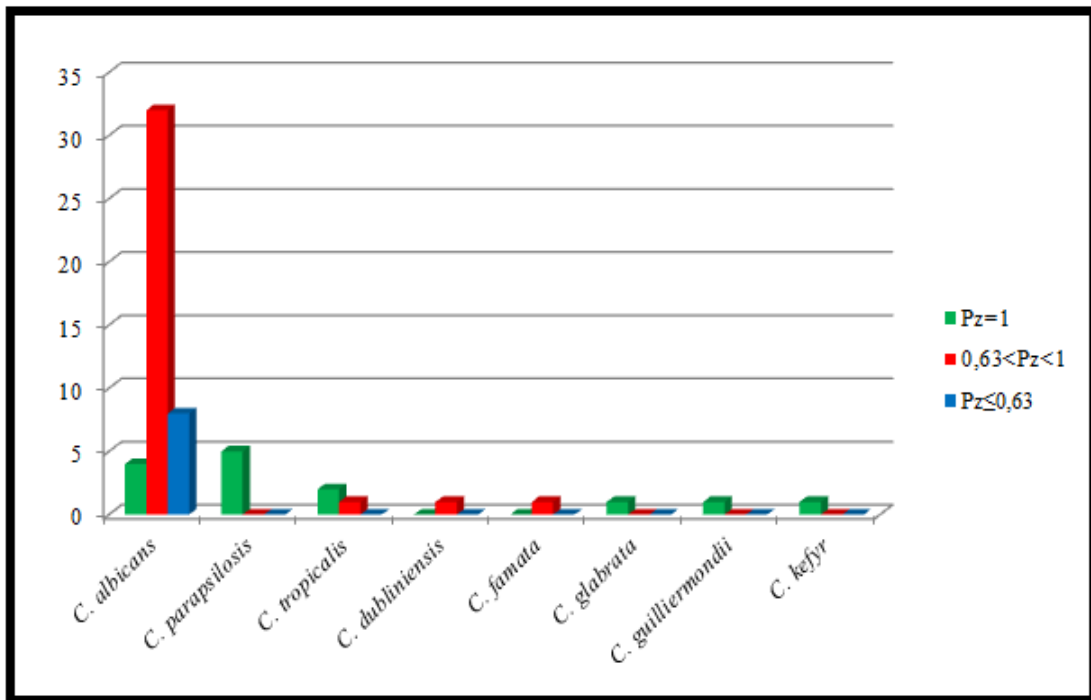
Fonte: A autora.

Já em relação às amostras obtidas dos indivíduos pertencentes ao grupo de HIV negativos, observou-se que 43 (72,6%) foram positivos para atividade fosfolipase, sendo que 35 isolados apresentaram essa atividade de forma moderada ($0,63 < Pz < 1$) e apenas 8 de modo acentuado ($Pz \leq 0,63$).

Ao analisar a produção de acordo com as espécies, observou-se que *C. albicans* (90,9%), *C. tropicalis* (33,3%), *C. dubliniensis* (100%) e *C. famata* (100%) apresentaram a atividade de fosfolipase moderada e/ou acentuada (Figura 6).

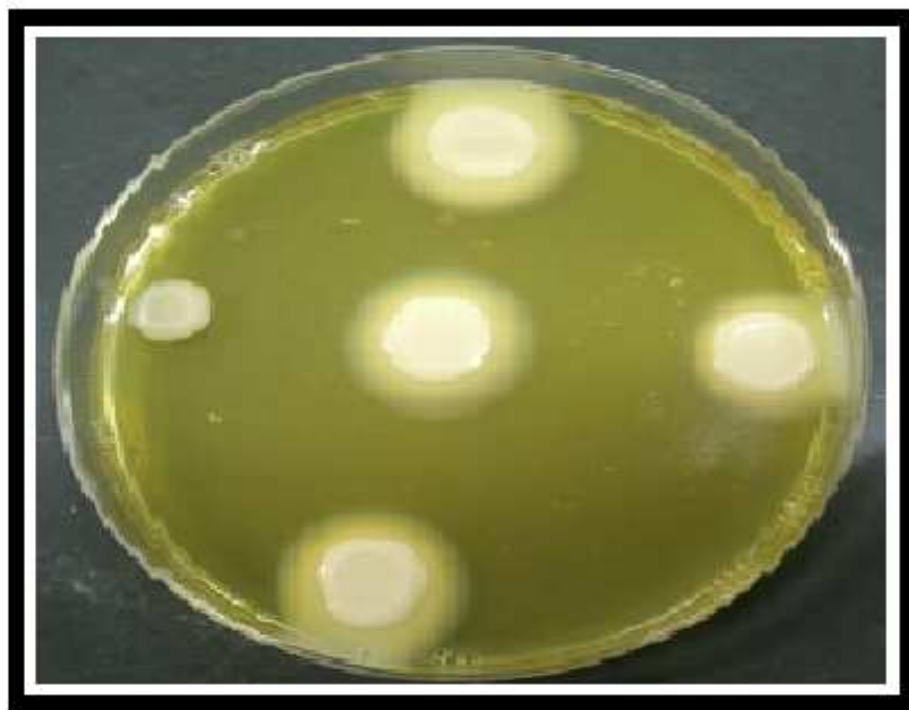
Ao comparar a produção de fosfolipase pelos isolados dos dois grupos não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$, teste do qui-quadrado).

Figura 6: Frequência das espécies de *Candida*, para atividade de fosfolipase, isoladas da cavidade bucal dos indivíduos pertencentes ao grupo de HIV negativos



Fonte: A autora.

Figura 7: Placa de ágar fosfolipase mostrando o crescimento de colônias de *Candida* spp. positivas para atividade de fosfolipase, após 4 dias de incubação à 30°C

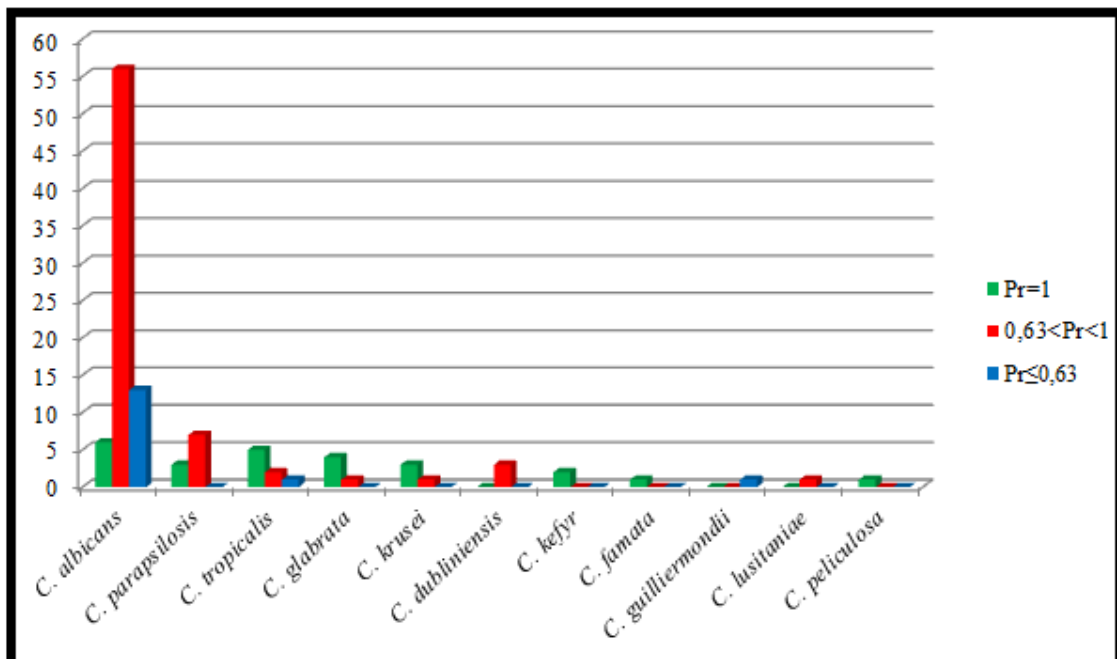


Fonte: A autora.

4.4.2 Proteinase

Em relação à produção da enzima proteinase, observou-se que 86 (77,5%) dos 111 isolados do grupo de pacientes apresentaram atividade proteolítica, dos quais 15 tiveram uma atividade acentuada ($Pz \leq 0,63$) e 71 atividade moderada ($0,63 < Pz < 1$). Os isolados que produziram a enzima em questão foram de *C. albicans* (92%), *C. parapsilosis* (70%), *C. tropicalis* (37,5%), *C. glabrata* (20%), *C. krusei* (25%), *C. dubliniensis* (100%), *C. guilliermondii* (100%) e *C. lusitaniae* (100%) (Figura 8).

Figura 8: Frequência das espécies de *Candida*, para atividade de proteinase, isoladas da cavidade bucal dos pacientes portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012

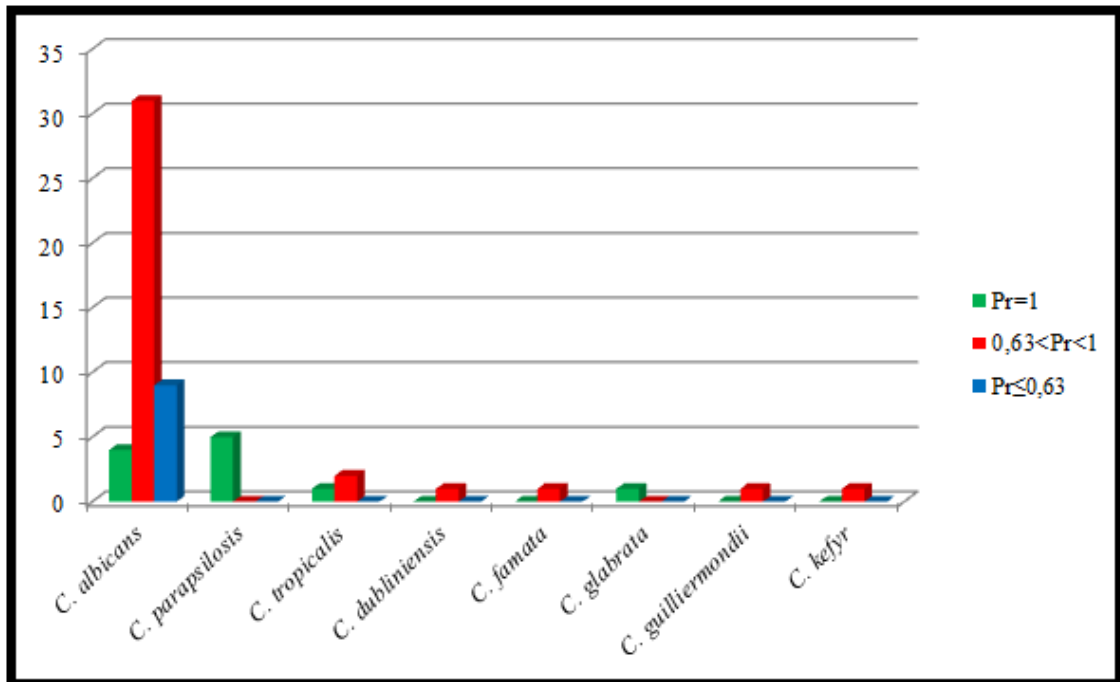


Fonte: A autora.

Em se tratando dos isolados do grupo de indivíduos não portadores do HIV, 46 (90,7%) isolados foram positivos para a produção de proteinase, sendo que em nove verificou-se uma atividade acentuada ($Pr \leq 0,63$) e nos outros 37 isolados, atividade proteolítica moderada ($0,63 < Pr < 1$). As espécies que produziram proteinase de modo moderado e/ou acentuado foram *C. albicans* (90,9%), *C. tropicalis* (66,6%), *C. dubliniensis* (100%), *C. famata* (100%), *C. guilliermondii* (100%), *C. kefyr* (100%) (Figura 9).

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando comparada a produção de proteinase pelos isolados dos dois grupos de estudo ($p>0,05$, teste do qui-quadrado).

Figura 9: Frequência das espécies de *Candida*, para atividade proteolítica, isoladas da cavidade bucal dos indivíduos pertencentes ao grupo de HIV negativos



Fonte: A autora.

Figura 10: Placa de ágar proteinase mostrando o crescimento de colônias de leveduras do gênero *Candida* spp. após sete dias de incubação à 30°C. O diâmetro da colônia e do halo proteolítico está representado por A e B, respectivamente

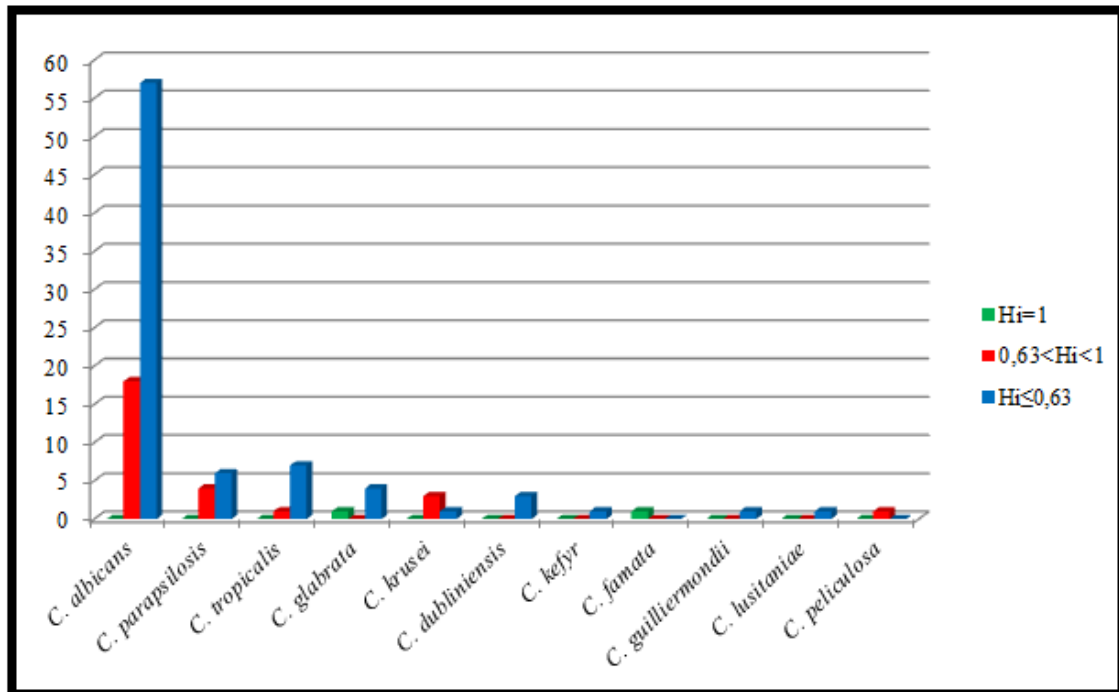


Fonte: A autora.

4.4.3 Hemolisina

A produção de hemolisina pelas espécies de *Candida* provenientes do grupo de indivíduos HIV positivos foi observada em 109 dos 111 isolados (98,2%), sendo que a maioria (81 isolados) apresentou atividade hemolítica acentuada ($H_i \leq 0,63$). Apenas em *C. famata* e em um isolado de *C. glabrata* não foi observada a produção de hemolisina (Figura 11).

Figura 11: Frequência das espécies de *Candida*, para produção de hemolisina, isoladas da cavidade bucal dos pacientes portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012

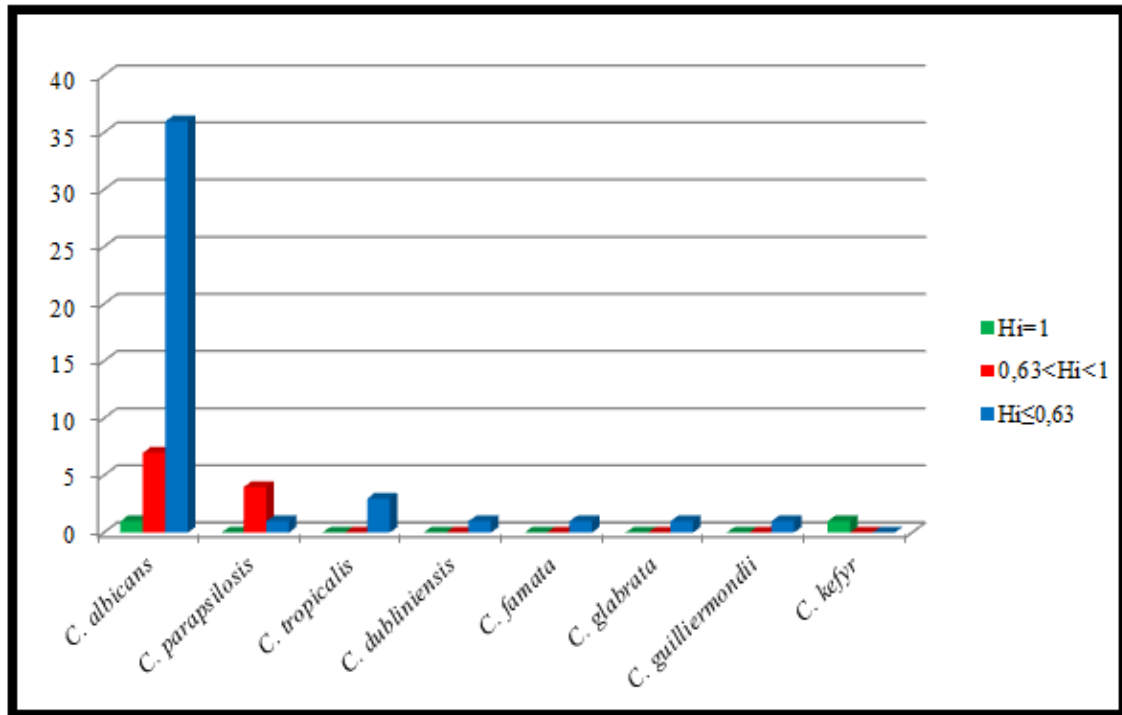


Fonte: A autora.

Em relação aos isolados oriundos do grupo de HIV negativos, verificou-se que 55 (96,5%) isolados apresentaram atividade hemolítica positiva, dos quais 44 tiveram uma atividade hemolítica acentuada ($Hi \leq 0,63$) e 11 atividade moderada ($0,63 < Hi < 1$). Apenas um isolado de *C. albicans* e *C. kefyr* foram negativos para atividade hemolítica (Figura 12).

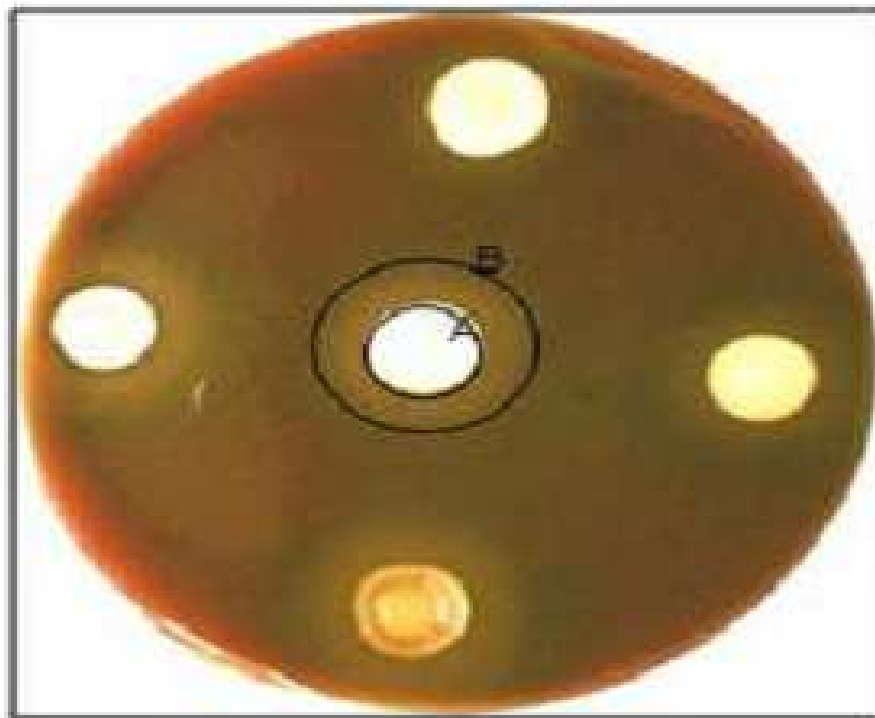
Assim como observado na produção das duas enzimas citadas anteriormente, não foi observada diferença estatística significativa entre os isolados de *Candida* spp. dos grupos de estudo, quando foi comparado a produção de hemolisina pelos mesmo ($p > 0,05$, teste do qui-quadrado).

Figura 12: Frequência das espécies de *Candida*, para atividade hemolítica, isoladas da cavidade bucal dos indivíduos pertencentes ao grupo de HIV negativos



Fonte: A autora.

Figura 13: Placa de ágar Saboraud Dextrose acrescido de 7% de sangue de carneiro evidenciando a atividade hemolítica por *Candida* spp. após 48 H de incubação à 30°C. A e B representam o diâmetro da colônia e o halo de hemólise, respectivamente

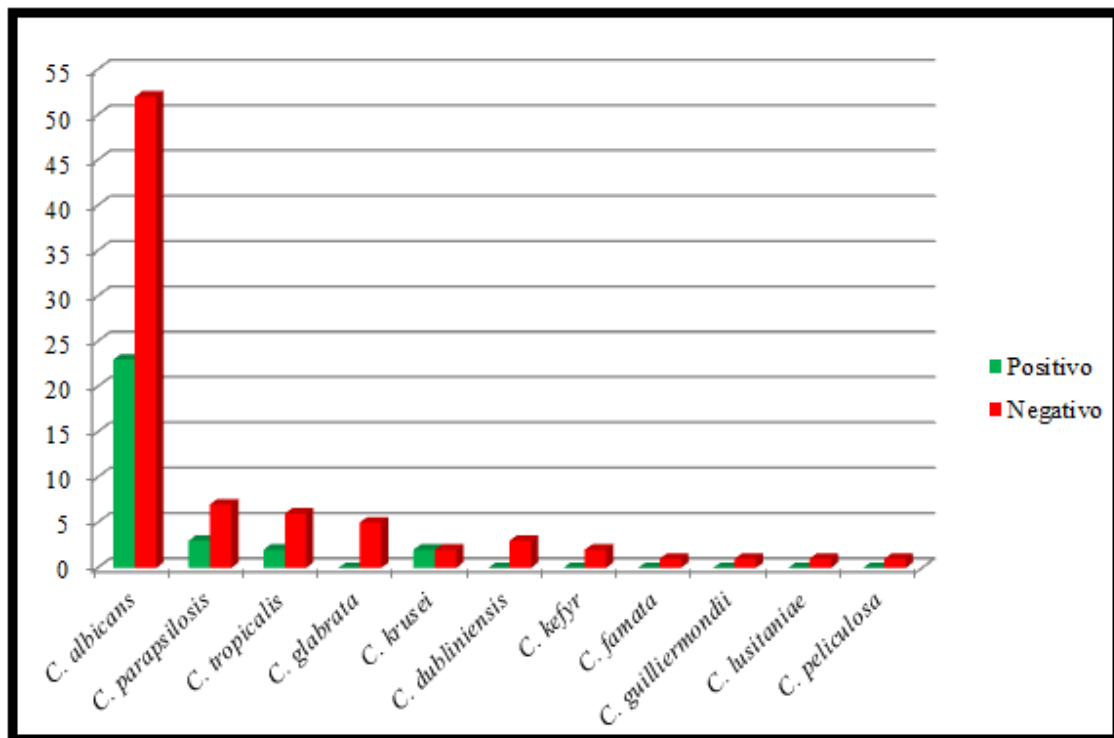


Fonte: A autora.

4.4.4 DNase

A atividade de DNase nas amostras do grupo de indivíduos portadores do HIV foi evidenciada em 30 (27%) dos 111 isolados, sendo que 23 eram *C. albicans*, 3 *C. parapsilosis*, 2 *C. tropicalis* e 2 *C. krusei* (Figura 14).

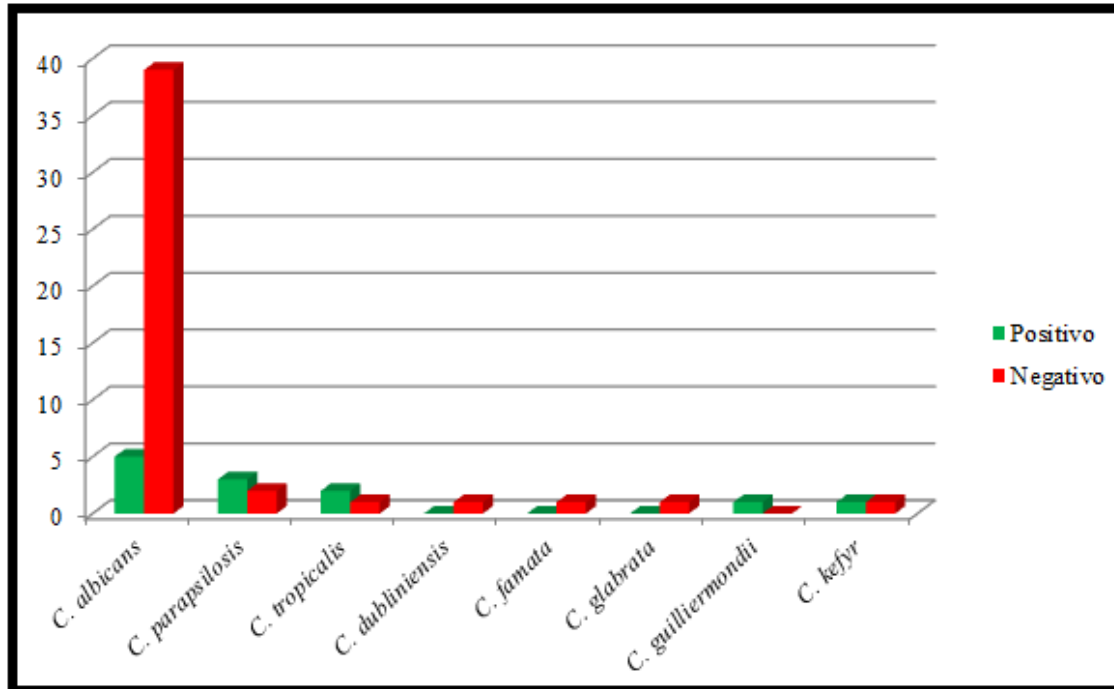
Figura 14: Frequência das espécies de *Candida*, para a atividade de DNase, isoladas da cavidade bucal dos pacientes portadores do HIV atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2012



Fonte: A autora.

Já no grupo de indivíduos HIV negativos, a atividade de DNase foi evidenciada em 12 (21%) dos 57 isolados, dos quais cinco eram de *C. albicans*, três de *C. parapsilosis*, dois de *C. tropicalis*, um de *C. guilliermondii* e um de *C. kefyr* (Figura 15).

Figura 15: Frequência das espécies de *Candida*, para atividade de DNase, isoladas da cavidade bucal dos indivíduos pertencentes ao grupo de HIV negativos



Fonte: A autora.

Diferentemente do observado na análise da produção das enzimas anteriores, quando foi comparado a atividade de DNase entre os isolados de *Candida* spp., observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os isolados de *C. albicans* provenientes das amostras de saliva dos pacientes HIV positivos e dos indivíduos HIV negativos ($p=0,0298$, teste do qui-quadrado). Diferença essa que não foi observada quando se comparou a atividade da enzima em questão entre as espécies não-*albicans* ($p>0,05$, teste do qui-quadrado).

5 DISCUSSÃO

A colonização persistente da cavidade oral por *Candida* spp. pode ser considerada um fator predisponente para o desenvolvimento de candidíase orofaríngea (FONG et al., 1997; ERKOSE; ERTURAN, 2007). Em portadores do HIV esse fato chama atenção, pois a incidência é elevada e pode ser um importante marcador da progressão da doença (AL-ABEID et al., 2004; BADIEE et al., 2010).

Neste estudo, a média de idade dos pacientes (44,7 anos) ficou acima da faixa etária com maior índice de diagnóstico de HIV no país, que é de 35 a 39 anos (RODERO et al., 2005; BRASIL, 2008). Porém, quando se observou a quantidade de homens e mulheres que participaram da pesquisa, verificou-se uma proporção de 1,3 homens para cada mulher, um pouco abaixo da média nacional que foi de 1,7, de acordo com o relatório do Ministério da Saúde em 2010 (BRASIL, 2012). Como os participantes do grupo de indivíduos HIV negativos foram escolhidos ao acaso, a idade média do grupo foi de 31,2 anos.

A colonização da cavidade oral *Candida* spp., bem como as espécies isoladas, pode variar de um estudo para o outro, uma vez que isso depende tanto da população estudada e da técnica de coleta utilizada, quanto das diferenças geográficas, climáticas e étnicas, podendo também variar de acordo com a idade, sendo que em crianças não portadoras do HIV essa porcentagem fica entre 45 e 65% enquanto nos adultos, na mesma condição, varia de 25 a 75% (FARAH et al., 2000; CAMPISI et al. 2002; LI et al., 2013). Neste estudo a taxa de colonização do grupo de indivíduos HIV negativos foi de 34%, resultado semelhante ao observado no estudo de Costa (2006), cuja frequência de colonização no grupo controle foi de 32%. Entretanto, essa porcentagem foi maior do que a encontrada por Li et al. (2013) na China, onde a frequência de indivíduos não infectados pelo HIV colonizados por espécies de *Candida* foi de 20,7%. Em um estudo semelhante realizado no México (SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2005a) com 51 adultos portadores do HIV e 109 pessoas não infectadas pelo mesmo vírus, foi encontrada uma taxa de colonização oral por *Candida* spp. no último grupo citado, igual à 61,5%, superior a observada neste trabalho.

No presente estudo, 60,5% das amostras de saliva apresentaram cultura positiva para leveduras do gênero *Candida*, taxa essa que é similar àquela encontrada nas regiões sul e sudeste do Brasil, em que *Candida* spp. foram isolados de 58 e 62% dos pacientes portadores HIV, respectivamente (CAMPISI et al., 2002; JUNQUEIRA et al., 2012). Entretanto, esse percentual de culturas positivas ainda é menor do que o observado em estudos realizados em outros países como México (66,7%), Turquia (82,8%), Argentina (72,3%) e Estados Unidos (81,8%) (SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2005a; ERKOSE e ERTURAN, 2007; LUQUE et al., 2008; PATEL et al., 2012).

A espécie predominante nas amostras de saliva estudadas de ambos os grupos foi *C. albicans*, com frequência igual a 67,6% no grupo de pacientes e 77,2% no grupo de indivíduos não portadores do HIV, a qual, em ambos os grupos, é superior ao observado por Junqueira et al. (2012) na cidade de São Paulo, Luque et al. (2008) na Argentina e Nweze e Ogbonnaya (2011) na Nigéria, que em seus estudos encontraram uma frequência de *C. albicans* oriundas de indivíduos infectados pelo HIV de 51,5%, 58,9% e 45%, respectivamente. Essa frequência de isolamento de *C. albicans* no grupo de HIV negativos é similar a observada por Luque et al. (2008), que foi de 74,4%. No entanto, Girish Kumar et al. (2008) encontraram uma porcentagem de 31,6% da espécie em questão, bem menor do que o observado neste trabalho. Esebelahie et al. (2013), em um estudo realizado na Nigéria, encontraram uma frequência de *C. albicans* superior a relatada aqui, sendo de 94,4%. Como já referenciado anteriormente, essa discrepância na frequência de isolados de *C. albicans* entre esses estudos, provavelmente se deve aos hábitos alimentares diferentes, à forma com que realizam a higiene bucal e ao clima de cada região.

Em relação às espécies não-*albicans*, elas somaram 32,4% do total de isolados no grupo de HIV positivos e 22,8% no grupo dos não portadores do HIV, sendo *C. parapsilosis*, seguido de *C. tropicalis* as mais comuns em ambos os grupos. Esse achado é maior do que o observado por Li et al. na China, 19,8% (2013) e Wingeter et al. (2007) no sul do Brasil, 7%. Entretanto, essa maior porcentagem de espécies diferentes de *C. albicans* confirma a tendência observada em outras pesquisas semelhantes, além de ter um efeito importante nas condutas clínicas, uma vez que algumas espécies não-*albicans* podem apresentar uma sensibilidade reduzida frente a alguns antifúngicos disponíveis para o tratamento de candidíase (ERKOSE; ERTURAN, 2007; MACÊDO et al., 2009).

A colonização concomitante por mais de uma espécie de *Candida* é algo que já foi relatado anteriormente (ERKOSE; ERTURAN, 2007; LUQUE et al., 2008; LI et al., 2013). No presente estudo, 22,5% dos pacientes estavam colonizados por pelo menos duas espécies, sendo que a associação predominante foi entre *C. albicans* e *C. parapsilosis* (30%). Este achado contraria o observado por Li et al. (2013), Junqueira et al. (2012) e por Luque et al. (2008) cuja associação predominante foi entre *C. albicans* e *C. glabrata*, sendo que no trabalho de Erköse e Erturan (2007) não foi isolado nenhuma *C. parapsilosis* das amostras incluídas no estudo. Em relação aos indivíduos HIV negativos essa situação foi observada em 11,7% dos colonizados, sendo a associação mais comum entre *C. albicans* e *C. tropicalis* (33,3%). Esse resultado é semelhante ao de Luque et al. (2008) e Costa (2006), cuja associação principal também foi entre *C. albicans* e *C. tropicalis*. No entanto, Esebelahie et al. (2013) não verificaram esse isolamento concomitante entre os indivíduos não portadores do HIV em seu estudo, enquanto Girish Kumar et al. (2008) isolou

mais de uma espécie do mesmo indivíduo não HIV em 3 dos 13 participantes colonizados. Provavelmente essa diferença na frequência de indivíduos colonizados por mais de uma espécie pode estar relacionado com a metodologia de coleta e identificação utilizada, meios de cultura utilizados para semear as amostras de saliva (se foi cromogênico ou não), uma vez que alguns métodos podem ser mais sensíveis permitindo a detecção e identificação de um maior número de espécies.

Quando analisada a concentração de leveduras na saliva, verificou-se que a média de $8,8 \times 10^3$ UFC/mL, entre os pacientes, encontrada neste estudo é maior do que a observada por Junqueira et al. (2012) em São Paulo (Brasil) e por Girish Kumar et al. (2008) no sul da Índia, cuja concentração de leveduras na saliva foi de $5,2 \times 10^3$ UFC/mL e 3×10^2 UFC/mL, respectivamente. Em relação aos indivíduos HIV negativos incluídos no estudo, a média de UFC foi de $9,8 \times 10^2$ UFC/mL, a qual também foi maior do que a observada por Girish Kumar et al. (2008), $9,3 \times 10^1$ UFC/mL, os quais realizaram suas pesquisas com *swab* da cavidade bucal e bochecho em soro fisiológico, respectivamente. A contagem de UFC/mL nas amostras do grupo de pacientes foi significativamente mais elevada que no grupo controle ($p < 0,05$) corroborando com Torres et al. (2003) e Costa (2006) que também utilizaram a mesma metodologia de coleta apresentada neste estudo. Apesar de não existir um consenso sobre um ponto de corte de UFC/mL que defina o indivíduo como sendo apenas colonizado pela levedura ou infectado, essa média mais elevada chama a atenção, pois de acordo com alguns autores, uma contagem superior a 4×10^3 UFC/mL pode ser considerado um indício de candidíase bucal (FARAH et al., 2000; COSTA, 2006). Essa discrepância na média de UFC/mL entre os diferentes estudos pode ser explicada pela metodologia de coleta da amostra de saliva utilizada em cada trabalho, visto que algumas são mais sensíveis do que outras (ERKOSE; ERTURAN, 2007).

Formas de redução da colonização podem contribuir com diminuição da incidência e gravidade de candidíase oral ou mesmo do risco de candidemia, daí a importância de analisar a presença de alguns fatores e hábitos dos indivíduos que podem propiciar uma colonização elevada e propor mudanças dos mesmos. Desse modo, ao analisar a presença de algumas condições nos indivíduos incluídos no estudo que poderiam ser considerados fatores predisponentes para a colonização da cavidade bucal por *Candida* spp. e, provavelmente, para o desenvolvimento de candidíase bucal, observou-se que o uso de antibióticos e de prótese dentária foram considerados fatores predisponentes para a colonização da cavidade bucal por espécies de *Candida* no grupo dos HIV positivos. Esses resultados confirmam os achados de Wu et al. (2012), que em estudo semelhante desenvolvido no Taiwan também observaram a relação entre esses fatores e a colonização bucal pelo gênero *Candida*. Tal relação se justifica pelo fato de que a administração

prolongada de antibióticos pode ocasionar um desequilíbrio na microbiota oral, permitindo, assim, uma proliferação de outros microrganismos ali presentes, como as leveduras do gênero *Candida* (CISTERNA et al., 2010). Já o uso de prótese oral é um fator importante para a colonização devido aos traumas que pode ocasionar na mucosa, quando não adaptadas de forma correta, e também devido à má higienização local, o que pode favorecer a expressão de fatores de patogenicidade, como a formação de biofilme (FALCÃO et al., 2004).

Assim como observado em outras pesquisas (ERKOSE, ERTURAN 2007; PATEL et al., 2012; LI et al., 2013), neste trabalho fatores como idade, sexo, histórico de candidíase bucal e tempo de infecção pelo HIV não apresentaram relação com a colonização da cavidade bucal por *Candida* spp. No caso dos indivíduos não portadores do HIV a presença dos fatores relacionados anteriormente não foi significativa para a colonização bucal por espécies de *Candida*, assim como observado por Sánchez-Vargas et al. (2005a) e Atique (2006).

Estudos que mostram a relação existente entre o uso de antirretrovirais e a diminuição da colonização bucal por *Candida* spp. ainda são escassos. Arribas et al. (2000) observaram uma redução da taxa de colonização bucal e ocorrência de candidíase bucal em indivíduos que faziam uso de algum inibidor de protease. No presente estudo, a frequência de indivíduos colonizados e não colonizados por *Candida* spp. não relacionou-se com a terapia HAART, corroborando com os achados de Gottfredsson et al. (1999), Erkose e Erturan (2007) e Patel et al. (2012) e contrariando os achados de Li et al. (2013), Yang et al. (2010), que observaram uma redução estatisticamente significativa na taxa de colonização bucal entre os indivíduos incluídos em seus estudos relacionado com o uso da HAART. Entretanto, quando foi analisada a relação dos diferentes esquemas terapêuticos, com diferentes classes de antirretrovirais, observou-se que o esquema que incluiu inibidores de transcriptase reversa combinados com inibidor de protease relacionou-se com maior frequência com os indivíduos colonizados, comparando com os indivíduos cujo esquema HAART incluiu apenas a combinação de inibidores de transcriptase reversa. Yang et al. (2010), observaram uma redução significativa na taxa de colonização bucal entre os indivíduos incluídos em seus estudos relacionado com o uso da HAART, sem no entanto relacionar com a classe de drogas utilizadas. A redução da frequência de indivíduos portadores do HIV colonizados também foi relatada por Wu et al. (2012), que mostrou redução da colonização bucal por leveduras do gênero *Candida* entre os indivíduos que faziam uso de apenas inibidores de transcriptase. Os possíveis mecanismos para a influência da terapia HAART sobre a colonização bucal por *Candida* spp. são desconhecidos. Entretanto, uma justificativa para essa relação entre o uso de inibidores de protease e uma maior incidência da colonização oral por espécies de *Candida*, pode ser o fato do maior comprometimento imunológico e maior tempo de infecção pelo HIV dos indivíduos em uso de

inibidores de protease no momento da coleta da amostra de saliva, já que o uso dessa classe de antirretrovirais somente é prescrita quando a combinação de outras classes de antirretrovirais foi ineficaz no combate à multiplicação viral e consequente controle da doença. Todavia, novos estudos mais abrangentes podem confirmar estes achados, e contribuir para elucidação dos possíveis mecanismos que interferem com a multiplicação e adesão dos microrganismos na superfície da cavidade bucal.

Estudos prévios se propuseram a verificar a relação existente entre a colonização da cavidade bucal por espécies de *Candida* com a contagem de linfócitos T CD4+ e com a carga viral (LUQUE et al., 2007; JUNQUEIRA et al., 2012; PATEL et al. 2012). Gottfredsson et al. (1999), observaram que a colonização da cavidade bucal apresentou uma correlação significativa com a contagem de linfócitos T CD4+ e com a carga viral. No presente estudo, quando analisou essa relação por faixas de células TCD4+ e carga viral observou-se um *p* valor bem próximo de 0,05 naqueles indivíduos com contagem de inferior a 200 cel/mm³ (linfócitos TCD4+). Isso sugere que se a amostra de indivíduos incluídos no estudo fosse um pouco maior, provavelmente seria encontrada alguma correlação entre a colonização da cavidade bucal por *Candida* spp. e a baixa contagem de linfócitos T CD4+, como foi observado por Fong et al. (1997) no Canadá e por Delgado et al. (2009) no Brasil.

Ao comparar a concentração de leveduras presentes na saliva dos indivíduos colonizados de acordo com a contagem de linfócitos TCD4+ e carga viral, observou-se que os pacientes com uma contagem menor de células TCD4+ apresentaram maior número de UFC/mL de saliva. Isso sugere que uma baixa contagem de CD4+ pode estar associada com uma maior concentração de leveduras na saliva de indivíduos portadores do HIV. Tal relação pode ser justificada pela hipótese de que a infecção pelo HIV pode não só comprometer a imunidade da mucosa bucal como ainda estimular a expressão de alguns fatores de patogenicidade das leveduras, já que, *in vitro*, observou-se que o HIV estimula a secreção da enzima protease por *C. albicans* (TOSUN et al., 2005). Entretanto, quando essa mesma comparação foi feita em relação à carga viral dos indivíduos estudados, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, talvez em virtude do número de indivíduos estudados ter sido insuficiente para comprovar essa relação. Na literatura não foram encontrados estudos que se propuseram a analisar a relação de concentração de leveduras na saliva com diferentes faixas de CD4+ e carga viral. Desse modo, para que essa relação seja comprovada faz-se necessária a realização de mais estudos.

Em relação a comparação das principais características do grupo portadores do HIV e de HIV negativos, observou-se diferença estatisticamente significativa nos quesitos: hábito de fumar, presença de comorbidades e uso de antibióticos antes ou durante o período em que a coleta das

amostras saliva foi realizada e média de UFC/mL, condições essas que foram observadas com maior frequência entre os indivíduos HIV positivos.

Essa diferença entre os dois grupos talvez possa ser justificada pelo menor nível socioeconômico e menor nível de escolaridade observado no grupo de indivíduos portadores do HIV, situação essa que pode dificultar o acesso as formas de prevenção e tratamento de comorbidades e a informações relevantes para saúde como, por exemplo, o quão prejudicial é fumar. Além do estado imunológico mais comprometido desses indivíduos, que os deixa mais vulnerável ao desenvolvimento de doenças, que, muitas vezes, pode resultar no uso prolongado de antibióticos, por exemplo, no tratamento de certas doenças.

5.1 Sensibilidade aos antifúngicos

Com o crescente número de casos de candidíase invasiva em pacientes com o sistema imune comprometido, tem aumentado o interesse tanto pelos antifúngicos, quanto pelos métodos de determinação do perfil de sensibilidade dos fungos a essas drogas, o que auxilia de forma significativa na escolha do melhor fármaco com ação antifúngica no tratamento dos pacientes em estado crítico de saúde (RODERO et al., 2005).

A falha na terapia antifúngica pode ocorrer em consequência da resistência do microrganismo frente ao medicamento, que pode ser intrínseca ou ter sido desenvolvida durante o tratamento, ou ainda ser consequência da resistência clínica, a qual pode estar relacionada com estado imunológico do indivíduo, farmacocinética do antifúngico, virulência do fungo e com a interação do microrganismo com o hospedeiro e com o medicamento (COSTA, 2006). Os métodos existentes para determinação da sensibilidade aos antifúngicos são: microdiluição em caldo, sistema comercial Etest, sistemas automatizados e técnica de difusão de disco em ágar, sendo que este último é considerado o método mais simples e mais econômico, todavia é ainda empregado com menor frequência nos laboratórios do Brasil (BRASIL, 2007).

Os antifúngicos mais utilizados no tratamento de infecções fúngicas invasivas são fluconazol, itraconazol e anfotericina B (MOEN et al., 2009), e mais recentemente as equinocandinas e voriconazol (TING; WALKER, 2008; WALSH; GAMALETSSOU, 2013). Assim como tem ocorrido com as bactérias, o uso indiscriminado dos antifúngicos tem impulsionado o surgimento de isolados fúngicos com baixa sensibilidade, ou até mesmo resistentes *in vitro*, principalmente entre as espécies do gênero *Candida* (BRION et al., 2007).

O fluconazol é a droga de primeira escolha no tratamento de grande parte das candidíases por ser de fácil administração e baixa toxicidade, especialmente a oral, forma que é utilizada como

profilático em indivíduos com AIDS (BADIEE et al., 2010). A sensibilidade reduzida ou até mesmo a resistência ao fluconazol por espécies de *Candida* em portadores do HIV ou AIDS já tem sido relatada por alguns autores, situação essa que muito provavelmente pode ter sido desencadeada pelo uso profilático do mesmo ou até mesmo do itraconazol (WINGETER et al., 2007; GOLDMAN et al., 2000). Entretanto, no presente estudo não foi encontrado nenhum isolado que apresentou resistência *in vitro* ao fluconazol, de modo que apenas isolados provenientes do grupo de pacientes apresentaram sensibilidade dose dependente em relação a esse antifúngico, sendo um de *C. albicans* e dois de *C. krusei*. Em um estudo semelhante realizado no sul do Brasil por Wingeter et al. (2007), observou-se que 86% dos 58 isolados de *Candida* spp. incluídos no estudo foram sensíveis ao fluconazol, pela metodologia de microdiluição. Badiee et al. (2010) verificaram em um estudo com isolados de *Candida* spp. provenientes da mucosa oral e vaginal que 10% de *C. albicans*, 17,4% de *C. krusei* e 4,5% de *C. dubliniensis* ofereceram resistência *in vitro* ao fluconazol também pelo método de microdiluição. Utilizando o kit Fungifast (Bio-Rad, France), Sánchez-Vargas et al. (2005b) em um estudo realizado no México com adultos e crianças infectados e não infectados pelo HIV, encontraram 3,2% das espécies de *Candida* isoladas resistentes ao antifúngico em questão. Na Itália, Barchiesi et al. (2002), verificaram que 7% das amostras de *Candida* spp., obtidas também da cavidade oral de portadores do HIV, apresentaram sensibilidade dose dependente ao azol em questão, pela técnica de microdiluição em caldo. Essa frequência de resistência *in vitro* ao fluconazol superior aquela observada no presente estudo, pode ser justificada pelas diferentes metodologias utilizadas na realização dos experimentos, já que essas, apesar de terem a mesma finalidade, apresentam sensibilidades diferentes.

Em relação ao itraconazol, que no início da década passada começou a ser utilizado no tratamento de infecções por *Candida* spp., principalmente em pacientes com neutropenia, por apresentar um espectro de ação semelhante ao do fluconazol, e por ser menos tóxico que anfotericina B (GAFTER-GVILI et al., 2008; MONDAL et al., 2004), e no caso da candidíase oral é considerado uma alternativa de tratamento quando o uso do fluconazol não apresenta resultados positivos, por ser ativo contra as formas de candidíase em mucosas (PAPPAS et al., 2003), a resistência *in vitro* foi encontrada no isolado de *C. peliculosa* e um de *C. glabrata*, ambos provenientes das amostras de saliva dos grupo de portadores do HIV. Entretanto, uma porcentagem relevante das amostras estudadas (50,4% dos isolados dos pacientes e 77,2% das amostras do grupo de HIV negativos) apresentou sensibilidade intermediária, contrariando os achados de Luque et al. (2008), que das 42 amostras de *Candida* spp. estudadas, observaram que 10 foram resistentes *in vitro* e 8 apresentaram sensibilidade intermediária ao itraconazol. Sánchez-Vargas et al. (2005b), verificaram em seu trabalho que 28,9% dos isolados de *Candida* spp. apresentaram sensibilidade

intermediária ao antifúngico em questão. Li et al. (2013) verificaram em seu estudo que 13,8% e 12,8% dos isolados do indivíduos HIV positivos e do grupo de não portadores do vírus, respectivamente, foram resistentes *in vitro*, pela metodologia de microdiluição em caldo, ao itraconazol, resultado esse que é superior ao observado neste trabalho. Essa diferença de sensibilidade ainda não tem causas conhecidas, porém alguns autores sugerem que a variação na distribuição das espécies pode explicar esse fato (PFALLER; DIEKEMA, 2007), todavia pode ser também devido ao fato de não haver pontos de corte definidos para este antifúngico, como pode ser observado nos documentos de referência oficiais (CLSI, 2009).

Em relação ao voriconazol, que é um antifúngico pertencente à classe dos azóis relativamente novo no mercado, observou-se que todos os isolados estudados foram sensíveis, achado esse que é maior do que o observado por Wu et al. (2012) em um estudo semelhante com 241 isolados provenientes de 193 portadores do HIV em Taiwan, das quais 97,9% também apresentaram sensibilidade ao medicamento em questão. Entretanto, Favalessa et al. (2010), em estudo no Mato Grosso, encontraram uma porcentagem de leveduras do gênero *Candida* resistentes ao voriconazol bem maior, sendo essa igual a 50% para *C. tropicalis* e 25,9% para os isolados de *C. albicans*. Em uma pesquisa desenvolvida na Nigéria por Nweza e Ogbonnaya (2011) também envolvendo amostras de *Candida* spp. provenientes da cavidade oral de indivíduos HIV positivos, apenas 2 dos 114 isolados estudados, um de *C. albicans* e outro de *C. tropicalis*, apresentaram resistência *in vitro* ao voriconazol.

A anfotericina B é considerada o antifúngico padrão ouro para o tratamento de infecções fúngicas disseminadas, em virtude do seu espectro de ação ser grande e por existir raros relatos de resistência (ESPINEL-INGROFF, 2000). Neste estudo, 6,7% de *C. albicans*, proveniente do grupo de indivíduos portadores do HIV apresentou resistência *in vitro* a este antifúngico. Favalessa et al. (2010), observaram em um estudo com isolados do gênero *Candida* provenientes de vários sítios orgânicos de indivíduos HIV positivos atendidos em diferentes hospitais da capital do Mato Grosso, que 1,2% das amostras de *C. albicans* foram resistentes *in vitro* à anfotericina B, além de 12,5% dos isolados de *C. parapsilosis* e 75% de *C. krusei*. Junqueira et al. (2012), também utilizando a metodologia de microdiluição em calda, encontrou em seu estudo que 93,75% dos 64 isolados foram sensíveis à anfotericina B. Wingeter et al. (2007), encontraram em estudo na região sul do Brasil, apenas 2, dos 57 isolados, testados resistentes á anfotericina B. Badiee et al. (2010), em um estudo realizado no Irã, verificou que todas as amostras de *Candida* spp. estudadas foram sensíveis ao antifúngico em questão. Em um trabalho semelhante no Taiwan (YANG et al., 2010)

foi encontrado, após 24 horas de incubação, sensibilidade à anfotericina B por 97,9% dos isolados estudados.

Em relação à nistatina, que possui o mesmo mecanismo de ação que a anfotericina B, quase não há relatos de resistência na literatura. No presente estudo, todas as amostras de *Candida* spp. foram sensíveis *in vitro* a este antifúngico. Resultado semelhante foi observado no estudo de Badiee et al. (2010) no qual todos os 234 isolados, provenientes de mucosa oral e vaginal de portadores do HIV, apresentaram sensibilidade *in vitro* ao antifúngico em questão. O mesmo resultado foi encontrado na pesquisa de Hamza et al. (2008) na Tanzânia, com 293 isolados de *Candida* spp. oriundos também da cavidade oral de portadores do HIV. Sensibilidade inferior a essa, foi encontrada por Wingeter et al. (2007), onde 95% dos 58 isolados estudados foram sensíveis *in vitro* à nistatina.

É bom lembrar que a metodologia de difusão de disco em ágar utilizada neste trabalho foi publicada há pouco tempo pelo CLSI e, portanto, são poucos ainda os estudos que correlacionam os resultados *in vitro* com as respostas clínicas. Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo não podem ser aplicados diretamente como um guia no tratamento antifúngico de pacientes com candidíase oral no hospital envolvido. Entretanto, por ser uma técnica simples e menos dispendiosa que as outras existentes, ela pode ser considerada uma ferramenta importante na avaliação do comportamento das várias espécies de *Candida* frente aos antifúngicos (fluconazol e voriconazol, os quais têm pontos de corte definidos) nos programas de vigilância epidemiológica existentes.

5.2 Atividade enzimática

Nos últimos anos, houve um aumento no número de pesquisas sobre os fatores de virulência dos fungos, com intuito de entender melhor os mecanismos de invasão e evasão do sistema de defesa do hospedeiro (MACÊDO et al., 2009).

A produção de enzimas e a ação delas estão diretamente relacionadas com a virulência e com a capacidade do fungo desencadear algum tipo de infecção (D'EÇA et al., 2011). Isso, porque uma vez aderida às células do hospedeiro, a liberação dessas enzimas pelo microrganismo em questão provocam alterações na permeabilidade celular ou na cadeia de transporte de íons, permitindo assim a invasão e alteração no metabolismo celular do hospedeiro (GHANNOUM; ABU-ELTEEN, 1990). A produção dessas enzimas pode ser observada em isolados de *Candida* spp., sendo as mais estudadas fosfolipase e proteinase, entretanto leveduras pertencentes a este gênero também podem produzir hemolisina e DNase, relato das quais ainda são escassos na literatura. A expressão dos fatores de virulência pelo gênero *Candida* pode variar de acordo com a espécie, com o sítio onde a

infecção está instalada e com a resposta imunológica do hospedeiro, o que muitas vezes pode explicar a discrepância dos resultados observados entre estudos de várias regiões do mundo (MARIJA; BOKOR-BRATIÉ, 2008).

Observou-se produção de fosfolipase por 98,7% e 91% de *C. albicans* provenientes das amostras de saliva do grupo de pacientes e indivíduos HIV negativos, respectivamente. Essa porcentagem é um pouco menor do que o observado por de Costa et al. (2006) e Junqueira et al. (2012), os quais, em estudo semelhante, observaram a produção da enzima em questão por todos os isolados de *C. albicans*. Entretanto, Ying e Chunyang (2011) observaram a produção de fosfolipase em 80% dos isolados testados de *C. albicans*.

A produção de fosfolipase por isolados não-*albicans* contraria a hipótese de que essa enzima estaria localizada na extremidade do tubo germinativo, sendo sua produção restrita a *C. albicans* (NIEWRTH; KORTING, 2001). Neste estudo também foi observada a atividade de fosfolipase por isolados de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. guiliermondii* provenientes do grupo de indivíduos portadores do HIV, e por *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. famata* obtidas das amostras de saliva do grupo de HIV negativos. Esse resultado corrobora os achados de D' Eça et al. (2011), que também observaram a atividade de fosfolipase por espécies não-*albicans* provenientes de vários sítios orgânicos, sendo *C. tropicalis* a espécie com o maior número de isolados positivos para fosfolipase. Junqueira et al. (2012) em um estudo com isolados provenientes da cavidade oral de portadores do HIV atendidos em um hospital do estado de São Paulo, também observou a produção de fosfolipase por *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Mane et al. (2011) observaram, em um estudo também com isolados oriundos da cavidade oral, que 59% das espécies de *Candida* foram positivos para atividade de fosfolipase. Contrariando os resultados do presente trabalho, Costa et al. (2006) e Candido et al. (2000) não observaram em seus estudos a produção da enzima em questão por isolados não-*albicans*. Essa divergência de resultados pode ser em virtude da variação genética dos isolados oriundos de diferentes regiões (GHANNOUM, 2000).

A produção elevada de fosfolipase está diretamente relacionada com uma maior virulência da levedura (IVANOVSKA, 2003). Por isso, comparou-se a produção dessa enzima entre os isolados provenientes dos 2 grupos de estudo e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. Isso, talvez se deva a técnica empregada no estudo, já que a gema de ovo pode servir de substrato para ação tanto de fosfolipases quanto de lipases (COSTA, 2006).

Por degradar substratos importantes como albumina, imunoglobulinas e proteínas da pele e mucosas, a produção de proteinase é um fator de virulência importante das leveduras isoladas de mucosas (JUNQUEIRA et al. 2012; HÖFLING et al., 2011; JAYATILAKE et al., 2005). A atividade de proteinase foi detectada na maioria dos isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C.*

tropicalis, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. guilliermondii* e *C. kefyr* provenientes dos dois grupos de estudo. Junqueira et al. (2012) observou atividade proteínase em todos os isolados de cavidade oral de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*, concordando com os achados deste estudo, entretanto, esse mesmo grupo de pesquisadores não observaram em produção de proteínase por *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. Sardi et al. (2013), estudaram somente isolados de *C. albicans* e todas foram capazes de produzir proteínase. Diferentemente do observado neste trabalho, Branco et al. (2012), em um estudo também com leveduras provenientes da cavidade oral, não verificaram atividade proteínase por isolados de *C. glabrata* e *C. krusei*.

Ao comparar a atividade de proteolítica entre os dois grupos de estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa. Talvez a produção da enzima proteínase tenha sido semelhante entre os isolados de ambos os grupos em virtude dos alimentos ingeridos pelos indivíduos pertencentes aos grupos serem semelhantes. Isso, porque uma dieta rica em carboidratos pode deixar o pH bucal menor, o que propicia a produção de proteínase por *Candida* spp. (WU; SAMARANAYAKE, 1999).

Os estudos sobre a atividade hemolítica por espécies de *Candida* ainda são recentes, sendo que pouco se sabe sobre a produção desse fator de virulência nas leveduras desse gênero (FAVERO et al., 2013). Manns et al. (1994) foram os primeiros a observarem a presença de atividade hemolítica em *C. albicans*. Luo et al. (2001) foram os primeiros pesquisadores a estudarem a presença de atividade hemolítica em isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Tem sido considerado que a produção de hemolisina por *Candida* spp. é um fator inerente desencadeado em condições específicas (FAVERO et al., 2011; LUO et al., 2001). A maior parte dos isolados de *Candida* spp. estudados foram positivos para a produção de hemolisina, corroborando com os achados de Mane et al. (2011), que em um estudo com isolados provenientes da cavidade oral de portadores do HIV verificou que todos eles foram positivos para atividade hemolítica. Do mesmo modo, Tsang et al. (2007), em um estudo com isolados da cavidade oral de indivíduos com diabetes tipo 2, observaram que a maioria desses isolados apresentaram atividade hemolítica.

Contrariando os achados deste estudo, França et al. (2010) observaram que a espécie com maior número de isolados produtores de hemólise foi *C. tropicalis*. Rorig et al. (2009) observaram atividade hemolítica somente em *C. parapsilosis* e *C. albicans*. Luo et al. (2001) não observaram atividade hemolítica em isolados de *C. parapsilosis*, descrevendo atividade hemolítica em *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis*.

A diferença na frequência de espécies de *Candida* que produzem hemólise pode ser justificada pela relativa dificuldade em quantificar a atividade hemolítica, já que são utilizadas

diferentes definições ou interpretações para os índices hemolíticos. No presente trabalho, foi seguido um modelo de atividade, que embora aleatório, permitirá comparação com resultados de futuros estudos. O índice adotado segue um modelo proposto por Price et al. (1982), utilizado para expressar a atividade de fosfolipase em ágar, que, no entanto, fornece um modelo de índice e escore prático e fácil de ser aplicado.

A atividade de DNase é um fator de virulência já conhecido e estudado entre algumas espécies de bactérias, como por exemplo, o gênero *Staphylococcus* (SÁNCHEZ; COLOM, 2010). Entretanto, entre as leveduras é bastante escasso o número de estudos voltados para a produção de DNase, sendo que na literatura não foi encontrado nenhum trabalho que avaliou a produção de DNase por espécies de *Candida*. Neste estudo, isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr* e *C. krusei* apresentaram atividade DNase positiva.

Sánchez e Colom (2010) observou a produção de DNase em isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus Gatti*, sendo que todos os isolados apresentaram atividade DNase, sendo os isolados clínicos de *C. neoformans* os que produziram a enzima em questão com mais frequência. Cazin et al. (1969) observou que a capacidade de produzir DNase é uma característica do gênero *Cryptococcus* já que todos os isolados expressaram essa atividade.

A atividade de DNase não tem sido descrita para a maioria dos isolados fúngicos. Todavia, como foi observado, uma quantidade significativa do isolados de *Candida* spp. analisados neste estudo apresentaram, em maior ou menor frequência, atividade da referida enzima. Talvez a escassez de relatos se dê em virtude da dificuldade de ser mostrada a atividade da enzima, uma vez que a metodologia requer tempo prolongado de incubação, e assiduidade técnica na observação do resultado, motivo pelo qual os resultados foram expressos em positivos e negativos, e não quantificados ou semi-quantificados, como foi feito com a produção de proteinase, fosfolipase e atividade hemolítica. A análise de maior número de isolados de cada espécie poderá mostrar melhor a distribuição de frequência de isolados por espécie produtoras de enzima. Para isso, cuidados na interpretação dos resultados dos testes, ou talvez a padronização e aperfeiçoamento de uma técnica com sensibilidade e condições adequadas de incubação sejam necessários para que resultados reprodutivos e confiáveis para diferentes estudos, e com isolados de diferentes origens, possam ser comparados.

Ao comparar a produção de DNase entre os isolados dos dois grupos de estudo observou-se diferença estatisticamente significativa. A justificativa para tal diferença não é conhecida, sendo necessários mais estudos sobre como ocorre e em quais condições a produção da mesma é estimulada.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu conhecer as principais espécies de *Candida* spp. que colonizam a cavidade oral dos pacientes HIV positivos atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do HC-UFU e de um grupo de indivíduos não portadores do HIV.

E ainda, foi possível concluir que:

- 1) A maioria dos pacientes participantes da pesquisa estava colonizada por pelo menos uma espécie de *Candida*, diferentemente do observado no grupo dos HIV negativos;
- 2) A espécie mais frequente em ambos os grupos foi *C. albicans*;
- 3) O uso de antibióticos e de prótese dentária estão diretamente relacionados com a colonização bucal por *Candida* spp. entre os indivíduos portadores do HIV;
- 4) O uso da HAART não teve influência na redução da colonização bucal;
- 5) Uma baixa contagem de linfócitos TCD4+ parece estar relacionada com uma maior concentração de leveduras presentes na saliva dos portadores do HIV;
- 6) A contagem de UFC/mL foi bem maior entre os portadores do HIV;
- 7) Os antifúngicos nistatina, voriconazol e anfotericina B apresentaram o maior número de amostras de *Candida* spp. sensíveis em ambos os grupos, seguidos pelo fluconazol e itraconazol;
- 8) A maioria das espécies estudadas de ambos os grupos apresentaram atividades de fosfolipase, de proteinase e hemolítica positivas;
- 9) Houve diferença estatisticamente significativa na atividade da enzima DNase entre as leveduras isoladas do grupo de pacientes e do grupo de indivíduos HIV negativos, entretanto essa diferença não foi observada para as atividades de fosfolipase, proteinase e hemolítica.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA C. Anidulafungina. Actualización microbiológica y clínica. **Drugs today**, v. 44, n. 2, p. 3S-25S, 2008.
- AL-ABEID, H. M. et al. Isolation and characterization of *Candida* spp. in Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. **Jpn J Infect Dis**, Tokio, v. 57, n. 6, p. 279-284, Dec 2004.
- AL MOSAID, A.; SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. C. Differentiation of *Candida dubliniensis* of *Candida albicans* on Pal's agar. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 41, n. 10, p. 4787-4789, Oct 2003.
- ALEXANDER, B. D. et al. Comparative evaluation of Etest and sensititre yeastone panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. **J Clin Microbiol**, Bethesda, v. 45, n. 3, p. 698-706, Mar 2007.
- ALONSO-VALLE, H. et al. Candidemia in tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. **Eur Clin Microbiol Infect Dis**, Berlin, v. 22, n. 4, p. 254-257, Mar 2003.
- ALVES, I. A.; CAMARGO, F. P.; GOULART, L. S. Identification by PCR and antifungal susceptibility of vaginal clinical *Candida* sp. Isolates. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 43, n. 5, p. 575-579, Sep-Oct 2010.
- AKDENIZ, B. G. et al. Prevalence of *Candida albicans* in oral cavities and root canals of children. **ASDC J Dent Child**, Chicago, v. 69, n. 3, p. 289-292, Sep-Dec. 2002.
- AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgrad Med J**, London, v. 78, n. 922, p. 455-459, Aug 2002.
- ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. **J Antimicrob Chemother**, Washington, v. 44, n. 2, p. 151-162, Aug 1999.
- AQUINO, V. R. et al. Prevalence, susceptibility profile for Fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, Salvador, v. 9, n. 5, p. 411-418, Oct 2005.
- ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Med Mycol**, Oxford, v. 45, n. 7, p. 569-587, Nov 2007.
- ARRIBAS, J. R. et al. Impact of protease inhibitor therapy on HIV-related oropharyngeal candidiasis. **AIDS**, London, v. 14, n. 8, p. 979-985, May 2000.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J. Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between *in vitro* antifungal susceptibility test results and *in vivo* outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiases. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 44, n. 8, p. 2081-2085, Aug 2000.

- ATIQUÊ, T. S. C. **Pesquisa de espécies e sensibilidade antifúngica de *Candida* sp. em indivíduos soropositivos para o HIV.** 2006. 154f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, 2006.
- BACELO, K. L. et al. Biotype stability of *Candida albicans* isolates after culture storage determined by randomly amplified polymorphic DNA and phenotypical methods. **Mycoses**, Berlin, v. 53, n. 6, p. 468-474, Nov 2010.
- BADIEE, P. et al. Distributions and antifungal susceptibility of *Candida* species from mucosal sites in HIV positive patients. **Arch Iran Med**, Tehran, v. 13, n. 4, p. 282-287, Jul 2010.
- BARCHIESI, F. et al. DNA subtypes and fluconazole susceptibilities of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of patients with AIDS. **Clin Infect Dis**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 634-40, Mar 1995.
- BARCHIESI, F. et al. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 44, n. 6, p. 1578-1584, Jun 2000.
- BARCHIESI, F. et al. Point prevalence, microbiology and fluconazole susceptibility patterns of yeast isolates colonizing the oral cavities of HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. **J Antimicrob Chemother**, London, v. 50, n. 6, p. 999-1002, Dec 2002.
- BLUMBERG, H. M. et al. Risk factors for candidal blood stream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey, **Clin Infect Dis**, Washington, v. 2, n. 33, p. 177-186, Jun 2001.
- BRANCO, P. V. G. C. et al. Prevalência e produção de exoenzimas por espécies de *Candida* provenientes da mucosa bucal de pacientes com AIDS e indivíduos hígidos. **Rev Patol Trop**, Goiânia, v. 41, n. 4, p.427-441, Oct 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monitoramento e prevenção da resistência microbiana em serviços de saúde. Relatório anual de 2006 – Termo de Cooperação 37 (TC-37) entre Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em parceria com a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS/MS); 2007. 29p. il. - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Prevenção na Rede. Fórum Virtual sobre DST/AIDS. Boletim Epidemiológico Aids/DST, 2012. Disponível em: <http://www.sistemas.aids.gov.br/forumprevencao_final/index.php?q=numeros-da-aids-no-brasil>. Acessado em: 29 de setembro de 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Antirretrovirais utilizados, 2013. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/quais-sao-os-antirretrovirais>>. Acessado em 12 de setembro e 2013. a
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Aids no Brasil, 2013. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/aids-no-brasil>>. Acessado em 02 de outubro de 2013. b
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Aids no Brasil, 2013. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/infecoes-opportunistas>>. Acessado em 26 de novembro de 2013. c

- BRION, L. P.; UKO, S. E.; GOLDMAN, D. L. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: systematic review. **J Infect**, London, v. 54, n. 6, p. 521-529, Jun 2007.
- BROOKS, G. F. et al. AIDS and lentivirus. In: WEITZ M., LEBOWITZ, H. (editores). **Medical Microbiology**. 25th ed. New York: McGraw-Hill, 2010, p. 609-622.
- BURGESS, D. S. Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole and amphotericin B against *Candida albicans*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, New York, v. 36, n. 1, p. 13-18, Jan 2000.
- CAMPISI, G. et al. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 93, n. 3, p. 281-286, Mar 2002.
- CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V.; KOMESU, M. C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas de cavidade bucal. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba, v. 33, n. 5, p. 437-442, Sep-Oct 2000.
- CANTÓN, E.; VIUDES, A.; PEMÁN, J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v. 18, n. 2, p. 51-55, Jun 2001.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **J Infect Dis**, Oxford, v. 184, n. 3, p. 337-344, Jun 2001.
- CASSONE, A. et al. *In vitro* and *in vivo* anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. **J Infect Dis**, Oxford, v. 180, n. 2, p. 448-453, Aug 1999.
- CAZIN, J.J.; KOZEL, T.R.; LUPAN, D.M. Extracellular deoxyribonuclease production by yeasts. **J Bacteriol**, Washington, v. 100, n. 2, p. 760-762, Nov 1969.
- CECON. Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda. Bula dos discos de antifúngicos itraconazol, fluconazol e anfotericina B. São Paulo: Cecon, 2010.
- CISTERNA, R. et al. Nationwide sentinel surveillance of bloodstream *Candida* infections in 40 tertiary care hospitals in Spain. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 48, n. 11, p. 4200-4206, Nov 2010.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2004. Reference method for disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved standard M-44A. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pennsylvania, USA 2004.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2009. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Guideline – Second Edition. CLSI document M44-A2. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, Wayne, Pennsylvania, USA 2009.
- COLLINS, C. D.; COOKINHAM, S.; SMITH, J. Management of oropharyngeal **candidiasis** with localized oral miconazole therapy: efficacy, safety, and patient acceptability. **Patient Pref Adherence**, Auckland, v. 5, p. 369-374, Jul 2011.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 36, n. 5, p. 599-607, Sep-Oct 2003.

- COSTA, K. R. C. **Isolamento, quantificação, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras da saliva de indivíduos imunocompetentes portadores de lesão bucal.** 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2006.
- D'ÊÇA JÚNIOR, A. D. E. et al. *In vitro* differential activity of phospholipase and acid proteinase of clinical isolates of *Candida*. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v.44, n. 3, p.334-338, May-Jun 2011.
- DEEKS, S. G. et al. HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians. **JAMA**, Chicago, v. 277, n. 2, p. 145-153, Jan 1997.
- DELGADO, A. C. et al. Clinical and microbiological assessment of patients with a long-term diagnosis of human immunodeficiency virus infection and *Candida* oral colonization. **Clin Microbiol Infect**, v. Oxford, 15, n. 4, p. 364-371, Apr 2009.
- DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 20, n. 6, p. 412-418, Dec 2002.
- DIEZMANN, S. et al. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 42, n. 12, p. 5624-5635, Dec 2004.
- DIZ DIOS, P. et al. Changes in oropharyngeal colonization and infection by *Candida albicans* in human immunodeficiency virus infected patients. **J Infect Dis**, Oxford, v. 183, n. 2, p. 355-356, Jan 2001.
- EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infect Dis**, London, v. 3, n. 11, p. 685-702, Nov. 2003.
- ERKÖSE, G.; ERTURAN, Z.
Oral *Candida* colonization of human immunodeficiency virus infected subjects in Turkey and its relation with viral load and CD4+ T-lymphocyte count. **Mycoses**, Berlin, v. 50, n. 6, p. 485-490, Nov 2007.
- ESEBELAHIE, N. O.; ENWEANI, I. B; OMOREGIE, R. *Candida* colonisation in asymptomatic HIV patients attending a tertiary hospital in Benin City, Nigeria. **Libyan J Med.**, Sweden, v. 8, n. 18, p. 203-22, Mar 2013.
- ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 36, n. 10, p. 2950-2956, Oct 1998.
- ESPINEL-INGROFF, A. et al. Comparison of visual 24-hour and spectrophotometric 48-hour MICs to CLSI reference microdilution MICs of fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole for *Candida* sp.: a collaborative study. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 43, n. 9, p. 4535-4540, Sep 2005.
- ESTRADA-BARRAZA, D. et al. Comparación entre métodos convencionales, chromAgar *Candida* y el método de la PCR para identificación de especies de *Candida* em aislamientos clínicos. **Rev Iberoam Micol**, Madrid, v. 28, n. 1, p. 36-42, Jan-Mar 2011.

- FALCÃO, A. F. P.; SANTOS, L. B.; SAMPAIO, N. M. Candidiase associada à próteses dentária. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 30, p. 135-146, Jun 2004.
- FARAH, C. S.; ASHMAN, R. B.; CHALLACOMBE, S. J. Oral Candidoses. **Clin Dermatol**, Amsterdam, v. 18, p. 553-62, 2000.
- FAVALESSA, O. C.; MARTINS MDOS, A.; HAHN, R. C. Mycological aspects and susceptibility in vitro the yeast of the genus *Candida* from HIV-positive patients in the State of Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba, v. 43, n. 6, p. 673-677, Nov 2010.
- FAVERO, D. et al. Hemolytic factor production by clinical isolates of *Candida* species. **Curr Microbiol**, New York, *online*, Sep 2013.
- FAVERO, D. et al. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Mycoses**, Berlin, v. 54, n. 6, p. 816-820, Nov 2011.
- FERNANDES, R.; VIEGAS, A.; CERQUEIRA, F.. *Candida* species distribution in clinical samples. **Rev Faculdade Ciências Saúde**, Porto. Edições Universidade Fernando Pessoa, p. 264-271, 2009.
- FONG, I. W.; LAUREL, M.; BURFORD-MASON, A. Asymptomatic oral carriage of *Candida albicans* in patients with HIV infection. **Clin Invest Med**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 85-93, Apr 1997.
- FONSECA, J. B. **Candidíase: Aspectos de interesse odontológico**. Candidíase. 1. ed., São Paulo: Edusp., 1980.
- FOTOS, P. G.; HELLSTEIN, J. W. *Candida* and candidosis. Epidemiology, diagnosis, and therapeutic management. **Dent Clin North Am.**, Philadelphia, v. 36, n. 4, p. 857-878, Oct. 1992.
- FRANÇA, E. J. G. et al. Hemolysis produced by *Candida tropicalis* isolates from clinical samples. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 43, n. 3, p. 318-321, May-Jun 2010.
- FREYDIÈRE, A.; GUINET, R. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v. 14, n. 3, p. 85-89, Sep 1997.
- GAFTER-GVILI, A. et al. Treatment of invasive candidal infections: systematic review and meta-analysis. **Mayo Clin Proc**, Rochester, v. 83, n. 9, p. 1011-1021, Sep 2008.
- GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 13, n. 1, p. 122-143, Jan 2000.
- GHANNOUM, M. A.; ABU-ELTEEN, K. H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, Berlin, v. 33, n. 6, p. 265-282, Jun 1990.
- GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Phisiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 225-234, Jun 2010.
- GIRISH KUMAR, C. P. et al. Carriage of *Candida* species in oral cavities of HIV infected patients in South India. **Mycoses**, Berlin, v. 52, n. 1, p. 44-48, Jan 2009.
- GIRMENIA, C. et al. *In vitro* activity of fluconazole and voriconazole against isolates of *Candida albicans* from patients with haematological malignancies. **J Antimicrob Chemother**, Washington, v. 46, n. 3, p. 479-483, Sep 2000.

- GOLDMAN, M. et al. Does long-term itraconazole prophylaxis result in *in vitro* azole resistance in mucosal *Candida albicans* isolates from persons with advanced human immunodeficiency virus infection? The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses study group. **Antimicrob Agents Chemother.**, Washington, v. 44, n. 6, p. 1585-1587, Jun 2000.
- GOTTFREDSSON, M. et al. Association of plasma levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA and oropharyngeal *Candida* colonization. **J Infect Dis**, Oxford, v. 180, n. 2, p. 534-537, Aug 1999.
- GRUBER, A. et al. Dissimilar attenuation of *Candida albicans* virulence properties by human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. **Immunobiology**, New York, v. 201, n. 1, p. 133-144, Sep 1999.
- GUINEA, J. et al. Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: the contribution of efflux-pumps. **Med Mycol**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 575-578, Sep 2006.
- HAKKI, M.; STAAB, J. F.; MARR, K. A. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to Caspofungin during therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 50, n. 7, p. 2522-2524, Jul 2006.
- HAMZA, O. J. et al. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. **BMC Microbiol**, London, v. 8, p. 135-144, Aug 2008.
- HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. **Crit Rev Microbiol**, London, v. 32, n. 4, p. 217-226, Oct-Dec 2006.
- HOEGL, L.; OLLERT, M.; KORTING, H. C. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. **J Mol Med**, Berlin, v. 74, n. 3, p. 135-142, Mar 1996.
- HÖFLING, J. F. et al. Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral *Candida albicans* and proteinases. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 172, n. 2, p. 117-124, Aug 2011.
- HOPPE, J. E.; FREY, P. Evaluation of six commercial tests and germ-tub test for presumptive identification of *Candida albicans*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, Berlin, v. 18, n. 3, p. 188-191, Mar 1999.
- IVANOSKA, N. Phospholipases as a factor of pathogenicity in microorganisms. **J Mol Catal B Enzim**, Amsterdam, v. 22, p. 357-361, 2003.
- IWEN, P. C. et al. Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 20, n.2, p. 342-347, Feb 1995.
- JABRA-RIZK, M. A. et al. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected individuals. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 38, n. 6, p. 2423-2426, Jun 2000.
- JAYATILAKE, J. A.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. An ultrastructural and a cytochemical study of candidal invasion of reconstituted human oral epithelium. **J Oral Pathol Med.**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 240-246, Apr 2005.

JIN, Y. et al. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 49, p. 789-798, Oct 2004.

JUNQUEIRA, J. C. et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 17-24, Jan-Feb 2012.

KADIR, T.; UYGUN, B.; AKYÜZ, S. Prevalence of *Candida* species in Turkish children: relationship between dietary intake and carriage. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 33-37, 2005.

KIRKPATRICK, W. R. et al. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus – Infected patients in north America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 36, n. 10, p. 3007-3012, Oct 1998.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 11, n.17, p. 255-267, Apr 2004.

KORTING, H. C. et al. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 43, n. 8, p. 2038-2042, Aug 1999.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 125-135, May-Jun 1998.

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

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica – Fungos, Actinomicetos e Algas de interesse médico**. 8. ed. São Paulo: Savier, 1991.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica**, 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEVY, I. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia un children. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 26, n. 5, p. 243-249, May 1998.

LI, Y. Y. et al. Asymptomatic oral yeast carriage and antifungal susceptibility profile of HIV-infected patients in Kunming, Yunnan Province of China. **BMC Infect Dis.**, London, v. 13, n. 46, Jan 2013.

LINARES, C. E. D. **Aspecto do comportamento fenotípico e suscetibilidade à antifúngicos de *Candida dubliniensis***. 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2002.

LOEFFLER, J.; STEVENS, D. A. Antifungal drug resistance. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 36, n.1, p. S31-41, Jan 2003.

LONDERO, A. T. et al. **Micologia Médica**. Apostila Técnica, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2004.

LOPEZ, C. et al. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. **Rev Argent Microbiol**, Buenos Aires, v. 37, n. 1, p. 16-21, Jan-Mar 2005.

- LUMBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J. M. Antifungicos de uso sistémico. **Enferm Infec Microbiol Clin**, Barcelona, v. 21, n. 7, p. 266-380, Aug-Sep 2003.
- LUO, G.; MITCHELL, T. G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 40, n. 8, p. 2860-2865, Aug 2002.
- LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. Y. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 39, n. 8, p. 2971-2974, Aug 2001.
- LUQUE, A. G. et al. Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. **Mycoses**, Berlin, v. 52, n. 1, p. 53-59, May 2008.
- MACÊDO, D. P. C. et al. Opportunistic yeast infections and enzymatic profile of the etiological agents. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 188-191, Apr 2009.
- MANE, A. et al. Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of *Candida* isolates from HIV-infected individuals. **Med Mycol.**, Oxford, v. 49, n. 5, p. 548-551, Jul 2011.
- MANNIS, J. M.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infect Immun**, Washington, v. 62, n. 11, p. 5154-5156, Nov 1994.
- MARIJA, B., BOKOR-BRATIĆ. Oral candidiasis-adhesion of non- *albicans Candida* species. **Proc Nat Sci**, Novi Sad, n. 114, p. 69-78, 2008.
- MARR, K.A.; SWANSON, H.; HUGHES, P. A. Prolonged fluconazole prophylaxis is associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial. **Blood**, New York, v. 96, n. 6, p. 2055-2061, Sep 2000.
- MARR, K. A. et al. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 43, n. 6, p. 1383-1386, Jun 1999.
- MILAN, E. P. et al. Primeiro isolamento de *Candida dubliniensis* no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE INFECTOLOGIA, 11º, 1999, São Paulo. **Resumos**. p. 32.
- MILLER, C. R. Pediatric aspects of AIDS. **Adiol Clin North Am**, Philadelphia, v. 35, n. 5, p. 1191-1221, Sep 1997.
- MOEN, M. D.; LYSENG-WILLIAMSON, K. A.; SCOTT, L. J. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. **Drugs**, New York, v. 69, n. 3, p. 361-92, 2009.
- MOHAN-DAS, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v. 25, n. 4, p. 208-210, Dec 2008.
- MONDAL, R. K.; SINGHI, S. C.; CHAKRABARTI, A. M. J. Randomized comparison between fluconazole and itraconazole for the treatment of candidemia in a pediatric intensive care unit: a preliminary study. **Pediatr Crit Care Med**, Baltimore, v. 5, n. 6, p. 561-5, Nov 2004.
- MOTTA, A. L. et al. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **Braz J Infect Dis.**, Salvador, v. 14, n. 5, p. 441-448, Oct 2010.

NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cell Microbiol**, Oxford, v. 6, n. 10, p. 915-926, Oct 2004.

NAGLIK, J. R. et al. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. **J Infect Dis**, Oxford, v. 188, n. 3, p. 469-479, Aug 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS/CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M27-A. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, Pennsylvania USA, 1997.

NEGRI, M. et al. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 169, n. 3, p. 175-182, Mar 2010.

NIEWERTH, M.; KORTING, H. C. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses**, Berlin, v. 44, n. 9-10, p. 361-367, Nov 2001.

NOEL, T. F. et al. Flucytosine-fluconazole cross-resistance in purine-cytosine permease-deficient *Candida lusitanae* clinical isolates: indirect evidence of a fluconazole uptake transporter. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 47, n. 4, p. 1275-1284, Apr 2003.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. **Braz J Infect Dis**, Salvador, v. 6, n. 3, p. 124-128, Jun 2002.

NWEZE, E. I.; OGBONNAYA, U. L. Oral *Candida* isolates among HIV-infected subjects in Nigeria. **J Microbiol Immunol Infect**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 172-177, Jun 2011.

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 32, n. 8, p. 1923-1929, Aug 1994.

ODDS, C. F.; DAVIDSON, A. "Room temperature" use of CHROMagar *Candida*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, New York, v. 38, n. 3, p. 147-150, Nov 2000.

OROZCO, A. S. H. et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 42, n. 10, p. 2645-2649, Oct 1998.

PALELLA, F. J. Jr. et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV outpatients study investigators. **N Engl J Med**, Boston, v. 338, n. 13, p. 853-860, Mar 1998.

PAPPAS, P. G. et al. A prospective observational study of candidemia. Epidemiology, therapy and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 37, n. 5, p. 634-643, Sep 2003.

PATEL, P. K. et al. The changing epidemiology of oropharyngeal candidiasis in patients with HIV/AIDS in the era of antiretroviral therapy. **AIDS Res Treat**, New York, Aug 2012, *online*. doi: 10.1155/2012/262471.

PAUW, B. E.; PICAZO, J. J. Present situation in the treatment of invasive fungal infection. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. S167-S171, Nov 2008.

- PEMÁN, J. et al. Estudio multicêntrico sobre la epidemiología de las candidemias en España. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v. 19, n. 1, p. 30-35, Mar 2002.
- PENDRAK, M. L.; YAN, S. S.; ROBERTS, D. D. Sensing the host environment: recognition of haemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Arch Biochem Biophys**, New York, v. 426, n. 2, p. 148-156, Jun 2005.
- PFALLER, M. A. Nosocomial candidiases; emerging species, reservoirs and modes of transmission. **Clin Infect Dis**, Chicago, v.22, n..2, p. 89-94, May 1996.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 20, n. 1, p. 133-163, Jan 2007.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 40, n. 10, p. 3551-3557, Oct 2002.
- PFALLER, M. A. et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 46, n. 2, p. 515-521, Feb 2008.
- PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMID DISK global antifungal surveillance study: a 6,5 – year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 43, n. 12, p. 5848-5859, Dec 2005.
- PICHOVÁ, I. et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, and *Candida lusitaniae*. **Eur J Biochem**, Berlin, v. 268, n. 9, p. 2669-2677, May 2001.
- PINJOL, E. S. et al. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 36, n. 7, p. 2093-2095, Jul 1998.
- POWDERLY, W. G.; ROBINSON, K.; KEATH, E. J. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus – positive patients: evidence for two patterns of recurrence. **J Infect Dis**, Oxford, v. 168, n. 2, p. 168-463, Aug 1993.
- PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 7-14, Mar 1982.
- RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, v. 60, p. 281-303, 2006.
- REVANKAR, S. G. et al. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 36, n. 1, p. 153-156, Jan 1998.
- REX, J. H.; BENNETT, J. E.; SUGAR, A. M. A randomized trial comparing fluconazol with amphotericin B for the treatment of candidemia of patients without neutropenia. **N Engl J Med**, Boston, v. 331, n. 20, p. 1325-1330, Nov 1994.
- REX, J. H.; RINALD, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 39, n. 1, p. 1-8, Jan 1995.

- REX, J. H. et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin Microbiol Rev.**, Washington, v. 14, n. 4, p. 643-658, Oct 2011.
- RODERO, L. et al. Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina. **Rev Argent Microbiol**, Buenos Aires, v. 37, n. 4, p. 185-195, Oct-Dec 2005.
- RORIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Production of virulence factors *in vitro* by pathogenic species of the genus *Candida*. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 225-227, Mar-Apr 2009.
- RUCHEL, R.; TEGELLER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 233-244, Sep 1982.
- SÁNCHEZ-VARGAS, L. O. et al. Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 43, n. 8, p. 4159-4162, Aug 2005. a
- SÁNCHEZ-VARGAS, L. O. et al. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v. 22, n. 2, p. 83-92, Jun 2005. b
- SÁNCHEZ, M.; COLOM, F. Extracellular Dnase activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v. 27, n. 1, p. 10-13, Mar 2010.
- SANGLARD, D.; ODDS, F. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect Dis**, New York, v. 2, n. 2, p. 73-85, Feb 2002.
- SANGLARD, D. et al. Secular trends of candidemia in a large tertiary-care hospital from 1988 to 2000: emergence of *Candida parapsilosis*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, Chicago, v. 26, n. 6, p. 548-55, Jun 2002.
- SANGUINETTI, M. et al. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 49, n. 2, p. 668-679, Feb 2005.
- SARDI, J. C. O. et al. *In vitro* evaluation of phospholipase and proteinase of *Candida albicans* isolated from oral cavity of diabetic patients. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, p. 9-12, 2013.
- SCHALLER, M. et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, Berlin, v.48, n.6, p. 365-377, Nov 2005.
- SCHERMA, A. P. et al. Presença de *Candida* spp. na cavidade bucal de lactentes durante os primeiros quatro meses de vida. **Ciência Odontológica Brasileira**, São José dos Campos, v. 7, n. 3, p. 79-86, Jul-Sep 2004.
- SCHORLING, S. R. et al. The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected individuals. **Crit Rev Microbiol**, London, v. 26, n. 1, p. 59-68, 2000.
- SILVA, V. V.; DÍAZ, M. C.; FEBRÉ, N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. **Rev Chi Infec**, Santiago, v. 19, p. 56-65, 2002.

SOUZA, F. B. C. **Estudo da colonização e variabilidade genética de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de crianças com síndrome de down.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 36, n. 2, p. 329-334, Feb 1998.

SULLIVAN, D. et al. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 35, n. 1, p. 960-964, Apr 1997.

TAKAHASHI, N. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. **Int Congr Ser**, Amsterdam, v. 1284, p. 103-112, 2005.

TIETZ, H. J., CZAIIKA, V. & STERRY, W. Case report. Osteomyelitis caused by highly-resistant *Candida guilliermondii*. **Mycoses**, Berlin, v. 42, n. 9-10, p. 577-580, 1999.

TING, P. C.; WALKER, S. S. New agents to treat life-threatening fungal infections. **Curr Top Med Chem**, Hilversum, v. 8, n. 7, p. 592-602, 2008.

TORRES, R. A; BARR, M. Impact of combination therapy for HIV infection on inpatient census. **N Engl J Med**, Boston, v. 336, n. 21, p.1531-1532, May 1997.

TORRES, S. R. et al. Clinical aspects of *Candida* species carriage in saliva of xerostomic subjects. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 411-415, Oct 2003.

TOSUN, I. et al. Induction of secretory aspartyl proteinase of *Candida albicans* by HIV-1 but not HIV-2 or some other microorganisms associated with vaginal environment. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 159, n. 2, p. 213-218, Feb 2005.

TSANG, C. S. et al. Phospholipase, proteinase and hemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. **J Med Microbiol**, Edinburgh, v. 56, n. 10, p. 1393-1398, Oct 2007.

URIZAR, J. M. A. Candidiasis orales. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v. 19, n. 1, p. 17-21, Mar 2002.

VARGAS, K. G.; JOLY, S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 40, n. 2, p. 341-350, Feb 2002.

VARTIVARIAN, S. E. Virulence properties and non immune pathogenic mechanisms of fungi. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 14, n. 1, p. S30-36, 1992.

VOSS, A. et al. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. **J Clin Pathol**, London, v. 52, n. 4, p. 271-273, Apr 1999.

WALSH, T. J; GAMALETSSOU, M. N. Treatment of fungal disease in the setting of neutropenia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, Washington, v. 2013, n. 1, p. 423-427, 2013.

WILLIAMSON, M.; SAMARANAYAKE, L. P.; MacFARLANE, T. W. Phospholipase activity as criterion for biotyping *Candida albicans*. **J Med Vet Mycol**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 415-417, Oct 1986.

- WINGARD, J. R. Antifungal prophylaxis after blood and marrow transplantation. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 34, n. 10, p. 1386-1390, May 2002.
- WINGARD, J. R. Importance of species other than *Candida albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin Infect Dis**, Chicago, v.20, n. 1, p.115-125, Jan 1995.
- WINGETER M. A. et al. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 3, p. 272-276, May-Jun 2007.
- WU, C. J. et al. Oropharyngeal yeast colonization in HIV-infected outpatients in southern Taiwan: CD4 count, efavirenz therapy and intravenous drug use matter. **Clin Microbiol Infect**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 485-490, May 2012.
- WU, T.; SAMARANAYAKE, L. P. The expression of secreted aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. **J Med Microbiol**, Edinburgh, v. 48, n. 8, p. 711-720, Aug 1999.
- YANG, Y. L. et al. Oropharyngeal colonization of HIV-infected outpatients in Taiwan by yeast pathogens. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 48, n. 7, p. 2609-2612, Jul 2010.
- YING, S.; CHUNYANG, L. Correlation between phospholipase of *Candida albicans* and resistance to fluconazole. **Mycoses**, Berlin, v. 55, n. 1, p. 50-55, Jan 2011.
- ZÖLLNER, M. S. A. C.; JORGE, A. O. C. *Candida* spp. occurrence in oral cavities of breastfeeding infants and in their mother's mouths and breasts. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 151-155, 2003.

ANEXO A



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Av. João Naves de Ávila, nº 2121 - Bloco A - sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
 CEP 38408-144 - FONE/FAX (34) 3239-4131

ANÁLISE FINAL Nº. 021/12 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU
 368/11

Projeto Pesquisa: "Avaliação da frequência, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade oral de pacientes portadores de HIV".

Pesquisador Responsável: Reginaldo dos Santos Pedroso

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.
 O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data de entrega do Relatório Parcial: **dezembro de 2012**

Data de entrega do Relatório Final: **dezembro de 2013.**

SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 03 de fevereiro de 2012.

Reginaldo dos Santos Pedroso

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada “**Avaliação frequência, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade oral de pacientes portadores de HIV**” sob a responsabilidade dos pesquisadores Reginaldo dos Santos Pedroso, Ralciane de Paula Menezes, Mário Paulo Amante Penatti, Adriano Gonçalves Martins, Lucivânia Duarte Silva Malvino, Tomaz de Aquino Moreira, Walkíria Machado de Sá, Denise Von Dolinger de Brito e Aécio Sebastião Borges.

Nesta pesquisa nós vamos estudar os microrganismos causadores da candidíase (sapinho) nas pessoas portadoras e não portadoras do HIV. Sua participação consiste, caso queira, em fornecer uma pequena quantidade de saliva, que será coletada em recipiente estéril e de uso individual por você mesmo. Depois disso faremos uma avaliação dos microrganismos presentes na amostra no laboratório. Essa coleta não trará nenhum desconforto ou alteração do seu estado de saúde. Vale lembrar que todos nós temos microrganismos em nosso organismo e que somente em algumas ocasiões especiais eles podem desencadear alguma doença.

Tanto o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido quanto à coleta do material será realizada pelos pesquisadores Reginaldo dos Santos Pedroso e Ralciane de Paula Menezes.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda sim sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar da pesquisa.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

O risco existente durante a realização da pesquisa é da revelação da sua identidade, todavia, considerando o modo com que a pesquisa será conduzida, esse evento será reduzido ao mínimo. A sua identidade será mantida sob sigilo profissional, em todas as instâncias, sendo conhecida apenas pelo(s) pesquisador(es) que realizou(ram) a coleta de dados e da amostra, e pelo médico especialista que o atende, caso você seja paciente atendido no HC-UFU.

Como benefícios, a pesquisa permitirá conhecer se você é colonizado ou não por espécies de *Candida*, e ao médico intervir de forma preventiva ou para tratamento em casos de infecções que poderão ocorrer no futuro.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Prof. Dr. Reginaldo dos Santos Pedroso e Ralciane de Paula Menezes, na Av. Amazonas, s/n, Bloco 4k, sala 111, Câmpus Umuarama - Uberlândia-MG, CEP: 38400-902, fone: 34- 32182446, ou com Lucivânia Duarte Silva Malvino e Tomaz

de Aquino Moreira, no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Uberlândia, no setor de Micologia, na Rua Pará 1720, Campus Umuarama – Uberlândia-MG, CEP: 38405-382, fone: 34-32182600. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco 1A, sala 224 Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-144; fone: 34-32394131.

Uberlândia, dede 2012.

Ralciane de Paula Menezes

Reginaldo dos Santos Pedroso

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Nome legível: _____

Assinatura do Participante da Pesquisa

APÊNDICE A

FICHA EPIDEMIOLÓGICA

- ✓ N° de Controle Interno: paciente: P
controle: profissional da saúde – C₁
profissional de outros setores – C₂
- ✓ Iniciais do nome:
- ✓ Idade:
- ✓ Sexo:
- ✓ Etnia: - caucasiano
 - negro
 - indígena
 - oriental
 - mestiço
- ✓ Endereço: - zona rural
 - zona urbana
 - periferia
- ✓ Paciente internado: - Sim
 - Não
- Data da internação:
- Tempo de internação:
- ✓ É usuário de prótese dentária: - Sim
 - Não
 - Há quanto tempo?
- ✓ Usuário de aparelho ortodôntico: - Sim
 - Não

- Há quanto tempo?
- ✓ Como faz a higiene bucal: - Escova dental
 - Escova + Fio dental
- Frequência:
- ✓ Faz uso de enxaguante bucal / nº de vezes por dia:
- ✓ É usuário de drogas: - Sim
 - Não
- ✓ Faz uso de bebidas alcoólicas?
 - Frequência:
- ✓ Fumante?
 - Há quanto tempo?
 - Nº de cigarros por dia:
- ✓ Já realizou transplante: - Sim
 - Não
- Que tipo?
- ✓ Necessitou de internação na UTI: - Sim
 - Não
- Quanto tempo:
- ✓ É portador de: - HIV Contagem CD4 e CD8:
 - Diabete
 - Neoplasia (local):
 - Doença crônica:
 - Hipertensão:
 - Problemas cardíacos:
 - Prótese:
 - Outras:
- ✓ Preciou ou precisa: - hemodiálise
 - terapia imunossupressora

- quimioterapia
- radioterapia
- ventilação mecânica
- nutrição parenteral
- sonda (tipo):
- cateter venoso central (quanto tempo):

- ✓ Fez uso de antibióticos nos últimos 10 dias: - Sim
- Não

➤ Quais:

➤ Período:

- ✓ Fez uso de antifúngicos nos últimos 30 dias (para tratar micoses): - Sim
- Não

➤ Quais:

➤ Período:

➤ Motivo / agente:

➤ Há quanto tempo:

- ✓ Faz uso de terapia antiretroviral: - Sim
- Não

➤ Qual:

➤ Período:

➤ Há quanto tempo:

APÊNDICE B

1) Meio Ágar Sabouraud Dextrose (LACAZ et al., 2002)

Dextrose (Synth).....	40g
Peptona (Merk).....	10g
Ágar bacteriológico (Difco).....	15g
Água destilada.....	1000mL

Dissolver a quente. Distribuir em tubos 20x200mm e autoclavar a 121°C, durante 15 minutos. Solidificar em posição inclinada. Conservar em geladeira.

2) Meio Ágar Müeller-Hinton acrescido de azul de metileno e glicose (CLSI, 2004)

Ágar Müeller-Hinton (Isofar).....	36g
Glicose 2% (Isofar).....	20g
Azul de metileno (Merk).....	500µg
Água destilada.....	1000mL

Dissolver a frio e autoclavar a 121°C, durante 15 minutos. Distribuir em placas de Petri (90mm de diâmetro) e deixar solidificar à temperatura ambiente. Conservar em geladeira.

3) CHROMagar *Candida* (ODDS e BERNAERTS, 1994)

Cloranfenicol.....	0,5g
Mistura cromogênica.....	22g
Peptona (Merk).....	10,2g
Agar bacteriológico (Difco).....	15g
Água destilada.....	1000mL

Conforme a recomendação do fabricante, dissolver, a quente, 47,7g do conteúdo em 1000ml de água destilada. Após a fusão do ágar distribuir cerca de 20mL do meio em placas de Petri (90mm de diâmetro). Conservar sob refrigeração.

4) Agar fubá (LACAZ et al.,1991)

Fubá (Carrefour).....	40g
Agar bacteriológico (Difco).....	22g
<i>Tween</i> 80 (Merk).....	10,2mL
Água destilada.....	1000mL

Suspender o fubá em água e aquecer em banho-maria a 60°C, durante 1 hora. A seguir filtrar a suspensão com auxílio de gaze dobrada e completar o volume até 1000mL. Adicionar o ágar e aquecer até a completa dissolução dos componentes. Adicionar o *Tween* 80 e homogeneizar o meio para distribuir nos tubos, e autoclavar a 121°C, durante 15 minutos. Conservar sob refrigeração.

5) Meio C – para assimilação de fontes de carboidrato (LACAZ, et al.,1991)

Sulfato de amônio (Ecibra).....	5g
Fosfato de potássio monobásico (Reagen).	1g
Sulfato de magnésio heptaidratado (Merk)	0,5g
Agar bacteriológico (Difco).....	20g
Água destilada.....	1000mL

Suspender os componentes em água destilada, sob agitação, e aquecer até fusão do ágar. Distribuir 18mL do meio em tubos 25X200mm, em seguida esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Conservar em geladeira.

6) Meio N – para assimilação de fontes de nitrogênio (LACAZ et al.,1991)

Glicose (Isofar).....	20g
Fosfato de potássio monobásico (Reagen).	1g
Sulfato de magnésio heptaidratado (Merk)	0,5g
Agar bacteriológico (Difco).....	20g
Água destilada.....	1000mL

Suspender os componentes em água destilada, sob agitação, exceto a glicose. Aquecer até fusão do ágar. Acrescentar a glicose. Distribuir 18mL do meio em tubos 25X200mm, em seguida esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Conservar em geladeira.

7) Ágar fosfolipase (PRICE et al., 1982).

Peptona (Merk).....	10g
Glicose (Isifar).....	20g
Cloreto de sódio (Reagen).....	57,3g
Cloreto de cálcio (Reagen).....	0,55g
Ágar bacteriológico (Difco).....	20g
Emulsão de gema de ovo a 50%.....	160mL
Água destilada.....	1000mL

Colocar todos os componentes em balão volumétrico, acrescentar a água destilada, esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Resfriar a 50°C, adicionar 160mL de emulsão de ovo a 50% (80g de gema de ovo, homogeneizada com 80mL de solução fisiológica esterilizada, em frasco com pérolas de vidro estéreis). Distribuir em placas de Petri (90mm de diâmetro). Conservar em geladeira.

8) Ágar proteinase (RUCHEL et al., 1982)

YCB – Yeast Carbon Base (Difco).....	11,7g
Albumina Bovina Fração V (Sigma).....	2g
Protovit (Roche).....	2,5g
Água destilada.....	1000mL
Ágar bacteriológico (Difco).....	20g

Em um béquer dissolver os componentes em água destilada e esterilizar por filtração, utilizando membrana Millipore de 0,22µm. Em seguida, adicionar a albumina e o Protovit ao ágar bacteriológico acrescido de YCB e água destilada previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Distribuir em placas de Petri (90mm de diâmetro). Conservar em geladeira.

9) Ágar Sangue (RORIG et al., 2009)

Dextrose (Synth).....	30g
Peptona (Merk).....	10g
Ágar bacteriológico (Difco).....	15g
Sangue de carneiro.....	70mL
Água destilada.....	1000mL

Dissolver a dextrose, peptona e o ágar bacteriológico em água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Resfriar até 50°C e, em seguida acrescentar o sangue de carneiro e homogeneizar bem. Distribuir em placa de Petri (90mm de diâmetro). Conservar em geladeira.

10) Ágar DNase (SÁNCHEZ; COLOM, 2010)

Peptona (Merk).....	20g
DNA (Reagen).....	2g
Cloreto de sódio (Reagen).....	5g
Agar bacteriológico (Difco).....	20g
Água destilada.....	1000mL

Conforme a recomendação do fabricante, dissolver 39g em 1000mL de água destilada. Hidratar por 15 minutos. Aquecer agitando frequentemente e ferver por 1 minuto. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Resfriar até 50°C e, em seguida, distribuir 15mL em placa de Petri (90mm de diâmetro). Conservar em geladeira.

11) Solução fisiológica (NaCl 0,9%)

Cloreto de sódio.....	0,85g
Água destilada	100mL

Adicionar o cloreto de sódio na água destilada e homogenizar. Distribuir em tubos 10x75mm, e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Conservar em geladeira.