

ANA CECÍLIA NASTRINI DELGADO

**COLONIZAÇÃO ORAL POR *Candida* spp. EM PACIENTES
COM INFECÇÃO PELO HIV EM USO DE TERAPIA
ANTI-RETROVIRAL:**

estudo epidemiológico, clínico e microbiológico

CAMPINAS

Unicamp

2008

ANA CECÍLIA NASTRINI DELGADO

**COLONIZAÇÃO ORAL POR *Candida* spp. EM PACIENTES
COM INFECÇÃO PELO HIV EM USO DE TERAPIA
ANTI-RETROVIRAL:
estudo epidemiológico, clínico e microbiológico**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas.

ORIENTADORA: PROF^A DR^A MARIA LUIZA MORETTI

CO-ORIENTADOR: PROF DR ROGÉRIO DE JESUS PEDRO

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

D378c Delgado, Ana Cecília Nastrini
Colonização oral por *Candida* spp. em pacientes com infecção pelo HIV em uso de terapia anti-retroviral: estudo epidemiológico, clínico e microbiológico / Ana Cecília Nastrini Delgado. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores : Maria Luiza Moretti, Rogério de Jesus Pedro
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Candida albicans*. 2. *Candida dubliniensis*. 3. Terapia anti-retroviral de alta atividade. 4. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado. 5. Antifúngicos. I. Moretti, Maria Luiza. II. Pedro, Rogério de Jesus. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês: Colonization by oral *Candida* spp. in patients with HIV infection in use of antiretroviral therapy: study epidemiological, clinical and microbiological testing

Keywords: • *Candida albicans*
• *Candida dubliniensis*
• Anti-retroviral therapy, highly active
• Electrophoresis, Gel, Pulsed-Field
• Antifungal agents

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

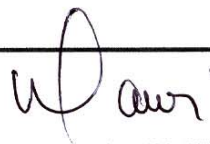
Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Luiza Moretti
Profa. Dra. Maria Aparecida Shinakanai Yasuda
Profa. Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem
Profa. Dra. Angélica Zaninelli Screiber
Profa. Dra. Mônica Jacques de Moraes

Data da defesa: 29 - 01- 2008

Banca Examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof. Dr.ª MARIA LUIZA MORETTI



Membros:

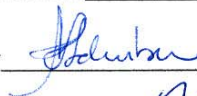
1. Prof(a). Dr(a) . Maria Aparecida Shikanai Yasuda



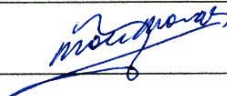
2. Prof(a). Dr(a). Márcia de Souza Carvalho Melhem



3. Prof(a). Dr(a). Angélica Zaninelli Sreiber



4. Prof(a). Dr(a). Mônica Jacques de Moraes



**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 29/01/2008.

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter me abençoado em todos os momentos desta caminhada.

A meu avô Ezio, que me ensinou a ser uma fortaleza diante das dificuldades e uma mulher de honra em minhas atitudes, assim como ele foi em vida.

A minha avó Elza, que me ensinou a ser uma mulher sábia e encantadora, como ela é.

Ao meu marido Eduardo, pela paciência e carinho, e aos nossos futuros ramos frutíferos.

A meus pais João e Márcia, a meus irmãos Gustavo, Flávio e Carolina e aos meus sobrinhos Lucas, Mateus e Alex, que são tudo para mim.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Profa. Dra. Maria Luiza Moretti, pela acreditação em minha capacidade profissional e pelos valiosos ensinamentos, constante carinho e incessante paciência, dispensados durante a realização deste trabalho.

À minha instituição Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), à Faculdade de Ciências Médicas (FCM) e ao Departamento de Clínica Médica da FCM/Unicamp, pelo apoio e oportunidade.

À Japan International Corporation Agency (JICA), em especial ao “Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis” da Universidade de Chiba, no Japão, pela preciosa colaboração.

Aos funcionários do Apoio Didático, Científico e Computacional da FCM/Unicamp, do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp, do Serviço de Arquivo Médico do HC/Unicamp e da Comissão de Pesquisa Estatística da FCM/Unicamp pela valiosa colaboração e prestatividade.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular e Fungos da Disciplina de Doenças Transmissíveis do Departamento de Clínica Médica da FCM/Unicamp, pela paciência, carinho e apoio durante a elaboração deste trabalho.

A todos os professores e amigos do Departamento de Clínica Médica da FCM/Unicamp e do Laboratório de Microbiologia e Micologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM/Unicamp, que me apoiaram e acreditaram em mim.

Aos meus amigos e colaboradores da rede “Monreale Hotels” e aos meus alunos, amigos e professores da Unifenas, Câmpus Poços de Caldas, pelo constante carinho.

Aos pacientes deste trabalho que me ensinaram que todos os esforços valem a pena! Que Deus abençoe a todos e a suas famílias.

O meu sincero e profundo agradecimento! Muito obrigada ...

"Os que esperam no Senhor renovarão as suas forças e subirão com asas como águias; correrão e não se cansarão; caminharão e não se fatigarão".

ISAÍAS 40:31

	PAG.
RESUMO	xxxv
ABSTRACT	xxxix
1- INTRODUÇÃO	43
1.1- Colonização oral por <i>Candida</i> spp. X infecção pelo HIV	45
1.2- O impacto da terapia anti-retroviral sobre as infecções oportunistas...	48
1.3- Ferramentas moleculares para caracterização de <i>Candida</i> spp.	49
1.4- Sensibilidade de <i>Candida</i> spp. à terapia antifúngica	51
2- OBJETIVOS	55
3- PACIENTES E MÉTODOS	59
3.1- População de estudo	61
3.2- Metodologia do estudo	61
3.2.1- Estudo epidemiológico e clínico.....	62
3.2.1.1- Análise estatística.....	65
3.2.2- Estudo microbiológico.....	66
3.2.2.1- Coleta de amostras.....	66
3.2.2.2- Isolamento de amostras.....	66
3.2.2.3- Identificação de leveduras do gênero <i>Candida</i>	67
3.2.2.4- Sorotipagem de <i>C. albicans</i>	68
3.2.2.5- Seqüenciamento de isolados de <i>Candida</i> spp.....	69
3.2.2.6- Tipagem molecular de <i>Candida</i> spp.....	72
3.2.2.7- Determinação da suscetibilidade de <i>Candida</i> spp. aos antifúngicos.....	74

4- RESULTADOS.....	77
4.1- População de estudo.....	79
4.2- Estudo Epidemiológico e Clínico.....	79
4.2.1- Gênero, idade, raça, tipo de exposição ao HIV e ano de diagnóstico.....	80
4.2.2- Carga viral e contagem de linfócito TCD4 ⁺	80
4.2.3- Infecções oportunistas.....	82
4.2.4- Classificação clínica da infecção pelo HIV, no momento da coleta.....	85
4.2.5- Terapia anti-retroviral.....	86
4.2.6- Terapia antifúngica.....	87
4.3- Estudo Microbiológico.....	88
4.3.1- Coleta e isolamento das amostras.....	88
4.3.2- Identificação de leveduras do gênero <i>Candida</i>	88
4.3.3- Tipagem molecular de <i>Candida</i> spp.....	93
4.3.4- Determinação da suscetibilidade de <i>Candida</i> spp. aos antifúngicos.....	102
5- DISCUSSÃO.....	105
5.1- Estudo epidemiológico e clínico.....	107
5.2- Estudo microbiológico.....	118
6- CONCLUSÃO.....	131
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	135
8- APÊNDICES.....	157

LISTA DE ABREVIATURAS

aids	síndrome da imunodeficiência adquirida
ASD	água sabouraud dextrose
ATCC	“american type culture collection”
BLAST	“basic local alignment search tool”
Bp	pares de base
°C	graus <i>celsius</i>
CBS	“centraalbureau voor schimmelcultures”
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”
CD4⁺	linfócito T
CE	cariotipagem eletroforética
cels.	células
CHEF	“contourclamped homogeneous electric field”
CIM	concentração inibitória mínima
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FIGE	“field inversion gel electrophoresis”
g	gramas
HC	Hospital de Clínicas

HCl	ácido clorídrico
HIV	vírus da imunodeficiência humana
I	intermediário
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IO	infecção oportunista
IP	inibidores da protease
M	molar
m²	metro quadrado
mg	miligrama
mL	mililitro
MLEE	“multilocus enzyme electrophoresis”
mm	milímetro
mm³	milímetro cúbico
mM	milimolar
mol	quantidade de matéria
MOPS	ácido morfilenopropanosulfônico
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
NaOH	hidróxido de sódio
NCBI	“National Center for Biotechnology Information”
NCCLS	“National Committee for Clinical Laboratory Standards”
NET	N-lauroilsarcosine EDTA trizma base

ng	nanograma
NNRTI	inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo
NRTI	inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo
OFAGE	“orthogonal-fieldalter native gel electresis”
PCP	pneumonia por <i>Pneumocystis carinii</i>
PCR	reação de polimerização em cadeia
PFGE	“pulsed-field gel electrophoresis”
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
q.s.p	quantidade suficiente para
®	marca registrada
R	resistente
RAPD	“randomly amplified polymorphic DNA”
REA	“restriction enzyme analysis”
RFLP	“restriction lenght fragment polymorphism”
rpm	rotações por minuto
S	suscetível
SAP	aspartil proteinase secretada
S-DD	sensibilidade dose-dependente
spp	espécie
TAGE	“transverse alternate field electrophoresis”
TARV	terapia anti-retroviral
TBE	tris ácido bórico EDTA

UDI	usuários de drogas injetáveis
UFC	unidade formadora de colônia
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
YEPD	“yeast extract peptone dextrose”
X	vezes ou <i>versus</i>
%	porcentagem
=	igual a
>	maior do que
<	menor do que
≥	maior do que ou igual a
≤	menor do que ou igual a

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Classificação clínica do CDC para a infecção pelo HIV.....	64
Tabela 2- Interpretação dos valores de concentração inibitória mínima dos antifúngicos testados.....	76
Tabela 3- Comparação das variáveis demográficas idade, gênero, raça, tipo de exposição ao HIV e ano de diagnóstico entre o grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.....	80
Tabela 4- Carga viral do HIV do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.....	81
Tabela 5- Média e mediana de contagem de linfócito TCD4 ⁺ do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.....	81
Tabela 6- Comparação da carga viral do HIV e contagem de linfócito TCD4 ⁺ entre o grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.....	82
Tabela 7- Comparação das infecções oportunistas fúngicas entre o grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.....	83
Tabela 8- Descrição das infecções oportunistas fúngicas do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.....	83
Tabela 9- Descrição das infecções oportunistas causadas por vírus, bactérias, protozoários e neoplasias do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.....	84

Tabela 10-	Classificação clínica da infecção pelo HIV do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.....	85
Tabela 11-	Esquema terapêutico anti-retroviral do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV, no momento da coleta.....	86
Tabela 12-	Esquema terapêutico anti-retroviral, com ou sem inibidor de protease, do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, no momento da coleta.....	87
Tabela 13-	Uso de terapia antifúngica do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.....	87
Tabela 14-	Descrição do uso de terapia antifúngica, comparando o grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.....	88
Tabela 15-	Triagem fenotípica de 10 cepas de <i>Candida</i> spp. isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV, em relação à tonalidade da colônia em meio CHROMagar Candida [®] , prova do tubo germinativo, crescimento a 42°C e assimilação de xilose.....	90
Tabela 16-	Descrição do seqüenciamento de 10 <i>Candida</i> spp. isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV, que apresentaram tonalidade verde em meio CHROMagar Candida [®] e xilose negativa.....	92
Tabela 17-	Colonização mista de <i>Candida</i> spp. isoladas da cavidade oral de 12 pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.....	93
Tabela 18-	Descrição do perfil genômico de <i>C. albicans</i> sorotipo A e B isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.....	94

Tabela 19-	Perfil genômico de cepas de 7 <i>C. glabrata</i> e 2 <i>C. dubliniensis</i> isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.....	98
Tabela 20-	Intervalos de CIM obtidos de <i>C. krusei</i> ATCC® 6258C e <i>C. parapsilosis</i> ATCC® 22019, perante o fluconazol, cetoconazol, itraconazol, 5-fluocitosina, anfotericina B e nistatina.....	102
Tabela 21-	Intervalos de CIM, CIM ₅₀ e CIM ₉₀ perante o fluconazol, cetoconazol, itraconazol, 5-fluocitosina, anfotericina B e nistatina de <i>C. albicans</i> isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.....	103
Tabela 22-	Perfil de sensibilidade de 152 <i>Candida</i> spp., isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV, perante os azólicos.....	103
Tabela 23-	Correlação da sensibilidade dose-dependente <i>in vitro</i> de <i>Candida</i> spp., isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV, com o uso prévio de azólicos.....	104

	PÁG.
Figura 1- Caracterização da colonização por <i>Candida</i> spp. na cavidade oral de 324 pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.....	79
Figura 2- Caracterização das espécies de <i>C. não albicans</i> isoladas da cavidade oral de 140 pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.....	89
Figura 3- PCR de 10 <i>Candida</i> spp. isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV, que apresentaram tonalidade verde em meio CHROMagar <i>Candida</i> [®] e xilose negativa.	91
Figura 4- CE de <i>C. albicans</i> sorotipo A isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.....	95
Figura 5- Dendrograma da Figura 4. Ilustra a similaridade entre 13 perfis genômicos de <i>C. albicans</i> sorotipo A e o perfil genômico predominante de <i>C. albicans</i> sorotipo B, isolados da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.....	96
Figura 6- CE de <i>C. albicans</i> sorotipo B isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.....	97
Figura 7- Dendrograma da Figura 6. Ilustra a similaridade entre 3 perfis genômicos de <i>C. albicans</i> sorotipo B, isolados da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.....	97
Figura 8- CE de <i>C.glabrata</i> isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.....	99

Figura 9-	Dendrograma da Figura 8. Ilustra a similaridade entre 7 perfis genômicos de <i>C. glabrata</i> , isolados da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.....	100
Figura 10-	CE de <i>C. albicans</i> sorotipo A e <i>C. dubliniensis</i> isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.....	101
Figura 11-	Dendrograma da Figura 10. Ilustra a similaridade entre dois perfis genômicos de <i>C. dubliniensis</i> e os perfis predominantes A ¹ e A ³ de <i>C. albicans</i> sorotipo A, isolados da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.....	101

RESUMO



OBJETIVOS: Avaliar a incidência de colonização oral por *Candida* spp. em pacientes com HIV em uso de terapia anti-retroviral, comparando os resultados dos grupos de pacientes colonizados e não colonizados, assim como estudar os aspectos microbiológicos das cepas isoladas. **PACIENTES E MÉTODOS:** Foi realizado estudo transversal de pacientes assistidos no HC/Unicamp, de agosto de 2003 a abril de 2004, com coleta única por paciente de *swab* da cavidade oral. CHROMagar *Candida*[®] e ID32C[®] foram utilizados no cultivo, isolamento e identificação de *Candida* spp. e *Candida* Check[®] na determinação dos sorotipos de *C. albicans*. *C. dubliniensis* foi identificada por seqüenciamento no aparelho ABI PRISM 3100[®] GENETIC ANALYZER. O perfil genômico foi estudado por PFGE, usando o sistema CHEF e a sensibilidade aos azólicos, 5-fluocitosina, anfotericina B e nistatina, baseada na microdiluição em caldo (CLSI). Por meio da revisão dos prontuários foi avaliado: gênero, idade, raça, ano de diagnóstico da infecção pelo HIV, tipo de exposição ao HIV, carga viral, contagem de linfócito TCD4⁺, infecções oportunistas, classificação clínica da infecção pelo HIV, terapia anti-retroviral e terapia antifúngica. **RESULTADOS:** Foram identificados 140/324 pacientes colonizados e 184/324 não colonizados: gênero masculino (63% e 60%), exposição sexual (81,5% e 80,5%) e idade média de 38,9 anos. A presença de colonização/infecção foi significativamente maior em pacientes com carga viral detectável (p=0,002) e CD4⁺<200/mm³ (p=0,006). Foi evidenciada incidência de candidíase oral (31,2%), tuberculose (20,9%), herpes zoster (16,3%), pneumonia por *Pneumocystis carinii* (PCP) (15,7%) e toxoplasmose (11,7%), no total de pacientes estudados. Não foi observada diferença significativa de colonização por *Candida* entre os pacientes em uso de TARV com ou sem IP. O uso prévio de nistatina foi maior no grupo colonizado (p=0,014). Foram isoladas 115/154 *C. albicans* sorotipo A, 15/154 *C. albicans* sorotipo B e 24/154 *Candida* não *albicans*. Doze pacientes apresentaram colonização mista. O estudo genômico de *C. albicans* sorotipo A identificou 15 perfis diferentes, com predomínio do A¹ (56,5%), que mostrou similaridade de 100% entre o perfil de *C. albicans* sorotipo B predominante B¹ (86,6%). O perfil genômico de *C. glabrata* mostrou-se heterogêneo. *C. albicans* sorotipo A e B mostraram-se sensíveis a todos os antifúngicos avaliados. *C. glabrata* e *C. krusei* apresentaram S-DD para os azólicos. **CONCLUSÃO:** O trabalho contribuiu de forma significativa para traçar o perfil epidemiológico/clínico dos pacientes HIV em uso de TARV e verificou que o uso de IP não influenciou na presença ou ausência de colonização oral por *Candida*.

ABSTRACT



OBJECTIVES: Evaluating de incidence of oral colonization by *Candida* spp. in patients in use of antiretroviral therapy, comparing the results of the groups of patients colonized and non-colonized, as well as study the microbiological aspects of the isolated strains. **PATIENTS AND METHODS:** It was made a cross sectional study assisted at HC/UNICAMP, from August, 2003 to April, 2004, with unique collect of the oral cavity by patient using a swab. CHROMagar *Candida*[®] and ID32C[®] were used in growth, isolation and identification of *Candida* spp. and *Candida* Check[®] for determination of *C. albicans* serotypes. *C. dubliniensis* was identified by sequencing in ABI PRISM 3100[®] GENETIC ANALYZER device. The genomic profile was studied by PFGE, using the system CHEF and azoles, 5-FC, amphotericin B and nistatine sensibility, based broth microdilution (CLSI). It was evaluated through the review of the prontuaries: genre, age, race, year of HIV infection diagnosis, type of exposition, viral load, TCD4⁺ linfocyte counting, opportunistic infections, antiretroviral therapy and antifungal therapy. **RESULTS:** It was identified 140/324 colonized patients and 184/324 non-colonized patients: male gender (63% and 60%), sexual exposition (81,5% and 80,5%) and average age of 39,8 years old. The presence of colonization was significantly greater in patients with detectable viral load (p=0,002) e CD4⁺<200/mm³ (p=0,006). The incidence of oral candidiasis (31,2%), tuberculosis (20,9%), herpes zoster (16,3%), *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) (15,7%) and toxoplasmosis (11,7%) was seen among the total of studied patients.

It was not observed a significant difference regarding colonization by *Candida* among the patients in use of ARVT with or without usage of PI. The early usage of nistatine was bigger in the colonized group (p=0,014). It was isolated 115/154 *C. albicans* serotype A, 15/154 *C. albicans* serotype B and 24/154 non *albicans Candida* . Twelve patients presented mixed colonization. The genomic study of *C. albicans* serotype A, identified 15 different profiles, with dominance of A¹ (56,5%), which shown 100 % similarity between *C. albicans* serotype B and predominant B¹ (86,6%). The genomic profile of *C. glabrata* showed heterogeneous. *C. albicans* serotype A and B showed sensible to all evaluated antifungals. *C. glabrata* e *C. krusei* showed S-DD to azoles. **CONCLUSION:** This work contributed significantly to trace an epidemiological/clinical profile of the HIV patients in usage of ARV therapy and the lack of influence of IP in the presence or absence of colonization of oral *Candida*.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Colonização oral por *Candida* spp. X infecção pelo HIV

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano (Odds e Bernaerts, 1994; Dignani et al., 2003), tendo sido demonstrado que estas fazem parte da flora normal da boca de 25% a 50% dos indivíduos saudáveis (Odds, 1988).

A ocorrência de alterações nos mecanismos de defesa dos hospedeiros e o comprometimento de barreiras anatômicas por queimadura ou procedimentos invasivos favorecem a mudança de condição das referidas leveduras de comensais para patógenos (Dignani et al., 2003). Qualquer variável que provoque desequilíbrio ou lesão da mucosa gastrointestinal, como exemplo o uso de antibióticos (Alexander et al., 1990), pode facilitar a translocação por *Candida* spp. até os capilares mesentéricos (Cole et al., 1996; Colombo & Guimarães, 2003). Numa investigação sobre fonte de infecção para candidemia, Nucci e Anaisse (2001) concluíram que a maioria das candidemias em pacientes não neutropênicos foi de origem endógena.

Estudo em pacientes com candidíase oral e controles saudáveis (Tanida et al., 2003) mostrou que a candidíase oral está associada à hipofunção de glândulas salivares que excretam proteínas e peptídeos microbianos, ou seja, indivíduos com hipofunção nessas glândulas estariam mais propensos a apresentar candidíase oral.

A propensão do paciente com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) em desenvolver candidíase orofaríngea parece ser de origem multifatorial, envolvendo alterações nos mecanismos inespecíficos e específicos de defesa do hospedeiro, bem como variação de virulência da cepa envolvida. O volume de secreção salivar em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (*Human Immunodeficiency Virus* – HIV) pode estar diminuído, sugerindo lesão das glândulas salivares pelo vírus (Zegarelli, 1993) ou pelo uso de agentes anti-retrovirais (Atkinson et al., 1990), contagem de CD4⁺ menor do que 200 cels/mm³ e carga viral acima de 10.000 cópias/mL (Patton et al., 1999; Greenspan et al., 2000).

Outros fatores, tais como a falta de higiene oral, o fumo e o uso de antibióticos, são fatores de risco bastante conhecidos para o desenvolvimento de candidíase oral (Moretti-Branchini, 2002).

O diagnóstico de candidíase oral inclui o eritema difuso ou placas esbranquiçadas, o isolamento de *Candida* spp. em cultura de secreções orais, raspado da lesão oral ou biopsia; a presença de micélios na observação direta oral e a biopsia evidenciando hifa no epitélio. O diagnóstico de candidíase oral deve ser diferenciado de colonização. A presença de hifas ou pseudo-hifas no exame microscópico dos raspados da mucosa oral ou língua associado ao quadro clínico vem sugerir o diagnóstico de doença. O isolamento de *Candida* spp. em cultura de secreções orais ou do raspado de lesões não confirma o diagnóstico de candidíase orofaríngea, uma vez que a presença de *Candida* na cavidade oral pode representar apenas colonização (Moretti-Branchini, 2002).

A incidência das formas da candidíase descrita na literatura, em ordem decrescente, encontra-se a pseudomembranosa, queilite angular e eritematosa (Greenspan D e Greenspan JS, 1991; Laskaris et al., 1992; Panganathan et al., 2000).

Em relação à frequência das espécies envolvidas na candidíase oral, *Candida albicans* é o agente normalmente mais associado, principalmente em pacientes com infecção pelo HIV (Redding et al., 1994), diabéticos (Kumar et al., 2005), com asma, tratados com corticóides (Fukushima et al., 2005) e naqueles com câncer em estágio avançado (Bagg et al., 2003), mas outras espécies, como *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* têm sido relatadas em inúmeros estudos (Kumar et al., 2005; Bodey, 1993; Hospentha, 2006). Mais recentemente, *C. dubliniensis* (Sullivan et al., 1997) vem se destacando e pode, circunstancialmente, ser confundida com *C. albicans* atípica devido à similaridade fenotípica entre as duas espécies. Estudos utilizando métodos genotípicos têm sido realizados na identificação e diferenciação das mesmas (Mariano et al., 2003; Binolfi et al., 2005) e de outras espécies dentro do gênero *Candida* (Lopez et al., 2005; Hospentha et al., 2006) envolvidas na colonização oral e na candidíase como um todo (Bodey, 1993).

Durante o curso da infecção do HIV, os pacientes podem ser colonizados por mais de uma espécie de *Candida* e por mais de uma cepa de uma mesma espécie. No entanto, estudos sugerem que uma cepa pode predominar e que as recorrências são muitas vezes pela mesma cepa e espécie de *Candida* (Moretti-Branchini, 2002). Atualmente, meios de cultura como o CHROMagar *Candida*[®], são recomendados para facilitar o reconhecimento de cultivos com mais de uma espécie de levedura (Odds e Bernaerts, 1994).

C. albicans é dividida antígenicamente em dois sorotipos, baseando-se na presença do antígeno de superfície A ou B, originalmente descritos por Hansecklever e Mitchell (1961). A variável incidência de candidíase orofaríngea causada pelos sorotipos A e B esta relacionada à diversidade geográfica, pressão seletiva de antifúngicos, doença de base, estado imunológico e fatores do hospedeiro (Brawner, 1991; Velegraki, 1995; Torssander et al., 1996). As amostras pertencentes ao sorotipo B apresentam CIMs (concentrações inibitórias mínimas) significativamente elevadas para fluconazol, itraconazol e 5-fluocitosina, quando comparadas com as do sorotipo A (Velegraki, 1995; Torssander et al., 1996). Na literatura, a distribuição dos sorotipos A e B de *C. albicans* é bastante variável. A maioria dos estudos reporta a predominância do sorotipo A em populações de indivíduos sadios e imunodeprimidos (McMullan-Vogel et al., 1999; Vidoto et al., 1999; Williams et al., 2000). No entanto, estudos vêm demonstrando aumento da prevalência do sorotipo B em pacientes HIV positivos (Brawner e Cutler, 1898; Barturen et al., 1995; Velegraki, 1995)

Sabe-se que a *C. dubliniensis* apresenta maior atividade de proteinase que a *C. albicans* e revela maior aderência à mucosa oral. No entanto, a formação de hifas é mais lenta, sugerindo menor poder de invasão (Sullivan et al., 1999). É provável que esta nova espécie de *Candida* já estivesse presente na comunidade, há muito tempo, e que era identificada incorretamente como *C. albicans*. Ainda são raros os casos de doença sistêmica relacionada a esta nova espécie, a maior parte dos quais se encontra associada à infecção de mucosa oral (Kromery et al., 2002).

1.2- O impacto da terapia anti-retroviral sobre as infecções oportunistas

Considerada sentinela na história natural e na progressão da infecção pelo HIV (Greenspan et al., 2000), a candidíase orofaríngea é a infecção fúngica mais comum entre os pacientes infectados pelo HIV (Campisi et al., 2002; Fidel, 2002), ocorrendo pelo menos uma vez no curso da doença em 90% dos pacientes (Korting et al., 1999). Muitas vezes é detectada em episódios recorrentes, principalmente quando a contagem de linfócitos CD4⁺ for baixa (Campos et al., 2002; Gupta et al., 2006).

Recentemente, foi realizado estudo para avaliar a tendência temporal das doenças associadas à aids, no Brasil, de acordo com as variáveis sócio-demográficas econômicas. As condições associadas com maior incidência acumulada, para o período de 1980-1999, foram: candidíase (59,2%), tuberculose (25,5%), pneumonia por *Pneumocystis carinii* (PCP) (23,0%), neurotoxoplasmose (15,3%) e herpes zoster (12,5%) (Guimarães, 2000).

Com a utilização dos novos anti-retrovirais na terapia do HIV, passou-se a observar uma redução na ocorrência de infecções oportunistas em até 60% a 80% dos pacientes (Powderly, 1999), porém para os pacientes de diagnóstico tardio ou aqueles que não respondem adequadamente à terapêutica anti-retroviral (TARV), a candidíase orofaríngea ainda é muito frequente (Eyeson et al., 2002; Telles et al., 2002; Greenspan et al., 2004). Em países onde a determinação da carga viral não é rotina ou é pouco disponível, estas observações podem indicar aumento da carga viral e queda do número de células CD4⁺ (Margiotta et al., 1999).

Desde que os inibidores de proteases (IPs) do HIV tornaram-se disponíveis em 1996, tem sido verificado mudança da história natural da aids, com redução da mortalidade, do número de hospitalizações e da frequência de infecções oportunistas. Assim, nos últimos anos, a TARV com inibidores de protease e inibidores da transcriptase reversa, análogos e não análogos de nucleosídeos, tornou-se terapêutica padrão em pacientes com aids (Hoog et al., 1998; Moore et al., 1999).

Desde a introdução dos IPs do HIV, as infecções fúngicas, incluindo a candidíase orofaríngea, também se tornaram menos frequentes nos pacientes HIV positivos. Essa alteração parece estar correlacionada com a elevação das células CD4⁺ e a melhora do sistema imune. Outra razão pode ser um efeito direto do IP sobre a aspartil proteinases secretadas (SAPs) da *C. albicans* (Korting et al., 1999).

1.3- Ferramentas moleculares para caracterização de *Candida* spp.

Para entender a dinâmica dos organismos infecciosos em populações humanas, interpretar o relacionamento complexo entre comensalismo e infecção, identificar a origem de uma infecção ou monitorar a emergência de linhagens resistentes a drogas, métodos moleculares baseados em sistemas “fingerprinting” genotípicos (marcadores moleculares) devem ser disponibilizados para acessar o relacionamento genético destes organismos de importância epidemiológica (Olive et al., 1999; Soll, 2000).

Dentre os métodos de tipagem genotípicos utilizados nas pesquisas para adquirir um melhor entendimento sobre a patogênese, epidemiologia, genética e evolução das infecções causadas por *C. albicans*, destaca-se: Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE), Cariotipagem Eletroforética (CE), Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Restriction Length Fragment Polymorphism without hybridization (RFLP sem hibridização) ou Restriction Enzyme Analysis (REA) e Restriction Length Fragment Polymorphism with hybridization (RFLP com hibridização) (Boriollo et al, 2005).

A tipalidade, reprodutibilidade e poder discriminatório têm sido desenvolvidos e sugeridos durante a avaliação da eficiência de vários métodos de tipagem genotípicos. O poder discriminatório de um método corresponde à sua habilidade de diferenciar claramente linhagens não relacionadas, tais como aquelas que são geograficamente distintas a partir de uma fonte de organismos, e demonstrar ao mesmo tempo o relacionamento de todos os organismos isolados a partir de indivíduos infectados diretamente de uma mesma fonte (Olive et al., 1999).

Com a invenção da eletroforese em gel de campo pulsado “pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE) (Schwartz e Cantor, 1984), e seus respectivos sistemas “orthogonal-field alter native gel electrophoresis” (OFAGE), “field inversion gel electrophoresis” (FIGE), “contour clamped homogeneous electric field” (CHEF) ou “transverse alternate field electrophoresis” (TAGE), fragmentos cromossômicos do genoma de leveduras foram facilmente separados em gel, consolidando assim a CE (Soll, 2000).

As primeiras aplicações de PFGE demonstraram variações nos padrões cariotípicos entre isolados de *C. albicans* não relacionados (Snell et al., 1986; Lott et al., 1987; Magee et al., 1987; Kwon Chung et al., 1988; Merz et al., 1988; Suzuki et al., 1988; Lasker et al., 1989; Asakura et al., 1991; Thrask-Bingham et al., 1992) e, por essa razão, proporcionou um potencial método de tipagem genotípico (Soll, 2000).

Devido ao excelente poder discriminatório e reprodutibilidade (Vazquez et al., 1991; Magee et al., 1992; Bostock et al., 1993; Gottfredsson et al., 1998; Reiss et al., 1998), a CE tem sido empregada extensivamente como marcador molecular de *C. albicans* (Snell et al., 1986; Lott et al., 1987; Magee et al., 1987; Suzuki et al., 1988; Lasker et al., 1989; Asakura et al., 1991; Vazquez et al., 1991; Magee et al., 1992; Millon et al., 1994; Pfaller et al., 1994; Barchiesi et al., 1995; Branchini et al., 1995; Lupetti et al., 1995; Berenguer et al., 1996; Espinel-Ingroff et al., 1996). Este método mostrou poder discriminatório superior em comparação com RFLP sem hibridização, durante ensaios isolados independentes (Vasquez et al., 1991; Rosa et al., 1999).

Contudo, sua eficiência em agrupar linhagens moderadamente relacionadas não foi avaliada cuidadosamente. Outras indicações sugerem que a CE não pode cumprir os requerimentos necessários para análises de DNA “fingerprinting” em *C. albicans*, uma vez que estas leveduras podem apresentar reorganizações cromossômicas com altas ou baixas frequências que, conseqüentemente, induzem alterações cariotípicas elevadas ou reduzidas, respectivamente (Ramsey et al., 1994).

Em adição aos estudos sobre alterações cariotípicas com frequências elevadas ou reduzidas em *C. albicans*, foi demonstrado que os padrões cariotípicos em linhagens variantes (switching) podem divergir e em outra ocasião convergir (Ramsey et al., 1994;

Rustchenko-Bulgac, 1991; Rustchenko-Bulgac, 1990). As alterações cariotípicas de alta frequência em *C. albicans* podem interferir com a capacidade de discriminar linhagens moderadamente relacionadas e não relacionadas, porém a CE pode ser empregada eficazmente para avaliar microevolução dentro de uma linhagem infectante (Lockhart et al., 1995).

Outros fatores que têm limitado o emprego de PFGE são o elevado custo e o tempo relativamente longo para a realização dos ensaios que, conseqüentemente, reduz a capacidade laboratorial em analisar grandes números de amostras (Reiss et al., 1998; Olive, 1999). Ademais, uma versão modificada da CE tem fornecido uma melhor efetividade ao método, a fim de cumprir os requerimentos necessários. O poder de resolução da cariotipagem tem aumentado pela digestão do DNA cromossômico de linhagens de *Candida* spp.. Com enzimas de restrição, tais como SfiI, NotI e BssHII, previamente aos ensaios de eletroforese em gel de campo-pulsado (Branchini et al., 1994; King et al., 1995; Lischewski et al., 1995; Cormican et al., 1996; Defontain et al., 1996; Diekema et al., 1997; Pontieri et al., 1996; Reiss et al., 1998).

1.4- Sensibilidade de *Candida* spp. à terapia antifúngica

A variedade de apresentações da candidíase e a variabilidade de comportamento das diferentes espécies de *Candida* evidenciou a necessidade de utilização de diferentes diagnósticos e esquemas terapêuticos (Crocco et al., 2004).

O tratamento e o controle da recorrência dos episódios de candidíase em lesões, pouco extensas, podem ser exclusivamente tópico, empregando a nistatina suspensão oral ou outras opções como o clotrimazol comprimidos para dissolver na boca e o miconazol gel. Não havendo resposta adequada ou, na presença de lesões extensas, está indicado o tratamento sistêmico, que pode ser realizado com fluconazol. Esta tem sido a droga mais utilizada em razão de sua boa absorção, baixa toxicidade e disponibilidade para uso oral e endovenoso. Já o cetoconazol e o itraconazol, por via oral, têm sido menos utilizado, o primeiro devido à sua toxicidade hepática e pela contra-indicação em associações com

diversos medicamentos, inclusive com anti-retrovirais e o itraconazol, apesar da baixa toxicidade apresenta diversas interações medicamentosas desfavoráveis. A anfotericina B, para uso endovenoso, está estritamente reservada aos casos graves, por causa das freqüentes reações adversas (Schechter et al., 2004). Novas drogas antifúngicas como a caspofungina estão sendo empregadas em protocolos recentes (Bachmann et al., 2002; Pfaller et al., 2003), entretanto ainda não são utilizadas na prática clínica devido ao elevado custo.

O tratamento da candidíase oral em geral é instituído empiricamente, porém é importante lembrar que essa infecção pode apresentar-se com sintomas e aparência macroscópica bastante variável (Schechter et al., 2004). Esse polimorfismo exigiria do clínico a necessidade de adequação da terapêutica, contudo o tratamento medicamentoso utilizado na candidíase orofaríngea, em pacientes infectados pelo HIV, é instituído empiricamente e muitas vezes por tempo prolongado. Este fato contribui para o aparecimento de espécies de leveduras resistentes (Powderly et al., 1993). Este fato, aliado à pouca disponibilidade de novos produtos desenvolvidos pela indústria farmacêutica tem motivado vários estudos sobre a susceptibilidade *in vitro* dos fungos agentes de infecções humanas, principalmente em imunocomprometidos (Rex et al., 1995b; Bachmann et al., 2002).

Muitas das espécies não-*albicans* mais comumente isoladas são menos susceptíveis aos derivados azólicos, dificultando o tratamento dessas infecções. Embora a susceptibilidade das leveduras do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis seja variável e previsível, nem sempre uma determinada amostra isolada segue o padrão geral. Essa é uma das razões da crescente importância dos testes de susceptibilidade. O esforço para a padronização desses testes culminou na elaboração da metodologia M27-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (Rex et al., 2000; NCCLS, 1995), atualmente denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e substituído pela metodologia M27-A2 (CLSI, 2005).

Os testes *in vitro* para sensibilidade da *Candida* aos antifúngicos foram padronizados e apresentam boa correlação entre os resultados *in vitro* e a resposta clínica dos pacientes com candidíase (Colombo et al., 1995)

Estudos recentes descreveram uma mudança na flora de *Candida da boca* de pacientes HIV positivo (Nguyen et al., 1996; Nho et al., 1997). Esta mudança foi associada ao uso de agentes antifúngicos, principalmente com o uso de fluconazol, antifúngico de escolha preliminar na terapia de infecções fúngicas em pacientes HIV positivo (Ghannoum e Rice 1999). Entretanto, um número crescente dos pacientes com resistência clínica a este antifúngico azólico foi observado (Le Guennec et al., 1995).

C. albicans é usualmente sensível a todas as drogas de uso sistêmico, porém casos de resistência adquirida a azólicos têm sido descritos, principalmente em indivíduos que foram expostos por tempo prolongado a estes antifúngicos. A resistência à anfotericina B é rara (Sanglard, 2002).

Amostras clínicas de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são sensíveis à anfotericina B e aos triazólicos (Colombo et al., 1995; Sanglard et al., 2002; Goldani et al., 2003). *C. krusei* apresenta resistência natural ao fluconazol, o que talvez explique seu aumento em pacientes neutropênicos expostos a este antifúngico (Wingard et al., 1995). *C. glabrata* pode adquirir resistência ao longo da exposição ao fluconazol. Conseqüentemente, um aumento nos índices de colonização ou de infecção por *C. glabrata* tem sido observado em diferentes grupos de pacientes submetidos à exposição prolongada a este antifúngico (Pfaller, 1996). Menor susceptibilidade perante a anfotericina B também vem sendo documentada em relação a esta espécie (Voss et al., 1996). As amostras clínicas de *C. lusitaniae* apresentam, com freqüência, resistência natural à anfotericina B ou a desenvolve rapidamente, mas são sensíveis aos triazólicos (Merz, 1984). Existem relatos de resistência *in vitro* de amostras clínicas de *C. guilliermondii* perante a anfotericina B, assim como de má resposta clínica de pacientes tratados com este poliênico (Hazen, 1995). *C. dubliniensis* parece ser menos patogênica que a *C. albicans*, porém tem maior facilidade de desenvolver resistência aos azólicos (Kromery e Barnes, 2002).

São poucos os trabalhos que avaliaram a colonização da cavidade oral de pacientes HIV positivo em uso de TARV, por *Candida spp.*, especialmente no Brasil. Não existe relato descrito na literatura brasileira e mundial que compare dados epidemiológicos e clínicos de pacientes HIV positivos em uso de TARV, que apresentam presença e ausência de colonização oral por *Candida spp.*.

Sendo assim, o presente estudo transversal teve como principal objetivo avaliar a incidência de colonização por *Candida* em pacientes com infecção pelo HIV em uso de TARV, comparando os resultados dos grupos de pacientes colonizados e não colonizados, assim como estudar os aspectos microbiológicos das leveduras do gênero *Candida* isolados da cavidade oral destes pacientes.

2- OBJETIVOS

Objetivo geral

- Estudar a colonização por leveduras do gênero *Candida* em cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV em uso de TARV.

Objetivos específicos

- Estudo epidemiológico e clínico dos pacientes.
- Estudo microbiológico das leveduras do gênero *Candida*.

3- PACIENTES E MÉTODOS

3.1- População do estudo

O Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) é uma unidade vinculada à Administração do Conselho Superior da Universidade ligada à Reitoria e à Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (FCM), para fins de ensino, pesquisa e prestação de ações e serviços de saúde de alta complexidade, destinados à comunidade.

Atualmente, o HC/Unicamp conta com uma capacidade física para 403 leitos e área construída de 65.000m². São mais de 4 mil metros em corredores distribuídos em 7 blocos interligados, por onde circulam mais de 10 mil pessoas diariamente.

Compreende um universo de ambulatórios clínicos e laboratórios de diagnóstico/pesquisa, dentre os quais está o Laboratório de Epidemiologia Molecular e Fungos, onde foi realizado o estudo microbiológico do presente trabalho¹.

Foram estudados pacientes com infecção pelo HIV em uso de TARV, acompanhados no Ambulatório Geral de Infectologia no HC/Unicamp e no Ambulatório do Grupo de Pesquisa Clínica da Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) da Disciplina de Infectologia da FCM/Unicamp, no período de agosto de 2003 a abril de 2004.

Os pacientes receberam TARV, segundo as “Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV” do Ministério da Saúde, 2004.

3.2- Metodologia do estudo

Foi realizado estudo transversal de informações dos pacientes e seus prontuários, para estudo epidemiológico e clínico e de coleta de material clínico para estudo microbiológico.

¹ <http://www.hcunicamp.br>

3.2.1- Estudo epidemiológico e clínico

O estudo epidemiológico e clínico foi projetado de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Brasil, 1996) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp, no qual os pacientes foram submetidos a exame clínico e coleta de material da cavidade oral.

Os pacientes voluntários do estudo, assinaram um Termo de Consentimento Informado (Apêndice 1) e foi preenchida uma Ficha Clínica (Apêndice 2), que compreendia dados demográficos, epidemiológicos e clínicos.

O estudo comparou dois grupos de pacientes de acordo com a presença ou ausência de isolamento de *Candida* spp. em cavidade oral.

Foi realizada revisão dos prontuários do HC/Unicamp dos pacientes incluídos no estudo, para avaliar as seguintes variáveis: gênero, idade, raça, ano de diagnóstico da infecção pelo HIV, tipo de exposição ao HIV, carga viral, contagem de linfócito TCD4⁺, infecções oportunistas, classificação clínica da infecção pelo HIV, terapia anti-retroviral e terapia antifúngica.

Gênero

Masculino e feminino.

Idade

Foi considerada a idade da ocasião do exame clínico e da coleta de material da cavidade oral. Foram estudados pacientes maiores de 15 anos. Os intervalos das idades dos pacientes estudados foram de 15 a 30, 31 a 40, 41 a 50 e 51 a 80 anos.

Raça

As raças estudadas foram branca, negra e parda, segundo o prontuário de pacientes do HC/Unicamp, conforme a classificação demográfica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)².

² <http://www.ibge.gov.br>

Ano de diagnóstico da infecção pelo HIV

Foi considerado o ano do diagnóstico da infecção pelo HIV constante no prontuário, que foi de 1983 a 2003.

Tipo de exposição ao HIV

As formas de transmissão do HIV foram definidas em: sexual, sexual e usuários de drogas injetáveis (UDI), receptores de sangue ou hemoderivados e vertical (da mãe para o filho, durante gestação, parto ou aleitamento).

Carga viral e contagem de linfócito TCD4⁺

Foi considerada a quantificação viral do HIV e a contagem de linfócito TCD4⁺ do momento do exame clínico e da coleta de material ou até no máximo quatro meses antes desta avaliação.

A quantificação da carga viral plasmática foi estudada da seguinte forma: detectável (≥ 50 cópias/mL) e indetectável (< 50 cópias/mL), pelo teste VERSANT HIV-1 RNA 3.0, através da técnica de bDNA, utilizando o sistema automatizado 340 BAYER[®] (equipamento e software), do Laboratório de Pesquisa em Aids do HC/Unicamp.

Para análise de linfócito TCD4⁺, foram considerados os seguintes intervalos de contagem de células: $> 350/\text{mm}^3$, entre 200 e $350/\text{mm}^3$ e $< 200/\text{mm}^3$, pelo teste de citometria de fluxo do sistema Becton, Dickison and Company (BD Biosciences[®]), através do sistema de marcadores celulares para três fluorocromos, utilizando o modelo BD FACS CALIBUR e software MultiSET, do Laboratório de Pesquisa em Aids do HC/Unicamp.

Infecções oportunistas (IO)

Foram coletados dados referentes às IO que ocorreram até o momento da coleta de dados. As IO foram classificadas em:

Fúngicas (pneumocistose, candidíase oral, candidíase esofágica e candidíase vaginal, criptococose, histoplasmose, paracoccidiodomicose, aspergilose, onicomiose, dermatofitose e pitiríase versicolor); *Virais* (citomegalovirose, herpes zoster, herpes simples e leucoencefalopatia multifocal progressiva); *Bacterianas* (tuberculose,

micobacteriose atípica, salmonelose, pneumonia e sinusite); *Parasitárias* (toxoplasmose, criptosporidiose, isosporíase e doença de Chagas) e *Neoplasias* (sarcoma de Kaposi, linfomas não Hodgkin e neoplasias intraepiteliais anal e cervical).

Classificação clínica da infecção pelo HIV no momento da coleta

Este dado foi avaliado segundo a categoria clínica do paciente classificada em A, B e C e a contagem de linfócito TCD4⁺, considerando intervalos de contagem de células $\geq 500/\text{mm}^3$, entre 200 e $499/\text{mm}^3$ e $< 200/\text{mm}^3$, segundo o “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) (1993) (Tabela 1).

O diagnóstico de aids foi realizado conforme definição dos critérios de casos de aids em indivíduos com 13 anos de idade ou mais, descritos na publicação do Ministério da Saúde (Brasil, 2004).

Tabela 1- Classificação clínica do CDC para a infecção pelo HIV.

Contagem CD4 ⁺	Categoria Clínica		
	A Assintomático PIA/HIV ¹ ,LPG ²	B Sintomático não A não B	C Condições indicadoras aids
$\geq 500/\text{mm}^3$	A1	B1	C1
200 a $499/\text{mm}^3$	A2	B2	C2
$< 500/\text{mm}^3$	A3	B3	C3

1 Primoinfecção aguda/HIV

2 Linfadenopatia progressiva generalizada

Na evolução da infecção, uma vez que um indivíduo tenha tido uma condição clínica na categoria B, não poderá ser classificado de novo na categoria A, quando aquela condição clínica se resolva; o mesmo é verdadeiro para a categoria C, em relação à categoria B.

Terapia anti-retroviral

Para fins da análise dos anti-retrovirais, foi analisado o esquema terapêutico utilizado pelo paciente no momento do exame clínico e da coleta de material. A TARV foi classificada pelo grupo da droga, a saber:

Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo – NRTI

(Abacavir – ABC, Didonasina – ddI, Estavudina – d4T, Lamivudina – 3TC, Tenofovir – TDF, Zalcitabina – ddC, Zidovudina – AZT)

Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo – NNRTI

(Delavirdina – DLV, Efavirenz – EFV, Nevirapina – NVP)

Inibidores da protease – IP

(Amprenavir – APV, Atazanavir – ATV, Indinavir – IDV, Lopinavir/r – LPV/r, Nelfinavir – NFV, Ritonavir – RTV, Saquinavir – SQV)

Inibidores da fusão

(Enfuvirtide – T20)

Terapia antifúngica

Foram avaliados o uso prévio e atual dos antifúngicos, a saber: anfotericina B, nistatina, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e miconazol.

3.2.1.1- Análise estatística

A análise estatística do estudo epidemiológico e clínico do presente estudo foi realizada pela Comissão de Pesquisa Estatística da FCM/Unicamp, através do programa computacional The SAS System for Windows (Statistical Analysis System) versão 8.02, 2001 e spss evaluation versão 16.0.

As metodologias utilizadas (Conover, 1971; Fleiss, 1981; Fonseca et al., 1994), seguem abaixo:

Para comparar as variáveis contínuas entre o grupo colonizado e não colonizado por *Candida* spp. na cavidade oral foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para comparar as variáveis categóricas entre o grupo colonizado e não colonizado por *Candida* spp. na cavidade oral foi utilizado os testes exato de Fisher e Qui-Quadrado.

O nível de significância utilizado foi de 5% (p-valor < 0,05).

3.2.2- Estudo microbiológico

3.2.2.1- Coleta das amostras

Foi coletada uma amostra por paciente, no momento único, com *swab* umedecido em água destilada esterilizada e friccionado sobre toda a superfície da cavidade oral. Posteriormente a amostra foi transportada ao Laboratório de Epidemiologia Molecular e Fungos da Disciplina de Infectologia do Departamento de Clínica Médica da FCM/Unicamp, para cultivo e isolamento imediato das leveduras do gênero *Candida*.

3.2.2.2- Isolamento das amostras

Os *swabs* contendo as amostras foram inoculados em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com cloranfenicol e as leveduras isoladas através da técnica de esgotamento, após incubação a 30°C durante 24 a 48 horas.

Cinco colônias foram selecionadas e transferidas individualmente para a superfície do meio de cultura contendo CHROMagar *Candida*[®] (CHROMagar Microbiology, Paris, França), seguido de incubação a 30°C durante 96 horas (Odds e Bernaerts, 1994). Colônias de cores e/ou tonalidades diferentes foram reisoladas, separadamente, em ASD e incubadas a 30°C, durante 24 a 48 horas, para que se proceda a identificação das leveduras.

3.2.2.3- Identificação de leveduras do gênero *Candida*

A triagem fenotípica de *C. albicans* e *C. dubliniensis* foi realizada a partir das amostras de tonalidade verde no CRHOMagar Candida[®], as quais foram submetidas à prova do tubo germinativo, teste do crescimento a 42°C e a assimilação de xilose.

A prova do tubo germinativo foi realizada a partir de um inóculo da levedura, previamente cultivado em ASD a 30°C, durante 24 a 48 horas, em 0,5 mL de soro fetal bovino. Após incubação a 37°C, durante 2 a 3 horas, uma gota da suspensão foi removida para preparo tipo lâmina-lamínula, para observação microscópica. O tubo germinativo positivo apresentou um filamento fino e cilíndrico sem nenhuma zona de constricção do blastoconídeo da levedura (Cidrim e Moreira, 1999), no qual foi verificado em ambas as leveduras.

Para o teste de crescimento a 42°C foi semeada uma unidade formadora de colônia (UFC) em ASD sob a forma de três estrias descontínuas em três quadrantes. As placas foram incubadas a 42°C e a leitura foi realizada após 48 horas de incubação. O teste positivo sugere *C. albicans* e o negativo para *C. dubliniensis* (Milan, 2001).

Com a finalidade de verificar a capacidade de assimilação de carboidratos, em especial a xilose, como única fonte de carbono foi preparada uma suspensão da levedura, previamente cultivada em ASD a 30°C, durante 24 a 48 horas, em 2mL de água destilada estéril com turvação equivalente ao tubo 5 da escala de McFarland. Posteriormente, 1mL da suspensão foi transferido para placas de Petri de 90 X 15 mm de diâmetro, contendo 20mL do meio basal, resfriado entre 45 a 50°C. Após homogeneização, esperou-se total solidificação. Com o auxílio de espátulas de plástico estéreis, alíquotas de açúcares (xilose e dextrose) padronizadas foram depositadas sobre a superfície do meio. As placas foram incubadas a 30°C, durante 48 horas, com a face do meio que contém os açúcares voltada para cima. O teste foi considerado positivo para cada carboidrato, quando observada uma zona de crescimento macroscópico em torno do local onde foi depositado o açúcar. Sendo assim, a formação da zona de crescimento em torno da xilose identificou *C. albicans* e a ausência *C. dubliniensis*. Todas as leveduras assimilam dextrose, logo, este

açúcar fez parte do teste como um controle positivo, para avaliar a viabilidade da levedura (Lacaz et al., 1984; Cidrim e Moreira, 1999).

Amostra de *C. albicans* do “American Type Culture Collection” (ATCC) 76615 e *C. dubliniensis* do “Centraalbureau voor Schimmelcultures” (CBS) 7987 foram utilizadas como controle para a prova do tubo germinativo, teste de crescimento a 42°C e assimilação de xilose.

A identificação das espécies de *Candida* não-*albicans* foi realizada através da análise do perfil bioquímico pelo sistema ID 32 C (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França). Foi preparada uma suspensão da levedura, previamente cultivada em ASD a 30°C, durante 24 a 48 horas, em água destilada estéril com turvação equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland. Posteriormente, foi aspirado 250µL da suspensão e inoculado em uma ampola contendo o meio C, seguido de uma delicada homogeneização. Finalmente, 135µL do conteúdo da ampola foi pipetado em cada cúpula da galeria, que foi posicionada em uma câmara úmida e incubada a 30°C. A avaliação foi realizada diariamente, com leitura final às 48 horas, sendo a positividade indicada pelas cúpulas que apresentaram turvação superior àquela do controle negativo (Fricker-Hidalgo et al., 1996). A identificação das amostras foi obtida pela definição de código numérico gerado pela presença ou ausência de crescimento em cada cúpula, cuja interpretação foi realizada com a ajuda da Tabela de Identificação e do Catálogo Analítico, fornecidos pelo fabricante.

3.2.2.4- Sorotipagem de *C. albicans*

A determinação dos sorotipos de *C. albicans* foi realizada através de aglutinação em placa, pelo sistema Candida Check[®] (Iatron Laboratories, Tokio, Japão). Foram utilizadas amostras controle de cepas padrão de *C. albicans* ATCC[®] 28367, sorotipo A e *C. albicans* ATCC[®] 44373, sorotipo B, como controle.

Para cada levedura, previamente cultivadas em ASD e incubadas a 30°C, durante 24 a 48 horas, foi realizada uma suspensão em 1mL de solução salina estéril, com turvação equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland. Em seguida, 20µL desta suspensão

foi adicionada em um campo da placa de aglutinação para o teste e 20µL em um outro campo para o controle negativo. No campo teste foi adicionada uma gota do reagente “fator 6” (antideterminante antigênico A de *C. albicans*) e no campo controle negativo 20µL de solução salina. A placa foi movimentada gentilmente de modo circular por até 2 minutos. A leitura foi realizada sob fonte de luz, utilizando-se campo escuro para contraste. A presença de aglutinação foi interpretada pela visualização de grumos na suspensão, indicativa de *C. albicans* sorotipo A, enquanto a ausência de aglutinação foi interpretada como *C. albicans* sorotipo B (Sant’Ana et al., 2002). A visualização de grumos indicativos de aglutinação no campo controle negativo significou que a amostra da levedura em questão era auto-aglutinante. Nesse caso, o teste ficaria descaracterizado, não se podendo definir o sorotipo da amostra, utilizando-se este método (Brawner, 1991).

3.2.2.5- Seqüenciamento de isolados de *Candida* spp.

Foram seqüenciadas leveduras do gênero *Candida* que apresentaram tonalidade verde no CRHOMagar Candida[®], tubo germinativo positivo, crescimento a 42°C negativo ou com leve crescimento e assimilação de xilose negativa.

As amostras, armazenadas a -70°C em meio “yeast extract peptone dextrose” (YEPD) com 20% de glicerol, foram cultivadas e isoladas através da técnica de esgotamento, em ASD a 30°C por 48 horas, para confirmação da viabilidade e pureza. Posteriormente, as colônias viáveis, puras e isoladas foram cultivadas em ASD a 30°C por 48 horas.

A extração do DNA genômico foi realizada, utilizando o protocolo INSTAGENE MATRIX (Bio Rad, Co, USA), de acordo com instruções do fabricante e descrito a seguir:

Em tubo de 1,5mL foi ressuspendido uma alçada de colônias em 1mL de água destilada. Após centrifugação por 1 minuto a 10.000 rpm, o sobrenadante foi removido. Foi adicionado ao sedimento 200µL de “Instagene Matrix”, seguido de gentil mistura e incubação a 56°C por 15 a 30 minutos. Posteriormente foi realizada homogeneização no

vórtex por 10 segundos e os tubos foram colocados a 100°C ou fervidos por 8 minutos. Novamente foi realizada homogeneização no vórtex por 10 segundos, seguida de centrifugação a 10.000rpm por 2 a 3 minutos. Foram utilizados 20µL do sobrenadante para uma reação de polimerização em cadeia (Polymerase Chain Reaction – PCR) de 50µL. O restante do sobrenadante foi estocado a -20°C. Ao reutilizá-lo prosseguir com a vortexação por 10 segundos e centrifugação a 10.000rpm por 2 a 3 minutos em diante.

Para a reação de PCR foi utilizado o par de iniciadores, segundo Kurtzman e Robnett (1997): NL-1 5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG e NL-4 5' GGTCGG TGTTTCAAGACGG. Foi utilizada a PCR Ready-To-Go (Pharmacia Biotech) e a reação foi feita para um volume final de 25µL, sendo: 2,5µL de cada primer (20pmol), 8µL do DNA, 12µL de água destilada e uma pérola beads. As condições para amplificação foram 36 ciclos de: denaturação a 94° C durante 1 minutos, seguida de anelamento a 52° C durante 2 minutos e finalizando com extensão a 72° C durante 2 minutos. O estoque foi feito em geladeira.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese gel de agarose 1,5%, 100V por 90 minutos. Finalizada a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (0.5µg/mL) durante 30 minutos e fotografado em filme Polaroid 667 3 ¼ X 4 ¼ com luz ultravioleta. Foi utilizado como controle o marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

O material de PCR foi purificado, utilizando-se as colunas GFX PCR DNA Purification Kit (Amersham Biosciences) conforme instruções do fabricante que foram descritas a seguir: Foi utilizada uma coluna GFX para cada amostra de PCR a ser purificada. Foram adicionados 500µL do tampão “Capture Buffer” na coluna GFX. O produto de PCR foi transferido para a coluna GFX. Os produtos foram homogeneizados com a pipeta, seguido de centrifugação entre 10.000 a 12.000rpm por 45 segundos. O sobrenadante foi descartado e a coluna GFX foi colocada dentro de um tubo próprio para a coluna GFX, que faz parte do Kit. Foram adicionados 500µL do tampão “Wash Buffer” dentro da coluna, seguido de centrifugação em 10.000 a 12.000rpm por 45 segundos. O sobrenadante foi descartado e a centrifugação repetida. Em seguida o tubo foi descartado e a coluna GFX transferida para um tubo do tipo “eppendorff” 1,5mL. Foi aplicado 50µL do

tampão “Elution buffer” (10mM Tris-HCl pH 8.0, TE pH 8.0 ou água destilada) diretamente sobre a matriz “glass fiber” da coluna GFX.

Para uma melhor otimização dos produtos utilizados na reação de seqüenciamento, as amostras de PCR tiveram o seu DNA quantificado com “Low Mass Loader” (Invitrogen). O procedimento consistiu em se aplicar em gel de agarose 1,5%, 2µl da amostra com 2µl do produto “Low Mass Loader”, juntamente com 2µl de bromofenol a 100V por 40 min.

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado: 10ng de DNA, 1µL do primer NL-1 (1.6pmol), 1µL do Big Dye (versão 3.0), 1v Tampão Save 2,5X água destilada (ajustando para um volume final de 10µL). As condições do seqüenciamento foram: denaturação inicial de 96° C por 1 min; 30 ciclos de denaturação 96° C por 15 segundos, anelamento de 50° C por 15 segundos e extensão de 60° C por 15 segundos; e rampa 1° C/segundo.

O material da reação de seqüenciamento foi purificado com etanol 100% e compreendeu as seguintes etapas: Foram adicionados 32µL de etanol 100% com 8µL de água em cada tubo da reação. Foi homogeneizado no vórtex por 10 segundos e em seguida, mantido por 20 minutos na temperatura ambiente. Posteriormente foi dado um “spin”. O material dos tubos foi colocado em placa “septa” e centrifugado em centrífuga de placa por 50 minutos 5000g. A placa “septa” foi invertida em papel toalha e quando necessário foi dado um “spin” invertido de 7 segundos a 200rpm. Foram colocados 100µL de etanol 70%, seguido de centrifugação por 20 minutos a 5000g. Foi dado “spin” invertido de 7 segundos a 200rpm e a placa septa foi secada na máquina de PCR a 65° C por 10 min. Posteriormente, foram colocados 10µL de formamida HI-DI em cada reação e dado um “spin”. Precedeu-se com a denaturação na máquina de PCR por 5 minutos a 94° C e em seguida foi colocado no gelo por 1 minuto. Finalmente a placa “septa” foi colocada no aparelho de seqüenciador.

O seqüenciamento foi realizado no aparelho ABI PRISM 3100® GENETIC ANALYZER, conforme instruções do fabricante (Applied Biosystems, USA).

Após o seqüenciamento, a análise das seqüências foi realizada com base nas informações do National Center for Biotechnology Information (NCBI)³, para onde foram enviadas as seqüências de bases de nucleotídeos do fragmento, obtidas no processo de seqüenciamento de cada amostra. Foi utilizado o serviço “blast” (“Basic Local Alignment Search Tool”). Esta ferramenta se caracteriza por programas de procura de similaridade que são designados para identificar e classificar homólogos em potencial para uma determinada seqüência de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos (Altschul et al., 1997; Benson et al., 2002; Pertsemilidis e Fondon, 2002).

3.2.2.6- Tipagem molecular de *Candida* spp.

O estudo do perfil genômico de leveduras do gênero *Candida* foi realizado por PFGE, usando o sistema CHEF, segundo o método preconizado por Branchini et al., 1995.

As amostras, armazenadas a -70°C em meio YEPD com 20% de glicerol, foram cultivadas e isoladas através da técnica de esgotamento, em ASD a 30°C por 48 horas, para confirmação da viabilidade e pureza.

Posteriormente, as colônias viáveis, puras e isoladas foram cultivadas em ASD a 30°C, por 48 horas. Cinco a dez colônias foram inoculadas em 10mL do meio YEPD e mantidas sob agitação a 30°C “*overnight*”.

Após a preparação do inóculo, as leveduras foram submetidas a uma lavagem rigorosa. As células foram centrifugadas a 4°C, por 10 a 15 minutos, a 3.000rpm. O sobrenadante foi desprezado e posterior homogeneização das células foi realizada no vórtex. Foram transferidos 150µL da mistura para um tubo de “*eppendorf*”, o qual foi submetido a uma rápida centrifugação por 2 minutos. Com o auxílio de uma pipeta semi-automática, o sobrenadante foi aspirado. Junto às células, foi adicionado 150µL de 50mM EDTA, pH 8,0, seguido de homogeneização no vórtex. Novamente, o tubo de “*eppendorf*” foi submetido a uma rápida centrifugação por 2 minutos e o sobrenadante foi aspirado, com o auxílio de uma pipeta semi-automática.

³ <http://www..ncbi.nlm.nih.gov>

Para a obtenção do material genômico das leveduras, foi adicionado às células 80µL de lyticase, seguida de gentil homogeneização no vórtex e posterior incubação da mistura a 37°C por 20 minutos. Agarose Low Melt 1% foi fundida e resfriada a 58°C e 560µL desta foi acrescentada à mistura. Foi realizada homogeneização, cuidadosamente, e posterior transferência para moldes Bio-Rad®, que foram mantidos sob refrigeração a 4°C, durante 20 minutos. Após a solidificação dos blocos contendo DNA, os mesmos foram removidos dos moldes e transferidos para placas de cultura de células contendo 1,5mL de Tampão NET-PROK e incubados a 50°C “overnight”.

Posteriormente, foram realizadas quatro lavagens consecutivas com 3mL de 50mM EDTA, pH 8,0, cada uma com duração de 15 a 60 minutos, à temperatura ambiente, exceto a última que foi “overnight”. Em seguida, foram realizadas mais duas lavagens consecutivas com 3mL de 50mM EDTA, pH 8,0, cada uma com duração de 15 a 60 minutos, à temperatura ambiente e os blocos foram armazenados em tubos de polietileno, contendo 3mL de 50Mm EDTA, pH 8,0, durante 6 meses.

A CE foi realizada pelo sistema CHEF DR-III em 2.200mL de tampão TBE 0.5X, com intervalos de incidência da corrente elétrica no gel de agarose a 0,8% de 120 a 120 segundos por 18 horas no bloco 1 e de 240 a 240 por 22 horas no bloco 2, em um ângulo de 120° e voltagem de 4,5volts/cm a uma temperatura de 14°C. Finalizada a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídio, durante 30 minutos e fotografado em filme Polaroid 667 3 ¼ X 4 ¼ com luz ultravioleta.

A determinação dos perfis genômicos das bandas de DNA genômico das leveduras do gênero *Candida* foi realizada pela comparação visual com o padrão de peso molecular da *Saccharomyces cerevisiae* (BioLabs®).

A similaridade entre os perfis genômicos foi demonstrada pelo coeficiente de DICE (intervalo de confiança de 95%), através dos programas Bio-1D e BioGene V (Vilber Loumat, Marnes la Valle, França).

3.2.2.7- Determinação da suscetibilidade de *Candida* spp. aos antifúngicos.

A determinação da sensibilidade das *Candida* spp. à terapia antifúngica foi baseada no método de referência para teste de microdiluição em caldo, de acordo com a norma aprovada na 2ª edição do CLSI, M27-A2 (2005)⁴.

Foram utilizadas cepas de controle de qualidade para a microdiluição em caldo *C. parapsilosis* ATCC® 22019 e *C. krusei* ATCC® 6258, e os testes foram realizados em duplicata.

Foi utilizado o meio RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, suplementado com glicose (2%) tamponado com 0,165M de ácido morfilenopropanosulfônico (MOPS). O pH da solução foi ajustado para 7,0 com 1mol/L NaOH, a esterilização foi realizada por filtração a vácuo e o armazenamento a 4°C, até o uso (Anexo 5).

Os antifúngicos avaliados foram anfotericina B (Sigma, Germany: A4888-1G), nistatina (Wako, Japão: 141-05381), 5-fluocitosina (Pfizer Pharmaceutica, 51k4021), fluconazol (Gerbras; São Paulo, SP, Brasil), cetoconazol (Galena; Campinas, SP, Brasil) e itraconazol (Jansen Pharmaceutica, Titusville, NJ, EUA).

Para preparo da solução estoque dos antifúngicos, foram dissolvidos 12,8mg de cada droga em 1,0mL de dimetil sulfoxido (DMSO).

Para preparo da placa de microdiluição foi realizada uma diluição seriada, na razão de 1:2 da solução estoque do antifúngico, com o objetivo de se obter dez concentrações que variaram de 1280µg/mL a 0,3µg/mL. Para anfotericina B, nistatina e cetoconazol essas concentrações variaram de 160 a 0,3µg/mL, para 5-fluocitosina e fluconazol de 640 a 1,25µg/mL e para itraconazol de 80 a 0,15µg/mL. Depois que os antifúngicos foram transferidos para a placa de microdiluição, verificou-se uma diluição de 1:10, resultando em concentrações que variaram de 16 a 0,03µg/mL para anfotericina B, nistatina e cetoconazol, de 64 a 0,125µg/mL para 5-fluocitosina e fluconazol e de 8 a 0,015µg/mL para itraconazol.

⁴ <http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi.asp>. 22/3/2006

As amostras, armazenadas a -70°C em meio YEPD com 20% de glicerol, foram cultivadas e isoladas através da técnica de esgotamento, em ASD a 30°C por 48 horas, para confirmação da viabilidade e pureza.

Posteriormente, as colônias viáveis, puras e isoladas foram cultivadas em ASD a 30°C , por 48 horas. Cinco colônias com diâmetro de $\cong 1\text{mm}$ foram suspensas em 5mL de solução salina 0,85% estéril. A suspensão foi agitada em vórtex e diluída 1:50 em solução salina 85% estéril. A contagem de células foi realizada em Câmara de Neubauer. A partir do número de células contadas foi realizada uma nova diluição, para que fosse obtida a concentração final de 1×10^4 UFC/mL. A concentração final foi obtida pela aplicação da fórmula: $N \times 10^4 \times 1/N = 1 \times 10^4$ UFC/mL. Depois que o inóculo foi transferido para a placa de microdiluição verificou-se, uma diluição de 1:10, resultando em um inóculo final de 10^3 UFC/mL.

O teste de microdiluição em caldo foi realizado em placas de microdiluição estéreis, descartáveis, com múltiplos poços (96 em formato reto). As concentrações dos antifúngicos foram dispensadas nos poços das fileiras 1 a 10, em volumes de 20 μL , com uma pipeta multicanal. A fileira 1 apresentou a maior concentração da droga e a fileira 10 a menor concentração da droga. Em seguida, 160 μL de RPMI foi adicionado em todos os poços da fileira 1 a 12. E finalmente, 20 μL do inóculo foi dispensado em todos os poços com exceção da fileira 12 utilizada como controle negativo. O poço da fileira 11 foi utilizado como controle positivo, isento apenas de drogas.

As placas de microdiluição foram incubadas a 35°C e a leitura da presença ou ausência de crescimento nos poços foi realizada em 24 e 48 horas com o auxílio de um espelho de leitura. O valor da CIM de anfotericina B e nistatina foi a menor concentração de antifúngico livre de crescimento da levedura. O valor de CIM de 5-FC e de azólicos foi a menor concentração do antifúngico que conseguiu inibir 50% do crescimento da levedura obtido no controle positivo.

Os isolados, cuja leitura precoce foi importante, foram os que apresentaram aumento dramático de CIM, das 24 horas para as 48 horas, devido ao crescimento residual (denominado *trailing*) e significativo (inibição parcial do crescimento, ao longo de um amplo intervalo de concentrações do antifúngico).

Os critérios para definição da sensibilidade ao fluconazol, itraconazol e 5-FC foram aqueles sugeridos pelo CLSI (2005). Para cetoconazol, anfotericina B e nistatina foi utilizado os critérios estabelecidos segundo a literatura (Milan, 2001; Wingeter et al., 2007; Rex et al., 1995a; Rex et al., 1995b), conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2- Interpretação dos valores de concentração inibitória mínima dos antifúngicos testados.

Antifúngicos	Suscetível (S)	Intermediário (I) ou Sensibilidade Dose-Dependente (S-DD)	Resistente (R)
Fluconazol	≤ 8	16 a 32	≥ 64
Itraconazol	≤ 0,125	0,25 a 0,5	≥ 1
Cetoconazol	≤ 0,125	0,25 a 0,5	≥ 1
5-Fluocitosina	≤ 4	8 a 16	≥ 32
Anfotericina B	≤ 1	–	≥ 2
Nistatina	≤ 4	8 a 32	≥ 64

4- RESULTADOS

4.1- População de estudo

Foram estudados 324 pacientes com infecção pelo HIV em uso de TARV, acompanhados no Ambulatório Geral de Infectologia e no UPC da Disciplina de Moléstias Infecciosas da FCM/Unicamp. O grupo que apresentou presença de crescimento de levedura no material clínico coletado da superfície da cavidade oral foi denominado grupo colonizado e o grupo que apresentou ausência de crescimento de levedura no material clínico coletado da superfície da cavidade oral foi denominado não colonizado.

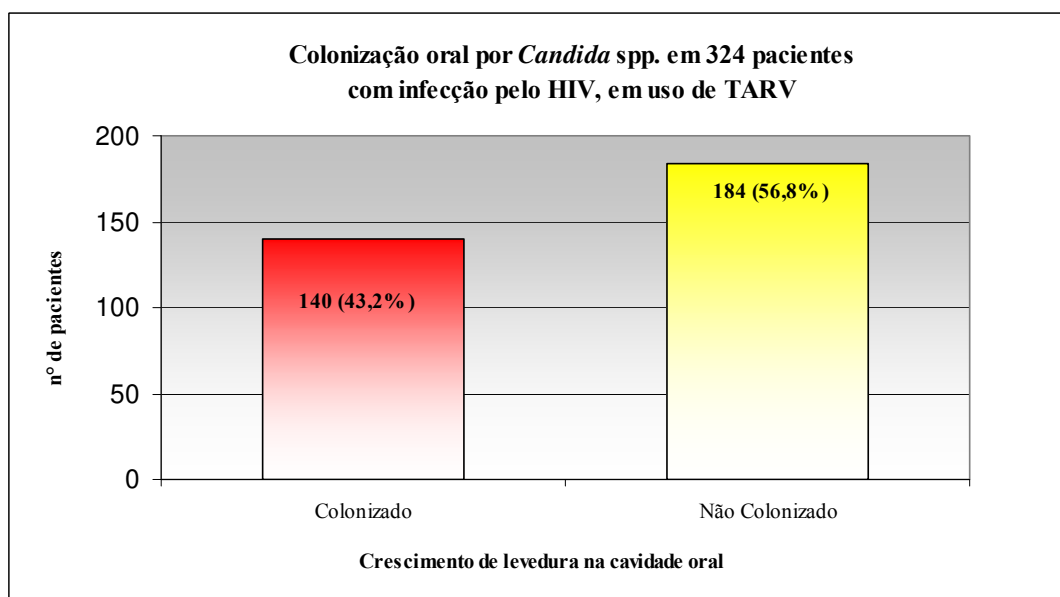


Figura 1- Caracterização da colonização por *Candida* spp. na cavidade oral de 324 pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

4.2- Estudo epidemiológico e clínico

A comparação dos dados epidemiológicos e clínicos (gênero, idade, raça, ano de diagnóstico da infecção pelo HIV, tipo de exposição ao HIV, carga viral, contagem de linfócito TCD4⁺, infecções oportunistas, classificação clínica da infecção pelo HIV, terapia anti-retroviral e terapia antifúngica) entre os grupos colonizados e não colonizados, demonstrou os resultados abaixo (Tabelas 3 a 14).

4.2.1- Gênero, idade, raça, tipo de exposição ao HIV e ano de diagnóstico

Tabela 3- Comparação das variáveis demográficas idade, gênero, raça, tipo de exposição ao HIV e ano de diagnóstico entre o grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

Dados Demográficos	Colonizado (140)		Não Colonizado (184)		Total (324)	p-valor
	n	%	n	%	n	
Idade						
Anos (Média)	39,75	-	38,26	-	38,90	0,157 ¹
Gênero						
Masculino	88	63	110	60	198	0,574
Raça						
Branca	107	76,5	152	83	259	
Parda e Negra	33	23,5	32	17	65	0,252
Tipo de exposição ao HIV						
Sexual	114	81,5	148	80,5	262	
Sexual + UDI	26	18,5	35	19	61	
Vertical	0	0	1	0,5	1	0,677
Ano de diagnóstico						
1983-1994	24	17	30	16	54	
1995-2003	116	83	154	84	270	0,841

Teste Qui-Quadrado = valor de p significativo (p-valor < 0,05).

¹ Teste Mann-Whitney = valor de p significativo (p-valor < 0,05).

4.2.2- Carga viral e contagem de linfócito TCD4⁺

A carga viral e a contagem de linfócito TCD4⁺ não constaram no prontuário médico de 6 dos 324 pacientes estudados, sendo 4 do grupo colonizado e 2 do grupo não colonizado.

Foi evidenciado que a presença de colonização foi significativamente maior em pacientes com carga viral detectável (p=0.002) e CD4⁺ < 200/mm³ (p=0.006), conforme demonstrado nas tabelas 4 a 6.

Tabela 4- Carga viral do HIV do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

Carga Viral	Colonizado (136)		Não Colonizado (182)		Total (318)	p-valor
	n	%	n	%	n	
Detectável	77	56,6	69	37,9	146	
Indetectável	59	43,4	113	63,1	172	0,002 *

Indetectável: carga viral < 50 cópias/mL Detectável: carga viral > 50 cópias/mL

Teste Qui-Quadrado = valor de p significativo (p-valor < 0,05).

Tabela 5- Média e mediana de contagem de linfócito TCD4⁺ do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

Colonização oral por <i>Candida</i> spp.	Contagem de linfócitos TCD4 ⁺						p-valor
	n (318)	Média	Mediana	D.P	Mínimo	Máximo	
Colonizado	136	380,73	326,50	255,16	2	1345	
Não Colonizado	182	471,48	410,50	306,02	16	1627	0,006 *

Teste Mann-Whitney = valor de p significativo (p-valor < 0,05).

Tabela 6- Comparação da carga viral do HIV e contagem de linfócito TCD4⁺ entre o grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

Dados demográficos	Colonizado (136)		Não Colonizado (182)		Total (318)	p-valor
	n	%	n	%	n	
CV indetectável						
Contagem de CD4+						
> 350/mm ³	35	26	71	39	106	
entre 200 a 350/mm ³	21	15	31	17	52	
< 200/mm ³	3	2	12	7	15	
Total	59	43	114	63	173	
CV detectável						
Contagem de CD4+						
> 350/mm ³	24	18	34	19	58	
entre 200 a 350/mm ³	25	18,4	21	11	46	
< 200/mm ³	28	20,6	13	7	41	
Total	77	57	68	37	145	
						0,001 *

Indetectável: carga viral < 50 cópias/mL Detectável: carga viral > 50 cópias/mL

* Teste Qui-Quadrado = valor de p significativo (p-valor < 0,05).

4.2.3- Infecções oportunistas

Não apresentaram IO, 28 (20%) dos 140 pacientes do grupo colonizado e 51 (27,7%) dos 184 do grupo não colonizado, os quais foram caracterizados como assintomáticos nos prontuários.

Não houve diferença significativa em relação à ausência e presença de infecções oportunistas fúngicas, quando comparado os dois grupos estudados. O mesmo foi evidenciado ao analisar a associação do número de infecções oportunistas causadas por fungos (Tabela 7).

Tabela 7- Comparação das infecções oportunistas fúngicas entre o grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

Infecções oportunistas Fungos	Colonizado (140)		Não colonizado (184)		Total (324)		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
Ausência	57	40,7	86	46,7	143	44,1	0,279
Presença	83	59,3	98	53,3	181	55,9	
1 infecção	49	59	61	62,2	110	60,8	0,902
2 a 3 infecções	31	37,4	34	34,7	65	35,9	
mais de 3 infecções	03	3,6	03	3,1	06	3,3	

Dentre as infecções fúngicas estudadas, a candidíase oral e a onicomicose merecem destaque, uma vez que mostraram valores de p próximos de serem significativos para o grupo colonizado (Tabela 8).

Tabela 8- Descrição das infecções oportunistas fúngicas do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

Infecções oportunistas Fungos	Colonizado (140)		Não colonizado (184)		Total (324)		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
Pneumocistose (PCP)	22	15,7	29	15,7	51	15,7	0,991
Candidíase oral	51	36,4	50	27,1	101	31,2	0,075
esofágica	11	7,8	14	7,6	25	7,7	0,934
vaginal	2	1,4	2	1,8	4	1,2	0,783
Criptococose	5	3,5	11	5,9	16	4,9	0,322
Histoplasmose	0	0	2	1	2	0,6	0,216
Paracoccidiodomicose	3	2,1	1	0,5	4	1,2	0,197
Aspergilose	1	0,7	2	1	3	0,9	0,729
Onicomicose	16	11,4	11	5,9	27	8,3	0,079
Dermatofitose	12	8,6	21	11,4	33	10,2	0,402
Pitíriase versicolor	5	3,5	7	12	12	3,7	0,912

*: Teste Qui-Quadrado, valor de p significativo (p-valor < 0,05).

Dentre as infecções oportunistas causadas por vírus, protozoários, bactérias e neoplasia, o herpes zoster e linfoma não Hodgkin foram as únicas que evidenciaram valores de p significativos para o grupo colonizado, de 0,006 e 0,021, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9- Descrição das infecções oportunistas causadas por vírus, bactérias, protozoários e neoplasias do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

Infecções Oportunistas	Colonizado (140)		Não Colonizado (184)		Total (324)		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
Vírus							
Citomegalovirose	5	3,5	4	2,2	9	2,7	0,448
Herpes zoster	32	22,8	21	11,4	53	16,3	0,006 *
Herpes simples	3	2,1	6	3,3	9	2,7	0,544
LEMP	0	0	3	1,6	3	0,9	0,129
Bactérias							
Tuberculose	35	25	33	17,9	68	20,9	0,122
Micobacteriose atípica	4	2,8	3	1,6	7	2,1	0,452
Pneumonia e sinusite	1	0,7	6	3,3	7	2,1	0,118
Salmonelose	2	1,4	0	0	2	0,6	0,104
Protozoários							
Toxoplasmose	20	14,2	18	9,8	38	11,7	0,212
Criptosporidiose	4	2,8	3	1,6	7	2,1	0,452
Isosporíase	3	2,1	1	0,5	4	1,2	0,197
Doença de Chagas	1	0,7	2	1,1	3	0,9	0,729
Neoplasias							
Sarcoma de Kaposi	3	2,1	3	1,6	6	1,8	0,735
Linfoma não Hodgkin	4	2,8	0	0	4	1,2	0,021 *
Neoplasias (outras)	2	1,4	2	1,1	4	1,2	0,783

*: Teste Qui-Quadrado, valor de p significativo (p-valor < 0,05).

** : Teste Exato de Fisher, valor de p significativo (p-valor < 0,05).

4.2.4- Classificação clínica da infecção pelo HIV, no momento da coleta

O presente trabalho não evidenciou diferença significativa na classificação clínica da infecção pelo HIV, quando comparado os dois grupos estudados, e verificou o predomínio da classificação clínica C3 em ambos, conforme relatado na tabela 10.

É importante relatar que o uso de TARV pelos pacientes com classificação clínica A1, no presente estudo, foi justificado pela gestação e/ou pela indicação médica.

Tabela 10- Classificação clínica da infecção pelo HIV do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

Categoria clínica / Contagem de CD4 ⁺	Colonizados (140)		Não Colonizados (184)		Total (324)		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
A							
1	6	4,3	10	5,4	16	4,93	
2	15	10,7	40	21,8	55	16,97	
3	13	9,3	18	9,8	31	9,6	
Total	34	24,3	68	37	102	31,5	
B							
1	0	0	0	0	0	0	
2	8	5,7	11	6	19	5,9	
3	14	10	15	8	29	8,9	
Total	22	15,7	26	14	48	14,8	
C							
1	0	0	1	0,6	1	0,3	
2	2	1,4	6	3,3	8	2,5	
3	82	58,6	83	45,1	165	50,9	
Total	84	60	90	49	174	53,7	0,143

Categoria clínica: A (assintomático/infecção aguda), B (candidíase oral e orofaringe) e C (infecções oportunistas)

Contagem de linfócito T CD4⁺: 1 ($\geq 500/\text{mm}^3$), 2 (200 a 499 mm^3) e 3 ($< 200/\text{mm}^3$)

Teste Qui-Quadrado, valor de p significativo (p-valor $< 0,05$).

4.2.5- Terapia anti-retroviral

Verificou-se que os esquemas anti-retrovirais mais utilizados foram 2 NRTI + 1 IP e 2 NRTI + 1 NNRTI e que não houve diferença significativa quanto ao uso de TARV com IP, em ambos os grupos, conforme descrito nas tabelas 11 e 12, respectivamente.

Tabela 11- Esquema terapêutico anti-retroviral do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV, no momento da coleta.

Esquema terapêutico anti-retroviral	Colonizado (140)		Não Colonizado (184)		Total (324)		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
1 NRTI + 1 IP	1	0,7	0	0	1	0,3	0,251
1 NRTI + 1 NNRTI + 1 IP	1	0,7	0	0	1	0,3	0,251
1 NRTI + 2IP	1	0,7	2	1,1	3	0,9	0,729
2 NRTI	1	0,7	0	0	1	0,3	0,251
2 NRTI + 1 IP	47	33,6	67	36,4	114	35,2	0,596
2 NRTI + 1 IP + 1 EN	1	0,7	0	0	1	0,3	0,251
2 NRTI + 1 NNRTI	53	37,9	79	42,9	132	40,8	0,357
2 NRTI + 1 NNRTI + 1 IP	9	6,4	8	4,4	17	5,2	0,405
2 NRTI + 1 NNRTI + 2 IP	3	2,1	3	1,6	6	1,9	0,735
2 NRTI + 2 IP	11	7,9	10	5,5	21	6,5	0,380
2 NRTI + 3 IP	0	0	1	0,5	1	0,3	0,382
Não uso de TARV	12	8,6	14	7,6	26	8	0,308

NRTI: Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo

NNRT: Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo

IP: Inibidores da protease

EN: Inibidor de entrada

Teste Qui-Quadrado, valor de p significativo (p-valor < 0,05).

Tabela 12- Esquema terapêutico anti-retroviral, com ou sem inibidor de protease, do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, no momento da coleta.

Esquema terapêutico anti-retroviral	Colonizado (128)		Não Colonizado (170)		Total (298)		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
Com IP	74	57,8	91	54	165	55,4	
Sem IP	54	42,2	79	46	133	44,6	0,462

12/140 (colonizado) e 14/184 (não colonizado) não estavam com uso de TARV, no momento da coleta

IP: Inibidores da protease

Teste Qui-Quadrado = valor de p significativo (p-valor < 0,05).

4.2.6- Terapia antifúngica

O uso prévio de antifúngico não evidenciou valor de p significativo entre os dois grupos estudados, ao contrário do uso de nistatina que foi significativo para o grupo colonizado, conforme demonstrado na tabelas 13 e 14, respectivamente.

Tabela 13- Uso de terapia antifúngica do grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

Uso de Antifúngico	Colonizado (140)		Não Colonizado (184)		Total (324)		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
Uso prévio	69	49,3	79	42,9	148	45,7	
Não usou	71	50,7	105	57	176	54,3	
Uso atual	6	4,3	8	4,3	14	4,3	0,426

Teste Qui-Quadrado (valor de p significativo (p-valor < 0,05).

Tabela 14- Descrição do uso de terapia antifúngica, comparando o grupo colonizado e não colonizado de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

Uso de antifúngico	Colonizado (140)			Não Colonizado (184)			p-valor
	Prévio	Não usou	Atual	Prévio	Não usou	Atual	
Fluconazol	28	112	4	33	151	6	0,638
Cetoconazol	36	104	2	33	151	0	0,090*
Itraconazol	1	139	0	6	178	2	0,118
Miconazol	2	138	0	4	180	0	0,622
Anfotericina B	3	137	0	10	174	0	0,135
Nistatina	45	95	0	37	147	0	0,014 *

* = Teste Qui-Quadrado, valor de p significativo (p-valor < 0,05).

4.3- Estudo microbiológico

4.3.1- Coleta e isolamento das amostras

Foram isoladas 154 cepas de *Candida* spp. da cavidade oral de 140/324 pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.

4.3.2- Identificação de leveduras do gênero *Candida*

Dos 130 (84,5%) isolados de *Candida albicans*, 115 (88,5%) pertenciam ao sorotipo A e 15 (11,5%) ao sorotipo B. Foram identificadas 11 espécies dentre os 24 (15,5%) isolados de *Candida* não *albicans*, conforme figura 2.

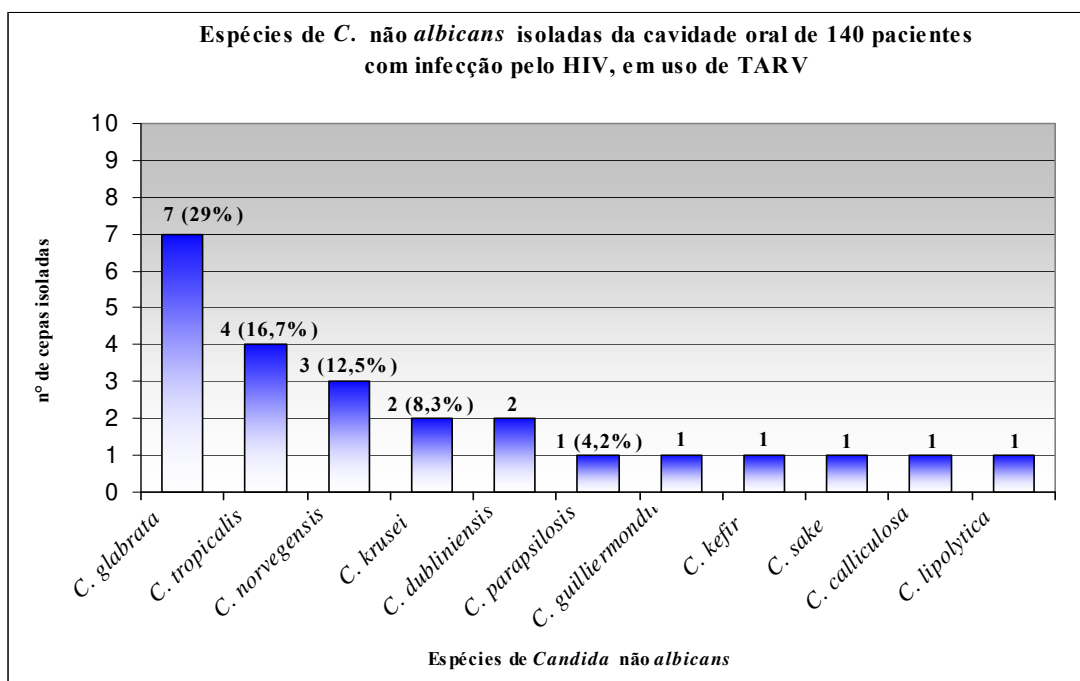


Figura 2- Caracterização das espécies de *C. não albicans* isoladas da cavidade oral de 140 pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

A tonalidade das espécies de *C. não albicans* em meio CHROMagar Candida[®] mostrou-se verde para 2 cepas *C. dubliniensis*, azul para 4 cepas *C. tropicalis* e rosa escuro a branco para 18 cepas das demais espécies, sendo os perfis bioquímicos analisados e identificados através do sistema comercial ID 32 C.

Para a triagem fenotípica de identificação de *C. dubliniensis* foram estudadas 132 cepas (130 *C. albicans* e 2 *C. dubliniensis*), as quais apresentaram crescimento da levedura com tonalidade verde em meio CHROMagar Candida[®] e prova do tubo germinativo positivo. Não houve diferença na tonalidade verde entre as duas espécies estudadas. O crescimento a 42°C mostrou-se lento e duvidoso, para algumas cepas de *C. albicans*. Ausência de assimilação de xilose foi observada em 10 cepas (Tabela 15), as quais foram submetidas ao seqüenciamento para confirmação das espécies (Figura 3 e Tabela 16).

Tabela 15- Triagem fenotípica de 10 cepas de *Candida* spp. isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV, em relação à tonalidade da colônia em meio CHROMagar Candida[®], prova do tubo germinativo, crescimento a 42°C e assimilação de xilose.

Δ (n =10)	Tonalidade CHROMagar Candida [®]	Tubo germinativo	42°C	xilose
14	verde-claro	+	+/-	-
46	verde-claro	+	+/-	-
56	verde-claro	+	-	-
60	verde-claro	+	-	-
74	verde-claro	+	-	-
85 A	verde-claro	+	+/-	-
85 B	verde-claro	+	-	-
116	verde-claro	+	-	-
127 B	verde-claro	+	-	-
145 B	verde-claro	+	-	-

n: número de cepas. Δ : identificação das cepas (-): negativo (+): positivo (+/-): Crescimento a 42°C lento e duvidoso

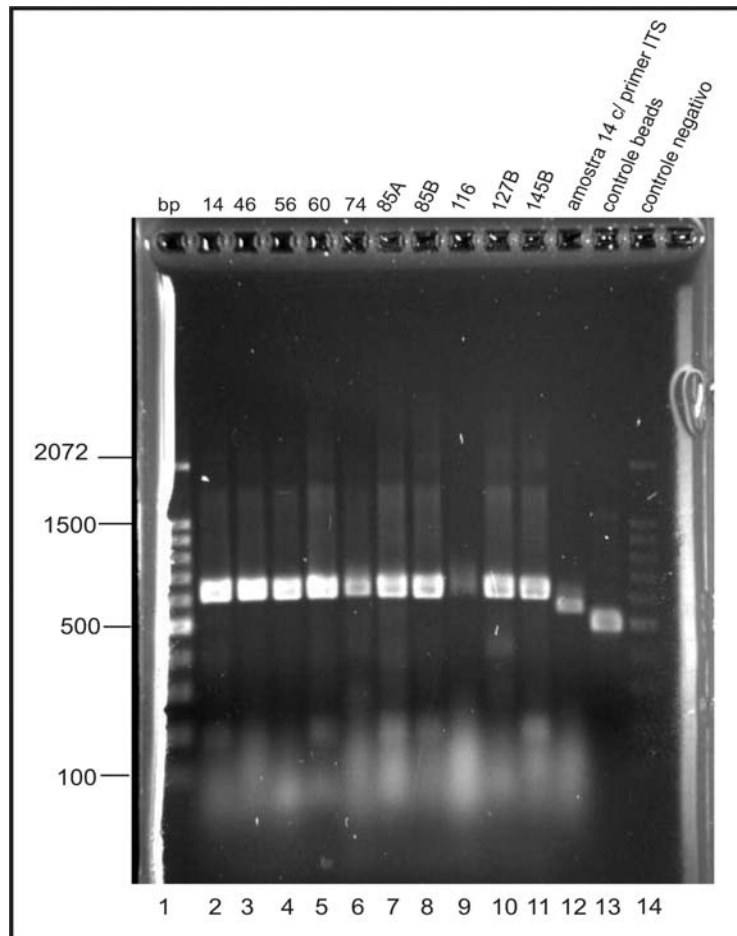


Figura 3- PCR de 10 *Candida* spp. isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV, que apresentaram tonalidade verde em meio CHROMagar Candida® e xilose negativa.

Tabela 16- Descrição do seqüenciamento de 10 *Candida* spp. isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV, que apresentaram tonalidade verde em meio CHROMagar *Candida*® e xilose negativa.

Amostra	Espécie	Identidad e	Expect	Similaridade no Blast
14	<i>C. albicans</i> sor.A	99%	0.0	gi 5732685 gb AF156536.1 AF156536
46	<i>C. albicans</i> sor.A	99%	0.0	gi 5732686 gb AF156537.1 AF156537
56	<i>C. albicans</i> sor.A	99%	0.0	gi 51471985 gb AY601154.1
60	<i>C. albicans</i> sor.A	99%	0.0	gi 5732685 gb AF156536.1 AF156536
74	<i>C. dubliniensis</i>	99%	0.0	gi 2062337 gb U57685.1 CDU57685
85 A	<i>C. albicans</i> sor.A	99%	0.0	gi 5732685 gb AF156536.1 AF156536
85 B	<i>C. albicans</i> sor.A	99%	0.0	gi 5732685 gb AF156536.1 AF156536
116	<i>C. albicans</i> sor.A	99%	0.0	gi 51471985 gb AY601154.1
127 B	<i>C. dubliniensis</i>	99%	0.0	gi 2062337 gb U57685.1 CDU57685
145 B	<i>C. albicans</i> sor.A	99%	0.0	gi 5732685 gb AF156536.1 AF156536
14 c/ primer ITS	<i>C. albicans</i> sor.A	100%	0.0	gi 21666966 gb AF455531.1

Dos 140 pacientes, 12 apresentaram colonização mista nas amostras da cavidade oral, demonstrada abaixo (Tabela 17):

Tabela 17- Colonização mista de *Candida* spp. isoladas da cavidade oral de 12 pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.

Δ (n = 12)	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3
	Microrganismo	Microrganismo	Microrganismo
09	<i>C. albicans</i> sorotipo A	<i>C. albicans</i> sorotipo B	
19	<i>C. albicans</i> sorotipo A	<i>C. norvegensis</i>	
54	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	
59	<i>C. albicans</i> sorotipo A	<i>C. lipolytica</i>	
70	<i>C. albicans</i> sorotipo A**	<i>C. albicans</i> sorotipo A**	
83	<i>C. albicans</i> sorotipo A	<i>C. glabrata</i>	
85	<i>C. albicans</i> sorotipo A*	<i>C. albicans</i> sorotipo A*	
86	<i>C. albicans</i> sorotipo A	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
89	<i>C. albicans</i> sorotipo A	<i>C. tropicalis</i>	
103	<i>C. albicans</i> sorotipo A	<i>C. krusei</i>	<i>C. kefir</i>
127	<i>C. glabrata</i>	<i>C. dubliniensis</i>	
145	<i>C. calliculosa</i>	<i>C. albicans</i> sorotipo A	

n: número de pacientes

Δ : identificação do paciente

*: cepas fenotipicamente iguais com genótipos diferentes.

** : cepas fenotipicamente diferentes com genótipos iguais.

4.3.3- Tipagem molecular de *Candida* spp.

Foram identificados 15 perfis genômicos entre as 115 cepas de *C. albicans* sorotipo A e 3 perfis genômicos entre as 15 cepas de *C. albicans* sorotipo B isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV (Tabela 18).

Tabela 18- Descrição do perfil genômico de *C. albicans* sorotipo A e B isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.

Perfil genômico	Bandas cromossômicas	n (130)	%	Categoria clínica (CDC)
<i>C. albicans</i> sorotipo A (115)				
A ¹	7	65	56,5	41 (C3), 8 (B3), 6 (A2), 4 (A3), 4 (A1), 1 (B2) e 1 (C2)
A ²	6	2	1,7	1 (C3) e 1 (A3)
A ³	8	19	16,5	12 (C3), 3 (B2), 3 (A2) e 1 (C2)
A ⁴	9	7	6,1	3 (C3), 2 (A3) e 2 (A2)
A ⁵	9	2	1,7	2 (C3)
A ⁶	7	8	6,9	3 (B3), 2 (C3), 2 (B2) e 1 (A2)
A ⁷	8	2	1,7	1 (C3) e 1 (B3)
A ⁸	9	1	0,9	A3
A ⁹	10	1	0,9	A3
A ¹⁰	8	1	0,9	C3
A ¹¹	9	1	0,9	C3
A ¹²	8	3	2,6	3 (C3)
A ¹³	9	1	0,9	A2
A ¹⁴	9	1	0,9	B3
A ¹⁵	7	1	0,9	A1
<i>C. albicans</i> sorotipo B (15)				
B ¹	7	13	86,6	7 (C3), 4 (A3), 1 (B2) e 1 (A1)
B ²	9	1	6,7	B2
B ³	8	1	6,7	B2

A CE permitiu a separação de 6 a 10 bandas de cromossomos entre as 115 cepas de *C. albicans* sorotipo A, sendo que a menor e a maior apresentaram 555 e 1,900 Kb, respectivamente. Verificou-se o predomínio dos perfis A¹ e A³, que foram identificados em 65 (56,5%) e 19 (16,5%) das cepas, respectivamente (Tabela 18 e Figura 4).

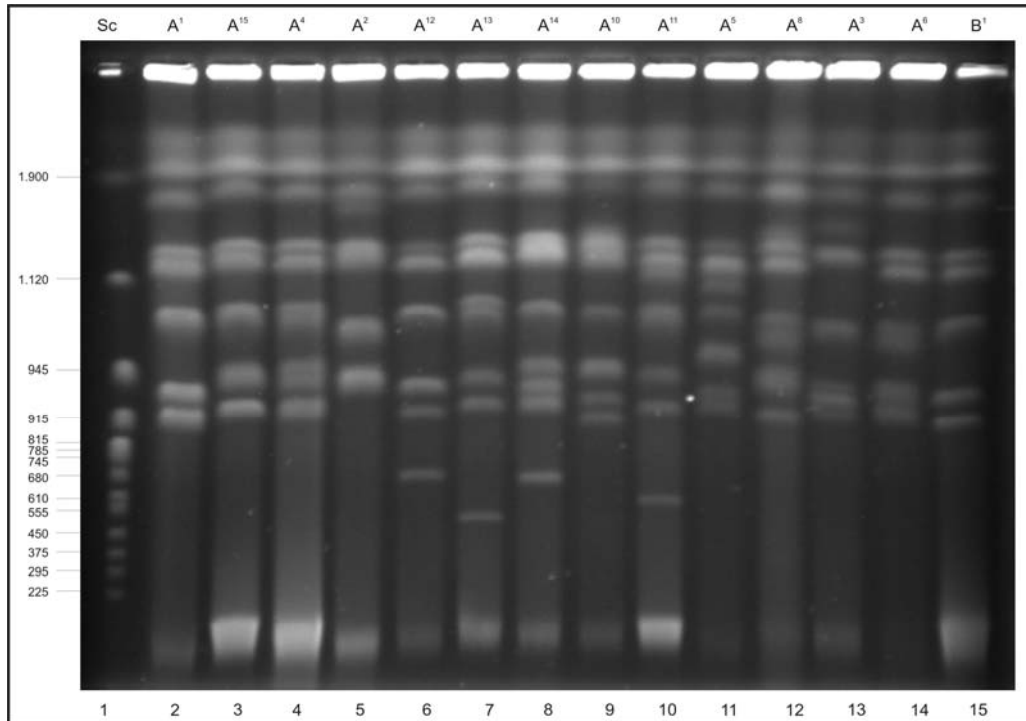


Figura 4- CE de *C. albicans* sorotipo A isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.

A similaridade entre 13 perfis genômicos de *C. albicans* sorotipo A e o perfil predominante de *C. albicans* sorotipo B está disposta na Figura 6. É importante relatar que a maioria dos perfis genômicos de *C. albicans* sorotipo A ficaram no intervalo maior de 90% de similaridade e que o perfil de *C. albicans* sorotipo A predominante A¹ mostrou uma similaridade de 100% entre o perfil de *C. albicans* sorotipo B predominante B¹ (Figuras 4, 5 e 6).

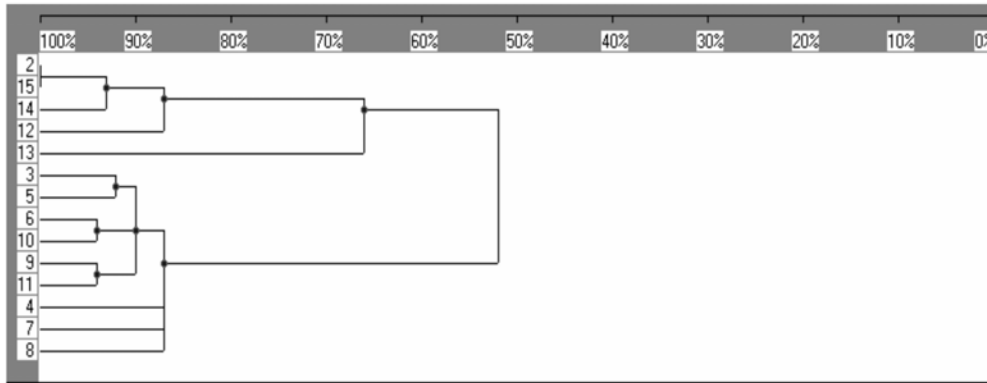


Figura 5- Dendrograma da Figura 4. Ilustra a similaridade entre 13 perfis genômicos de *C. albicans* sorotipo A e o perfil genômico predominante de *C. albicans* sorotipo B, isolados da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.

A CE permitiu a separação de 7 a 9 bandas de cromossomos entre as 15 cepas de *C. albicans* sorotipo B, sendo que a menor e a maior apresentaram 815 e 1,900 Kb, respectivamente. (Tabela 18 e Figura 6).

O perfil genômico B¹ foi identificado em 13 (86,6%) das cepas de *C. albicans* sorotipo B e mostrou uma de 94% entre o perfil B³ e de 88% entre o perfil B² (Figura 7).

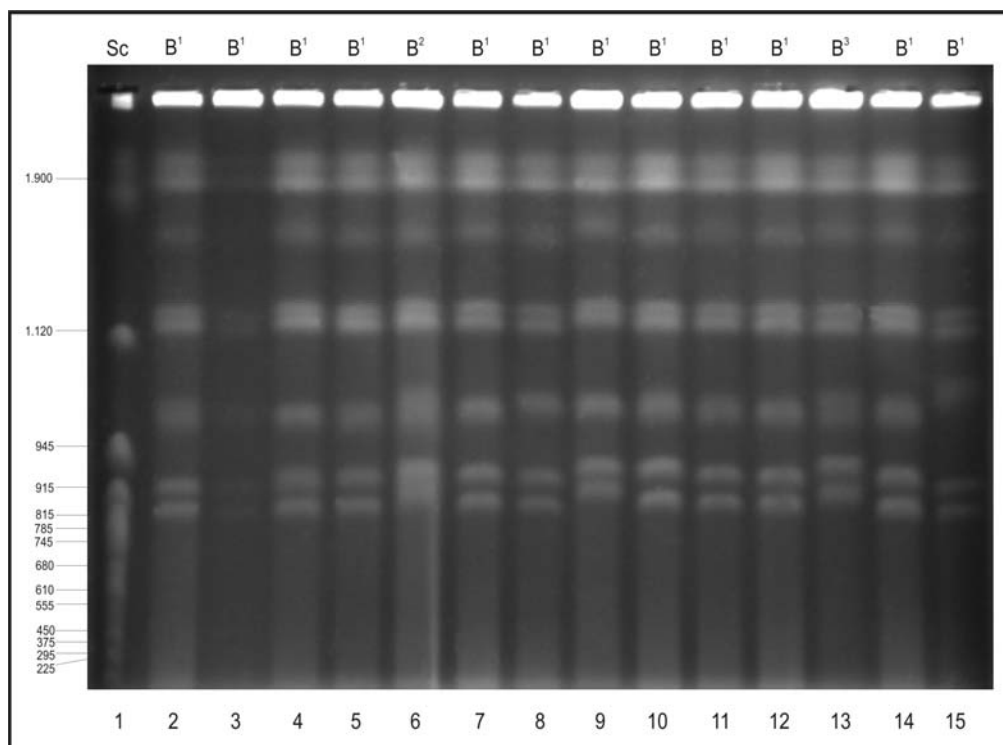


Figura 6- CE de *C. albicans* sorotipo B isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.

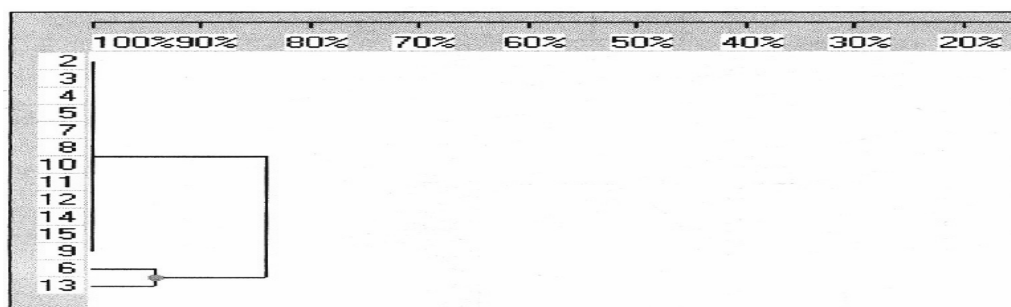


Figura 7- Dendrograma da Figura 6. Ilustra a similaridade entre 3 perfis genômicos de *C. albicans* sorotipo B, isolados da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.

Dentre as 24 cepas de *C. não albicans* merecem destaque o estudo do perfil genômico das cepas de *C. glabrata*, devido à heterogeneidade identificada na CE e o estudo do perfil genômico de *C. dubliniensis*, por ser considerada a mais nova espécie de *Candida* emergente em pacientes com aids.

Foram identificados 7 perfis genômicos (G¹ a G⁷) entre as 7 cepas de *C. glabrata* isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV. A CE permitiu a separação de 9 a 10 bandas de cromossomos, sendo que a menor e a maior apresentaram 555 e 1,688 Kb, respectivamente. (Tabela 19 e Figura 8).

Tabela 19- Perfil genômico de cepas de 7 *C. glabrata* e 2 *C. dubliniensis* isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.

Perfil genômico	Bandas cromossômicas	n (9)	%	Categoria clínica (CDC)
<i>C. glabrata</i> (7)				
G ¹	9	1	14,29	C3
G ²	10	1	14,29	C3
G ³	10	1	14,29	C3
G ⁴	10	1	14,29	C3
G ⁵	9	1	14,28	B3
G ⁶	9	1	14,28	C3
G ⁷	10	1	14,28	C3
<i>C. dubliniensis</i> (2)				
D ¹	9	1	50	A2
D ²	8	1	50	C3

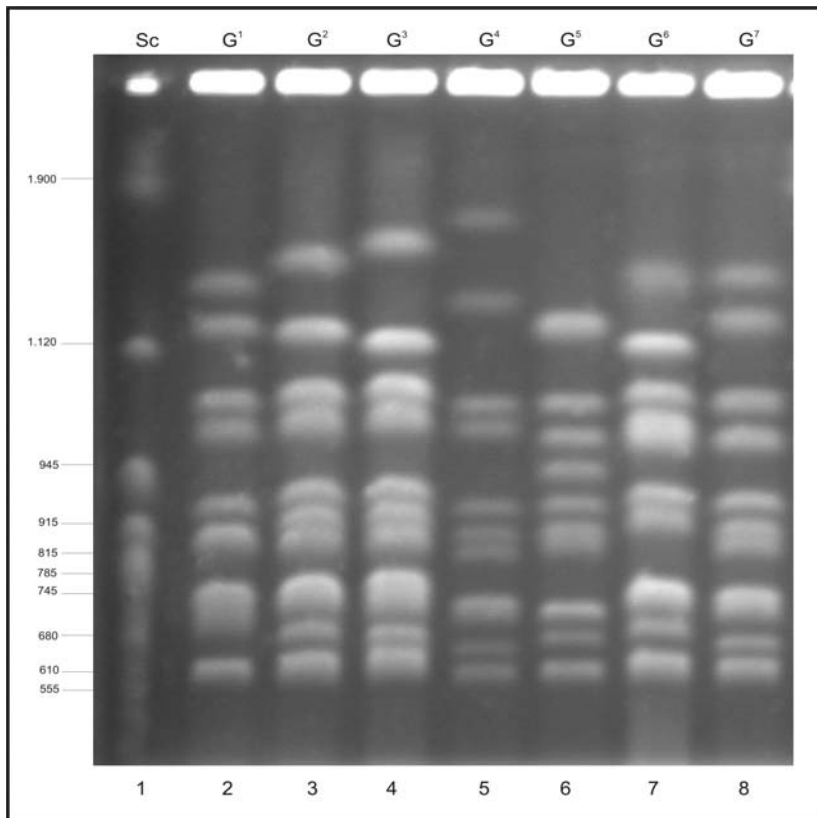


Figura 8- CE de *C.glabrata* isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.

A similaridade entre os 7 perfis genômicos das cepas de *C. glabrata* está disposta na Figura 9. É importante relatar que os perfis genômicos são diferentes, no entanto, a análise computacional mostrou uma similaridade de 100% entre os perfis G² e G³, o que nos permite concluir que o programa não consegue captar esta diferença.

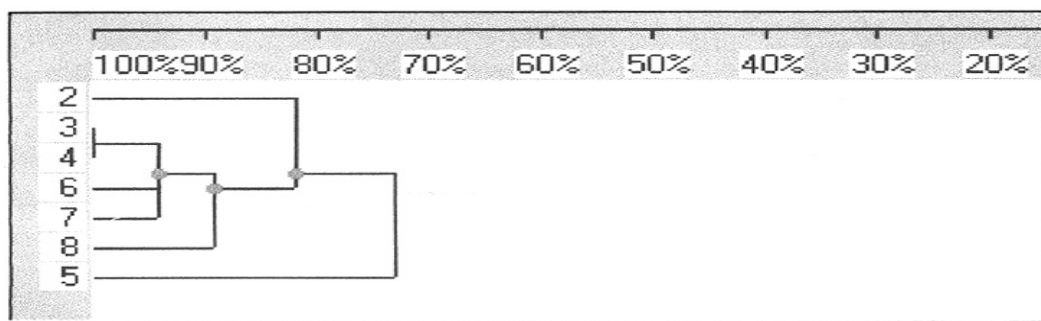


Figura 9- Dendrograma da Figura 8. Ilustra a similaridade entre 7 perfis genômicos de *C. glabrata*, isolados da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.

A CE dos dois perfis genômicos D¹ (amostra 74) e D² (amostra 127B) de *C. dubliniensis*, isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV, permitiu a separação de 8 a 9 bandas de cromossomos, sendo que a menor e a maior apresentaram 450 e 1,900 Kb, respectivamente. (Tabela 19 e Figura 10).

O perfil genômico D² mostrou uma similaridade de 93% e 88% entre os perfis predominantes A¹ e A³ de *C. albicans* sorotipo A, respectivamente. Similaridade de 59% foi evidenciada entre o perfil genômico D¹ e os perfis predominantes A¹ e A³ de *C. albicans* sorotipo A (Figura 11).

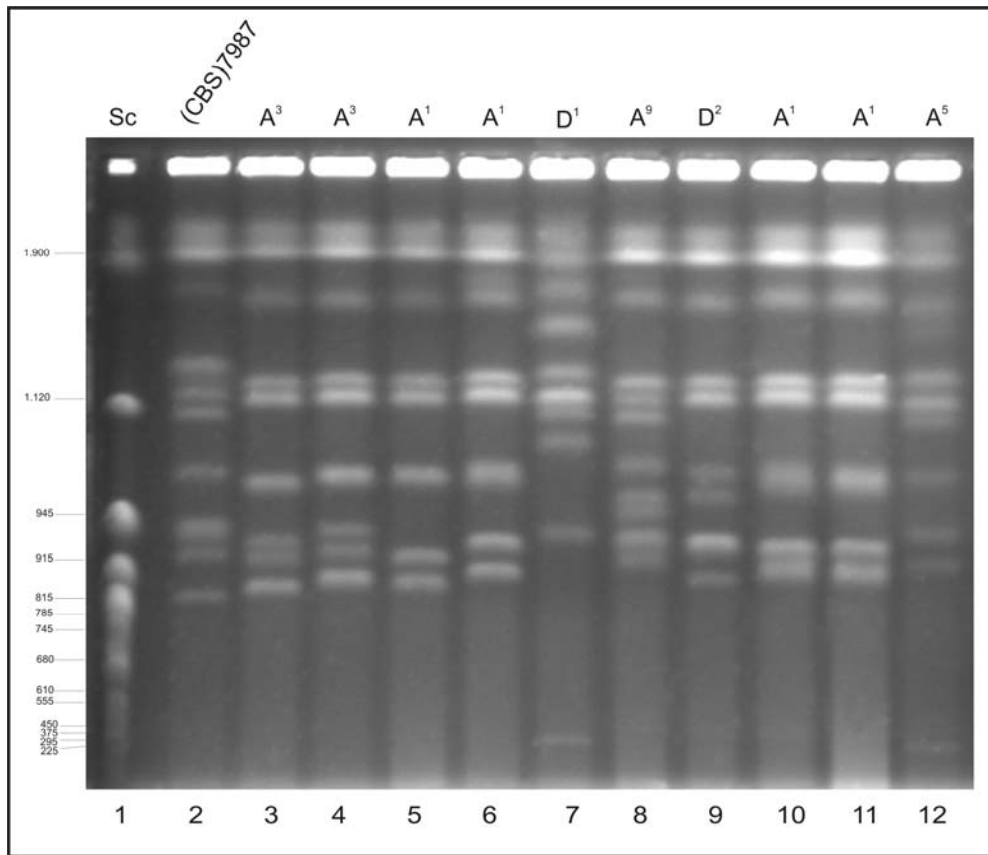


Figura 10- CE de *C. albicans* sorotipo A e *C. dubliniensis* isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.

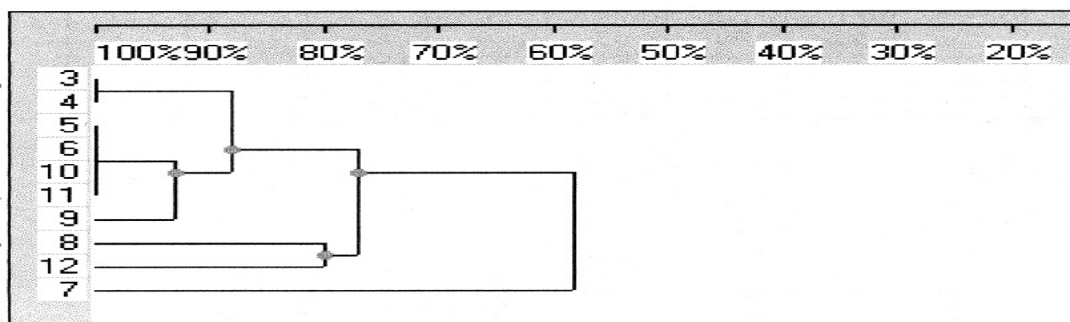


Figura 11- Dendrograma da Figura 10. Ilustra a similaridade entre dois perfis genômicos de *C. dubliniensis* e os perfis predominantes A¹ e A³ de *C. albicans* sorotipo A, isolados da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.

4.3.4- Determinação da suscetibilidade de *Candida* spp. aos antifúngicos

O perfil de sensibilidades aos antifúngicos foi estudado em 154 *Candida* spp isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV, sendo 115 cepas de *C. albicans* sorotipo A, 15 cepas de *C. albicans* sorotipo B e 22 cepas de *Candida* não *albicans*. Não foi possível realizar o teste de sensibilidade em duas cepas de *Candida* não *albicans* (1 *C. colliculosa* e 1 *C. lipolytica*).

Tabela 20- Intervalos de CIM obtidos de *C. krusei* ATCC® 6258C e *C. parapsilosis* ATCC® 22019, perante o fluconazol, cetoconazol, itraconazol, 5-fluocitosina, anfotericina B e nistatina.

Antifúngico	<i>C. krusei</i> ATCC® 6258C		<i>C. parapsilosis</i> ATCC® 22019	
	MIC (µg/mL)		MIC (µg/mL)	
	Presente Estudo	(CLSI), M27-A2	Presente Estudo	(CLSI), M27-A2
Fluconazol	> 64	16 - 128	2	1 - 4
Cetoconazol	0,5	0,25 – 1,0	0,125	0,06 – 0,5
Itraconazol	0,25	0,25 – 1,0	0,25	0,12 – 0,5
5-Fluocitosina	8	8 - 32	0,25	0,12 – 0,5
Anfotericina B	1	1 - 4	1	0,5 – 4,0
Nistatina	2	1*	2	1*

* Arikian et al., 2002.

Dos 130 pacientes colonizados por *C. albicans*, 59/115 (sorotipo A) e 5/15 (sorotipo B) tomaram antifúngico prévio.

Todas as *C. albicans* sorotipo A e B mostraram-se sensíveis aos antifúngicos estudados. Não foi evidenciada diferença significativa de CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ entre os sorotipos (Tabela 21 e 22).

A cepas de *Candida* não *albicans* foram sensíveis perante a 5-fluocitosina, anfotericina B e nistatina. No entanto, foi evidenciada sensibilidade dose-dependente (S-DD) para os azólicos, principalmente para *C. glabrata* (Tabelas 22 e 23).

Tabela 21- Intervalos de CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ perante o fluconazol, cetoconazol, itraconazol, 5-fluocitosina, anfotericina B e nistatina de *C. albicans* isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV.

Antifúngico	<i>C. albicans</i> sorotipo A (115)			<i>C. albicans</i> sorotipo B (15)		
	CIM (µg/mL)	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM (µg/mL)	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Fluconazol	0,125 – 2	0,50	1	0,125 – 2	0,50	1
Cetoconazol	0,03 – 0,06	0,03	0,03	0,03 – 0,50	0,03	0,06
Itraconazol	0,01 – 0,125	0,06	0,125	0,03 – 0,125	0,06	0,125
5-Fluocitosina	<0,125 – 2	<0,125	0,125	<0,125 – 1	0,50	0,50
Anfotericina B	0,125 – 1	0,5	1	0,25 – 1	0,50	0,50
Nistatina	0,50 – 2	1	2	1 – 2	2	2

Tabela 22- Perfil de sensibilidade de 152 *Candida* spp., isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV, perante os azólicos.

Microrganismo (n°)	Fluconazol			Cetoconazol			Itraconazol		
	S	S-DD	R	S	S-DD	R	S	S-DD	R
<i>Candida albicans</i> (130)									
Sorotipo A (115)	115	-	-	115	-	-	115	-	-
Sorotipo B (15)	15	-	-	15	-	-	15	-	-
<i>Candida não albicans</i> (22)									
<i>C. glabrata</i> (07)	04	03	-	01	06	-	-	07	-
<i>C. tropicalis</i> (04)	04	-	-	04	-	-	03	01	-
<i>C. norvegensis</i> (03)	02	01	-	03	-	-	03	-	-
<i>C. krusei</i> (02)	-	02	-	01	01	-	01	01	-
<i>C. dubliniensis</i> (02)	02	-	-	02	-	-	02	-	-
<i>C. parapsilosis</i> (01)	01	-	-	01	-	-	01	-	-
<i>C. guilhermondi</i> (01)	01	-	-	01	-	-	01	-	-
<i>C. kefir</i> (01)	01	-	-	01	-	-	01	-	-
<i>C. sake</i> (01)	01	-	-	01	-	-	01	-	-

S: sensível, S-DD: sensível dose dependente e R: resistente

Os azólicos (fluconazol, cetoconazol e itraconazol) não apresentaram boa sensibilidade para as cepas não *albicans*, principalmente o itraconazol, que não se mostrou um antifúngico para ser indicado aos pacientes com candidíase orofaríngea, visto que as cepas não *albicans* se mostraram S-DD mesmo em pacientes que não referiram o uso prévio de azólicos (Tabela 23).

Tabela 23- Correlação da sensibilidade dose-dependente *in vitro* de *Candida* spp., isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV, com o uso prévio de azólicos.

<i>C. não albicans</i> (16 cepas)	CIM (µg/mL)			Uso prévio de antifúngicos
	Fluconazol	Cetoconazol	Itraconazol	
<i>C. glabrata</i> (7 cepas)				
05	8	0,50	0,50	Não tomou
08	8	0,25	0,25	Não tomou
50	16	0,25	0,50	Nistatina
54 A	16	0,50	0,50	Cetoconazol+Nistatina
83 B	8	0,125	0,50	Não tomou
86 C	16	0,50	0,50	Cetoconazol
127 A	8	0,25	0,25	Fluconazol+Nistatina
<i>C. tropicalis</i> (4 cepas)				
22	0,50	0,03	0,03	Cetoconazol+Nistatina
54 B	1	0,03	0,03	Cetoconazol
86 A	0,25	0,03	0,06	Cetoconazol
89 B	2	0,125	0,50	Cetoconazol+Nistatina
<i>C. norvegensis</i> (3 cepas)				
19 B	16	0,125	0,125	Nistatina
78	4	0,03	0,06	Fluconazol+Cetoconazol+Anfotericina+Nistatina
87	4	0,06	0,125	Não tomou
<i>C. krusei</i> (2 cepas)				
99	16	0,25	0,25	Fluconazol+Cetoconazol+Nistatina
103 B	16	0,125	0,125	Não tomou

Fluconazol S: ≤ 8 S-DD: 16 a 32 R: ≥ 64 Cetoconazol e Itraconazol S: ≤ 0,125 S-DD: 0,25 a 0,5 R: ≥ 1

5- DISCUSSÃO

5.1- Estudo epidemiológico e clínico

A introdução da TARV, em 1996, conferiu impressionante progresso na qualidade de vida dos pacientes (Jevtovic et al., 2005) e diminuiu a prevalência das infecções oportunistas, incluindo a candidíase oral (Barchiese et al., 2002), considerada sentinela na história natural e na progressão da infecção pelo HIV (Greenspan et al., 2000). Desde então estudos referentes à colonização por *Candida* spp. em pacientes HIV-positivo em uso de TARV vêm sendo desenvolvidos, a fim de desvendar o impacto destes anti-retrovirais na epidemiologia (Tacconelli et al., 2002), clínica (Tacconelli et al., 2002; Dunic et al., 2004; Jevtovic et al., 2005; Yang et al., 2006) e microbiologia (Sant'Ana et al., 2002; Tacconelli et al., 2002; Melo et al., 2004) deste importante fungo de interesse médico.

Dentre os principais estudos que comparam dados epidemiológicos entre grupos de pacientes com presença e ausência de colonização por *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes HIV-positivo em uso de TARV merecem destaque os realizados por Barchiese et al. (2002), na Itália, Gottfredsson et al. (1999), na Carolina do Norte, e por Costa et al. (2006), no Brasil. Ambos os estudos foram essenciais para comparação de nossos dados e, por este motivo, foram descritos ao longo desta dissertação.

A razão dos casos de aids entre os sexos vem mostrando sinais de estabilização nos últimos anos. Em 1985, no início da epidemia, havia 26,5 casos da doença em homens para 1 em mulher. Ao longo dos anos, a proporção caiu constantemente. Em 2005, a razão foi de 1,5 caso em homem para 1 em mulher, número estável desde 2003 (Boletim Epidemiológico, 2006).

No estudo prospectivo de Barchiese et al. (2002), realizado de junho a dezembro de 2001 na Itália, foram pesquisadas características de 102 pacientes HIV-positivo em uso de TARV quanto à colonização oral por *Candida* spp.. Foi demonstrado que o grupo colonizado (68 pacientes) apresentou idade média de 37,1 anos e o grupo não colonizado (34 pacientes) de 37 anos. O sexo masculino foi predominante em ambos os grupos, representando 71% para o colonizado e 56% para o não colonizado.

Gottfredsson et al. (1999) realizaram estudo epidemiológico de 83 pacientes com infecção pelo HIV em uso de TARV, em hospital universitário na Carolina do Norte, e avaliaram a colonização de orofaringe por *Candida* spp., quantificando a intensidade de colonização e correlacionando os achados com a carga viral, contagem de linfócitos CD4⁺, uso de profilaxia para pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*, antecedente de infecção fúngica e número de drogas anti-retrovirais utilizadas. Os autores revelaram que o grupo colonizado (58 pacientes) apresentou idade média de 34 anos e o grupo não colonizado (25 pacientes) de 35 anos. O sexo masculino foi predominante em ambos os grupos, representando 57% para o colonizado e 60% para o não colonizado.

Recente estudo prospectivo, realizado de maio de 2004 a maio de 2005, com isolados de *Candida* spp. da cavidade oral de 99 pacientes com infecção pelo HIV com ou sem uso de TARV foi descrito por Costa et al. (2006), no Brasil. Os autores verificaram que o grupo colonizado (62 pacientes) apresentou idade média de 38 anos e o grupo não colonizado (37 pacientes) de 37,9 anos. O sexo masculino foi predominante em ambos os grupos, representando 53,2% para o colonizado e 56,7% para o não colonizado.

No Brasil, Melo et al. (2004) estudaram a flora de cavidade oral para presença de *Candida* e verificaram 114 pacientes com infecção pelo HIV em uso de TARV. Os autores evidenciaram que 65% dos pacientes eram do sexo masculino e 35% do sexo feminino, com a idade média de 35,2 anos em ambos os grupos.

Na Itália, Tacconelli et al. (2002) realizaram estudo epidemiológico, clínico e microbiológico com 69 pacientes com candidíase oral, que apresentavam infecção pelo HIV em uso de TARV. O sexo masculino foi prevalente em 68% dos pacientes estudados e a idade média foi de 38 anos.

Dois trabalhos nacionais foram descritos em relação à colonização oral por *Candida* spp. em paciente HIV-positivo, no entanto não citam o uso de TARV. O primeiro foi descrito por Cavassani et al. (2002), que realizaram estudo epidemiológico retrospectivo de 431 prontuários de pacientes portadores do HIV atendidos no Serviço de Estomatologia do Hospital Heliópolis em São Paulo, no período de abril de 1995 a setembro de 2001, a fim de analisar dados referentes a sexo, raça, faixa etária, formas de contágio e

manifestações bucais. Os pesquisadores demonstraram que 69,14% dos pacientes foram do sexo masculino e 47,10% apresentavam faixa etária de 31 a 40 anos. O segundo, descrito por Wingeter et al. (2007), realizou coletas de amostras de lavado bucal de 100 pacientes com infecção pelo HIV ou portadores de aids do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá e demonstrou que 58 pacientes mostraram culturas positivas para *Candida* spp. e que destes 50% eram do sexo masculino e que a idade média do grupo colonizado foi de 39 anos.

Um estudo temporal das doenças associadas à aids no Brasil (1980-1999) foi realizado no ano de 2000 por Guimarães, que descreveu, em sua análise, valor acumulado de 77,1% de ocorrência para o sexo masculino e 64,5% para idade igual e acima de 30 anos.

Os dados do presente estudo foram concordantes com a literatura mundial e nacional, uma vez que verificou o predomínio do sexo masculino em ambos os grupos estudados, representando 63% para o colonizado e 60% para o não colonizado. Sendo a razão de 1,6 homens para 1 em mulher e idade média de 38,9 anos, quando analisado o total de pacientes (Tabela 1).

Entre os casos notificados com a variável raça, observou-se queda proporcional entre os indivíduos que disseram ser brancos e aumento proporcional entre os que disseram ser negros e pardos. Em 2000, os homens brancos corresponderam a 59% dos casos de aids. Em 2005, o índice caiu para 53,5%. Já entre os negros e pardos que, em 2000, corresponderam a 40,2% dos casos, em 2005 foram 45,6%. Entre as mulheres, caiu o número de casos entre as que se disseram brancas, de 58%, em 2000, para 51,6%, em 2005. Entre as negras e pardas, a proporção passou de 41%, em 2000, para 47,5% em 2005 (Boletim Epidemiológico, 2006).

Ao estudarem a flora oral de *Candida* de 114 pacientes brasileiros com infecção pelo HIV, em uso de TARV, Melo et al. (2004) verificaram que 83,4% eram brancos, 7,9% negros e 8,7% pardos.

O presente estudo demonstrou em relação à variável raça, o predomínio da raça branca em 79,9% no total de pacientes estudados. Pardos e negros representaram 14,8% e 5,3% dos pacientes estudados, respectivamente. Não houve diferença entre os grupos colonizados e não colonizados em relação à raça (Tabela 1).

Em relação à categoria de exposição nos homens, o Boletim Epidemiológico (2006), descreveu uma diminuição nos casos entre homossexuais e aumento entre os bissexuais e heterossexuais. Nesse último grupo, em 1996, o percentual em relação ao número total de casos foi de 22,5%. Em 2005, passou para 44,2%. Nas mulheres, a epidemia segue com a característica de ser quase que totalmente de transmissão heterossexual, responsável por 94,5% dos casos registrados no ano passado.

Entre os usuários de drogas injetáveis, o número de casos de aids prossegue em queda constante. Em 1996, os 4.852 casos notificados nessa população específica, considerando homens e mulheres, correspondiam a quase um terço do total de casos de aids registrados. Em 2005, foram registrados 1.418 casos em UDI, o que representa uma redução de 71% (Boletim Epidemiológico, 2006).

Estudo temporal das doenças associadas à aids no Brasil (1980-1999) descreveu, em sua análise, valor acumulado de 24,1% para heterossexual, 27,4% para homo/bissexual, 23,6% para UDI, 2,5% para sangue e 22,4% para outros/ignorados. Dado importante foi observado quando analisado o período final (1998-1999) para exposição heterossexual que saltou de 5,8% no período inicial (1980-88) para 40,1% no final e a homo/bissexual que caiu de 59,2% no período inicial (1980-88) para 20,9% no final (Guimarães, 2000).

Em relação às formas de contágio pelo HIV dos 431 pacientes portadores do HIV atendidos no Serviço de Estomatologia do Hospital Heliópolis em São Paulo foram obtidos: 71,26% por via sexual, 20,42% por UDI, 1,39% por sangue, 0,24% por via vertical e 0,63% por via de transmissão não referida (Cavassani et al., 2002).

Concordante com a literatura nacional, o presente estudo verificou o predomínio de 80,9% de transmissão sexual, quando analisado o total de pacientes. A transmissão sexual + UDI foi verificada em 18,8% e a vertical em 0,3% dos pacientes

estudados. Não foi encontrado nenhum caso de transmissão por receptores de sangue (Tabela 1).

A contagem de linfócitos CD4⁺ e a quantificação de RNA viral no plasma sanguíneo são os principais marcadores da progressão da doença pelo HIV (Costa et al., 2006).

Elevados níveis de carga viral podem suprimir a resposta imune local, permitindo o aumento da colonização oral por *Candida* (Gottfredsson et al., 1999). A TARV suprime a replicação do HIV, favorecendo a recuperação imunológica. O aumento das células CD4⁺, com resposta predominante do tipo Th1, pode inibir a candidíase e a redução da carga viral implica na melhora da função neutrofílica, evitando o surgimento de várias complicações infecciosas (Diz Dios et al., 2000).

O estudo de Barchiese et al. (2002) com 102 pacientes HIV-positivo em uso de TARV, avaliados quanto à colonização oral por *Candida* spp., demonstrou que o grupo colonizado (68 pacientes) apresentou média de linfócito CD4⁺ de 397 cels/mm³ e média de carga viral de 77 cópias/mL e o grupo não colonizado (34 pacientes) apresentou média de linfócito CD4⁺ de 442 cels/mm³ e média de carga viral de 125 cópias/mL. Não foi demonstrada significância no valor de p.

O estudo de Costa et al. (2006) com isolados de *Candida* spp. da cavidade oral de 99 pacientes com infecção pelo HIV com ou sem uso de TARV, descrito no Brasil, verificou que o grupo colonizado (62 pacientes) apresentou média de linfócito CD4⁺ de 336,7 cels/mm³ em 61,2% dos pacientes e o grupo não colonizado (37 pacientes) apresentou média de linfócito CD4⁺ de 339,5 cels/mm³ em 51,4% dos pacientes. O grupo colonizado apresentou carga viral indetectável em 24,2% dos pacientes e o grupo não colonizado em 32,4% destes. Não foi possível detectar a carga viral em 15 pacientes colonizados e em 12 não colonizados. Não houve diferenças significantes na contagem de células CD4⁺ e de carga viral entre os grupos estudados.

O resultados de Barchiese et al. (2002) e Costa et al. (2006) foram similares ao estudo realizado por Campisi et al. (2002), mas contrários ao estudo de Schoofs et al. (1998) e Capoluongo et al. (2000), que reportaram diferença significativa entre colonização e contagem de células CD4⁺ menor que 200 cels/mm³.

Estudo multicêntrico com 518 mulheres infectadas pelo HIV e 207 mulheres com comportamento de risco para aids, porém com pesquisa negativa de anticorpos anti-HIV, realizado por Schuman et al. (1998), observou que a contagem de linfócitos CD4⁺ foi menor em mulheres soropositivas colonizadas (363 cels/mm³) que nas não colonizadas (405 cels/mm³) por *Candida* spp. (p<0.004). O mesmo foi evidenciado por Ribeiro et al. (2004) onde a contagem dos linfócitos CD4⁺ dos indivíduos do grupo controle foi maior do que o grupo colonizado.

Ao contrário de Barchiese et al. (2002) e Costa et al. (2006), Schuman et al. (1998) observaram menor média de linfócito CD4⁺ dos pacientes colonizados que a dos não colonizados. O mesmo foi evidenciado por Ribeiro et al. (2004).

Nossos resultados demonstraram que a carga viral detectável e a contagem de células CD4⁺ < que 200 células/mm³ foram significativamente mais frequentes em pacientes colonizados por *Candida* spp. na cavidade oral (p=0.006) (Tabelas 4, 5 e 6). Outros trabalhos obtiveram resultados semelhantes (Diz Dioz et al., 1999; Patton et al., 2000; Tappuni & Fleming, 2001). O estudo nacional conduzido por Costa et al. 2006 não demonstrou relação entre a contagem de células CD4⁺ e carga viral com colonização oral por *Candida*, no entanto, dentre os pacientes que foram inclusos neste estudo, somente 9 tiveram a contagem de células CD4⁺ < que 200 células/mm³. Gottfredsson et al. (1999) reportaram positiva associação entre os níveis de carga viral e a colonização oral por *Candida* em pacientes com infecção pelo HIV, mas também não encontraram correlação com contagem de células CD4⁺; diferentemente de nossos dados, a contagem média de células CD4⁺ dos pacientes foi basicamente igual em ambos os grupos; pacientes colonizados (382 células/mL) e não colonizados (381 células/mL). Comparativamente, tais achados sugeriram que os diferentes resultados obtidos nos estudos podem ter correlação entre as características dos pacientes de cada população de estudo.

Recentemente, foi realizado estudo para avaliar a tendência temporal das doenças associadas à aids, no Brasil, de acordo com as variáveis sócio-demográficas e econômicas. Foram estudadas as doenças associadas como condições marcadoras de progressão clínica, que obedecem às revisões dos casos de aids do Ministério da Saúde e se baseiam principalmente em dois critérios clínicos: a) definição do Rio de Janeiro

(Brasil, 1992) e b) classificação do CDC (1992) modificada. Estes critérios fazem parte da definição de casos de aids em adultos para fins de notificação (Brasil 1992, 1998a). As condições associadas com maior incidência acumulada, para o período de 1980-1999, foram: candidíase (59,2%), tuberculose (25,5%), pneumonia por *Pneumocystis carinii* (PCP) (23,0%), neurotoxoplasmose (15,3%) e herpes zoster (12,5%) (Guimarães, 2000).

Nosso estudo mostrou-se semelhante à literatura nacional e verificou uma constância da tendência temporal das doenças, uma vez que os dados dos prontuários dos pacientes de 1983 a 2004 evidenciaram o predomínio de candidíase (40,1%), tuberculose (20,9%), herpes zoster (16,3%), PCP (15,7%), e toxoplasmose (11,3%), contribuiu para traçar o perfil clínico da população de estudo, em relação à frequência das principais doenças infecciosas (Tabelas 8 e 9).

O presente estudo demonstrou que 55,9% dos pacientes estudados apresentaram pelo menos uma infecção fúngica no decorrer da infecção pelo HIV. Deste total, 60,8% dos pacientes apresentaram apenas uma infecção, 35,9% apresentaram de 2 a 3 infecções e 3,3% apresentaram mais de 3 infecções causadas por fungos (Tabela 7).

Barchiese et al. (2002) ao avaliarem a prevalência de colonização em função da carga viral, quantificação de linfócitos CD4⁺, esquema anti-retroviral utilizado e antecedente de candidíase de orofaringe verificaram que o único fator que influenciou a presença de colonização foi o antecedente de candidíase de orofaringe ($p=0.009$), que foi presente em 35% dos pacientes colonizados e em 9% dos não colonizados. Estudo realizado por Gottfredsson et al. (1999) demonstrou história prévia de infecção fúngica em 36% dos pacientes colonizados e 24% dos não colonizados, não sendo significativo, mas evidenciando valores próximos ao encontrado por Barchiese e colaboradores quando comparado ao grupo colonizado.

Assim como Barchiese et al. (2002), o presente estudo revelou significância ($p=0.0467$) para história prévia de candidíase, identificada em 37,4% dos pacientes colonizados e 27,1% dos pacientes não colonizados. Das infecções oportunistas causadas por vírus, herpes zoster foi a mais frequente ($p=0.069$) evidenciada em 22,4% dos pacientes colonizados e 11,4% dos pacientes não colonizados. O grupo colonizado apresentou maior

incidência de onicomicose ($p=0.0287$) e linfoma não Hodgkin ($p=0.038$), quando comparado ao grupo não colonizado, ressaltando que apenas os pacientes do grupo colonizado apresentaram linfoma não Hodgkin (Tabela 9).

O presente estudo revelou um percentual pequeno de pacientes que não apresentaram infecções oportunistas desde a infecção pelo HIV até o momento da coleta do material clínico da mucosa oral, sendo 28 (20%) dos 140 pacientes colonizados e 51 (27,7%) dos 184 pacientes não colonizados. A este achado está relacionado à classificação clínica da infecção pelo HIV.

São poucos os estudos que citam a classificação clínica da infecção pelo HIV, dentre eles destacamos o de Tacconelli et al. (2002) que revelaram 27% de pacientes classificados como B e 72% como C, em um universo de 69 pacientes com infecção pelo HIV em uso de TARV com candidíase oral.

Recentemente, Melo et al. (2004) estudaram a flora oral de *Candida* em pacientes com infecção pelo HIV em uso de TARV. Foram obtidos 173 isolados da cavidade oral de 114 pacientes do Hospital de Clínicas da Unicamp, de agosto de 1997 a janeiro de 1999. Os pacientes foram classificados em quatro: A2, B2, B3 e C3, de acordo com os critérios definidos pelo sistema de revisão da classificação do centro para controle de doenças e a prevenção (CDC 1993). Verificou-se que o grupo C3 foi o mais freqüente (41,2%), seguido dos grupos B2 (32,4%), B3 (18,4%) e A2 (7,8%).

Nosso estudo não encontrou significância em relação à classificação clínica da infecção pelo HIV, quando comparado os dois grupos estudados. No entanto, revelou que a classificação clínica mais prevalente foi a C3 representada por 50,9% dos pacientes estudados, assim como descrito por Melo et al. (2004) (Tabela 10).

Recentes estudos têm investigado o efeito direto dos IPs sobre a *C. albicans* (Cassone et al., 1999; Diz Dios et al., 2000; Patton et al., 2000; Blanco et al., 2003). Desde a introdução desses agentes no tratamento da aids, tem ocorrido redução da incidência de candidíase oral, mesmo na presença de resistência do HIV ao tratamento anti-retoviral ou antes da recuperação do número de células $CD4^+$ (Cauda et al., 1999). Os IPs inibem a

secreção da aspartil proteinase da *C. albicans* que é o principal fator patogênico dessa levedura e apresenta semelhanças em relação à proteinase do HIV (Cassone et al., 1999; Diz Dios et al., 2000).

Cauda et al. (1999) realizaram um estudo observacional caso-controle prospectivo, durante um ano, com o objetivo de avaliar o impacto da TARV sobre a incidência de infecções oportunistas. Os autores compararam 30 pacientes que utilizaram IPs e 63 que não o utilizaram e observaram notável redução da incidência de candidíase orofaríngea nos pacientes tratados com IPs, em comparação com aqueles não tratados. No primeiro grupo, apenas 2/30 pacientes (6,6%) apresentaram recorrência de candidíase e no segundo, 36/63 (54%) sofreram um ou mais episódios de candidíase durante o estudo.

Em estudo realizado com 75 pacientes que não utilizaram antifúngicos, pelo menos um episódio de candidíase orofaríngea ocorreu em 56% dos pacientes enquanto receberam apenas inibidores da transcriptase reversa; esta cifra caiu para 9,3% dos pacientes, depois que eles receberam a terapia combinada contendo inibidor de protease durante pelo menos 6 meses. Neste estudo, a redução dos episódios de candidíase orofaríngea foi relacionada com o aumento das contagens de células CD4⁺ e de neutrófilos circulantes (Diz Dios et al., 1999).

Objetivando comparar a prevalência de lesões orais antes e após o advento dos IPs, Patton et al. (2000) avaliaram um grupo de 271 pacientes no período de maio de 1995 a fevereiro de 1999. Foi observada queda da prevalência de lesões orais, de 47,6% para 37,5% (p=0.014). Com relação à candidíase orofaríngea, a redução observada foi discreta: de 20,3% para 16,7% (p=0.272), ao contrário do observado por outros autores (Cassone et al., 1999; Cauda et al., 1999; Diz Dios et al., 1999; Korting et al., 1999).

Estudo realizado por Costa et al. (2006), descreveu que 79,1% dos pacientes colonizados e 75,7% dos não colonizados por *Candida* spp. em cavidade oral faziam uso de TARV, no entanto não cita os esquemas utilizados nem o uso de IP. Gottfredsson et al. (1999), mostraram que do total de 83 pacientes estudados, 48% dos colonizados e 52% dos não colonizados por *Candida* spp. na cavidade oral faziam uso de TARV com IP, no entanto também não descreveram o esquema anti-retroviral utilizado. Ambos os estudos

não analisaram o impacto da TARV com IP no tratamento da candidíase, por este motivo não podemos utilizá-los como referência para análise deste dado, no presente estudo.

O principal estudo de referência, do presente trabalho, realizado por Barchiese et al. (2002) não evidenciou diferenças significativas em relação ao esquema anti-retroviral com ou sem IP ao comparar grupo de pacientes com presença e ausência de colonização oral por *Candida* spp.. O estudo demonstrou que 68% dos pacientes colonizados e 50% dos não colonizados faziam uso de 2 NRTIs + 1 IP, que 29% dos pacientes colonizados e 44% dos não colonizados faziam uso de 2 NRTIs + 1 NNRTI e que os demais faziam uso de 3 NRTIs.

Assim como no estudo de Barchiese et al. (2002), o presente estudo evidenciou a prevalência do uso de esquemas anti-retrovirais preferenciais, conforme as recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV, do Ministério da Saúde, 2004. Do total de pacientes estudados, 40,8% fizeram uso de 2 NRTIs + 1 NNRTI, (37,9% colonizados e 42,9% não colonizados) e 35,2% de 2 NRTIs + 1 IP (33,6% colonizados e 36,4% não colonizados) (Tabela 11).

Embora estudos da literatura demonstrem que os IPs atuam na protease do HIV e também na produção de proteinase aspártica pelo *C. albicans* (Gruber et al., 1998; Borg-Von et al., 1999; Cassone et al., 1999; Cauda et al., 1999; Diz Dios et al., 1999; Korting et al., 1999), tanto o estudo de Barchiese et al. (2002) como o nosso, verificaram que o uso de IP não influenciou na presença ou ausência de colonização de orofaringe por *Candida* (Tabela 12).

Esperávamos que o uso do IP pudesse diminuir a colonização por *Candida* na cavidade oral considerando os estudos prévios sobre o efeito de PI na redução da reincidência de candidíase oral (Kirkpatrick et al., 1998; Martinez et al., 2002). Nossos resultados sugerem enfaticamente que o estado imune dos pacientes determinou maior prevalência no transporte de leveduras nestes pacientes do que o não uso de IP. De particular interesse, nossos pacientes infectados por HIV que colonizaram a *Candida* na cavidade oral foram submetidos à terapia anti-retroviral de resgate se comparados com não

colonizados, corroborando nossa hipótese de que a colonização por *Candida* foi principalmente determinada pelo estado imunológico de nossos pacientes.

Nossa população de estudo contou com um número substancial de pacientes se comparada com estudos prévios e com pacientes estudados que foram submetidos à terapia ARV por um longo período de tempo. Quando analisamos a porcentagem de transporte da *Candida* de acordo com o ano de diagnóstico do HIV, não achamos diferença significativa comparando pacientes diagnosticados entre 1983 e 1995 com aqueles diagnosticados recentemente, independente do tratamento com ARV. De maneira interessante, a duração do tempo de uso da TARV não foi correlacionada com o status de transporte. Esperamos que pacientes sob uso prolongado de terapia ARV e uso de IP podem hospedar *Candida* de uma maneira menos freqüente, baseando-se na potente atividade antifúngica destas drogas de acordo com estudos in vitro (Korting et al., 1988; Gruber et al., 1999) e dados clínicos (Tappuni et al., 2001).

Por nota, nossos pacientes colonizados por *Candida* na cavidade oral tiveram significativamente mais infecções oportunistas, como candidíase oral previa, onicomicose, herpes zoster e 4 pacientes com linfoma não Hodgkin. Se comparados com nossos pacientes não colonizados foram substantivamente consistentes com os dados laboratoriais que demonstraram quantidade menor de células $CD4^+$ mm^3 e carga viral detectável.

Em conclusão, nossos dados sugerem que o status imunológico dos pacientes infectados por HIV estava diretamente correlacionado com a colonização por *Candida* spp. na cavidade oral. Nossos pacientes estavam significativamente mais imunossuprimidos do que aqueles não colonizados. Seu estado de imunossupressão foi consistente com nossos resultados obtidos de diferentes análises: tais pacientes tiveram mais infecções oportunistas prévias e malignidades, contagem de células $CD4^+$, carga viral mais detectável (> 50 cópias/mL) e foram submetidos mais freqüentemente à TARV de resgate. O tempo de duração da infecção por HIV aparentemente não influenciou o risco de colonização pelas espécies de *Candida* nem por um sorotipo particular. O fato importante foi que nossos pacientes “sofreram significativamente na TARV de resgate”. Concluímos que o uso de T ARV efetiva é essencial para determinar carga viral indetectável, contagem maior de células $CD4^+$ e conseqüentemente melhora do status imunológico em pacientes; e não o uso

de IP. Nossos achados enfatizam a complexidade da colonização por *Candida* oral em pacientes infectados pelo HIV que se submetem à terapia ARV. Como novas classes de agente anti-retrovirais estão sendo lançadas, serão necessários estudos adicionais envolvendo acompanhamento.

O estudo epidemiológico, do presente trabalho, contribuiu de forma significativa para traçar o perfil epidemiológico dos pacientes HIV positivos, em uso de TARV, acompanhados no Ambulatório Geral de Infectologia no HC/Unicamp e no Ambulatório do Grupo de Pesquisa Clínica da Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) da Disciplina de Infectologia da FCM/Unicamp, no período de agosto de 2003 a abril de 2004.

5.2- Estudo microbiológico

A compreensão progressiva sobre a dinâmica viral e celular, e o melhor conhecimento dos mecanismos de ação farmacológica e de resistência aos medicamentos anti-retrovirais têm permitido substanciais avanços no controle clínico da imunodeficiência causada pelo HIV. Entretanto, a TARV é um campo extremamente complexo e dinâmico e, apesar dos muitos avanços ocorridos nos últimos anos, questões importantes como o impacto desta em relação à colonização por *Candida* na orofaringe em pacientes com aids carecem de estudos, para permitir a sua utilização de forma mais ampla na prática clínica diária com eficácia e segurança, dentre eles: aumento da incidência de espécies não-albicans, resistência de *Candida* spp. devido ao uso prévio de antifúngicos, uso de novos antifúngicos, estratégias de tratamento e manejo dos efeitos colaterais de longo prazo. Para tal, seguem-se os comentários sobre os resultados abaixo:

Encontramos na literatura uma rica bibliografia referente à colonização oral por *Candida* spp. em pacientes com infecção pelo HIV, dentre eles o estudo realizado por Vargas e Joly (2002). No entanto, são poucos os estudos que pesquisaram o impacto da TARV em grupos colonizados e não colonizados por *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV em uso de anti-retrovirais (Gottfredsson et al., 1999; Barchiese et al., 2002; Costa et al., 2006).

As taxas de colonização por *Candida* spp. em cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV e em uso de TARV têm sido bastante variáveis, como demonstrado nestes recentes estudos: 62,6% (Costa et al., 2006), 67% (Barchiese et al., 2002) e 70% (Gottfredsson et al., 1999).

Em estudo prospectivo com 132 pacientes com aids, conduzido no Brasil, Milan et al. (1998) observaram que 81,8% dos pacientes apresentavam cultura positiva para *Candida* spp. na cavidade bucal. É importante salientar que mais da metade dos pacientes fazia uso de TARV.

O presente trabalho evidenciou taxa de colonização oral por *Candida* spp. em 140 (43,2%) pacientes dos 324 estudados, representando o grupo colonizado. Esta taxa foi mais baixa que as encontradas por Milan et al. (1998), Gottfredsson et al. (1999), Barchiese et al. (2002) e Costa et al. (2006) (Figura 1).

C. albicans foi a espécie predominante no presente estudo, sendo verificada em 84,5% dos 140 pacientes colonizados, assim como o verificado por Gottfredsson et al. (1999), Barchiese et al. (2002) e Costa et al. (2006), que encontraram prevalência de 50%, 93% e 95% de *C. albicans* na colonização oral, respectivamente.

No estudo prospectivo de Milan et al. (1998) foi evidenciada a prevalência de *C. albicans* em 78% das cepas isoladas. No estudo multicêntrico de Sant'Ana et al. (2004) também realizado no Brasil, para avaliar a flora oral por *Candida*, em pacientes com infecção pelo HIV, foi mostrado que 91% eram *C. albicans* e 9% eram espécies não-*albicans*. Do total de pacientes estudados, somente 37% faziam uso de TARV.

Aumento do número e das espécies não-*albicans*, representado em 42,1%, foi relatado por Melo et al. (2004), no Brasil, ao estudarem a flora oral de pacientes HIV positivo, em uso de TARV. Dentre as espécies mais prevalentes destacam-se: *C. krusei* (13 cepas), *C. lusitaniae* (9 cepas), *C. tropicalis* (8 cepas), *C. parapsilosis* (8 cepas) e *C. glabrata* (5 cepas). A prevalência de espécies não-*albicans* aumenta com o declínio imunológico e a exposição a drogas antifúngicas (Tumbarello et al., 1997; Hunter et al., 1998).

Costa et al. (2006) demonstraram que *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram as espécies não-*albicans* mais freqüentes isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV em uso de TARV. *C. krusei* e *C. glabrata* foram as espécies mais prevalentes no estudo realizado por Barchiese et al. (2002) e Milan et al. (1998). No recente estudo de Sant'Ana et al. (2004) as espécies não-*albicans* mais isoladas foram *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

No presente trabalho as espécies não-*albicans* representaram 15,5% do total de cepas isoladas, com predomínio de *C. glabrata* e *C. tropicalis* (Figura 2).

Com relação aos sorotipos de *C. albicans*, foi observado, no presente estudo, que 88,5% das cepas de *C. albicans* foram identificadas como sorotipo A e 11,5% como sorotipo B. A identificação dos sorotipos de *C. albicans* tem sido utilizada com propósitos epidemiológicos (Barturen et al., 1995), mas não parece haver relação entre o sorotipo de *C. albicans* e a patogeneidade da cepa, bem como não se pode associar um sorotipo em particular como indicador de imunossupressão (Torssander et al., 1996; Oliver et al., 1999). Entretanto foi demonstrado que determinantes do sorotipo A estão largamente envolvidos em mecanismos de aderência de *C. albicans* às células epiteliais bucais humanas (Miyakawa et al., 1992).

A maioria dos estudos realizados na Europa e Américas aponta que o sorotipo A é o mais freqüentemente isolado na orofaringe de indivíduos HIV positivo ou HIV negativos. Capoluongo et al. (2000) estudaram 41 cepas de *C. albicans* (78% sorotipo A e 22% sorotipo B) isoladas da cavidade oral de 41 pacientes com colonização oral. Sánchez-Vargas et al. (2005) conduziram estudo longitudinal da cavidade oral de 111 (51 adultos e 60 crianças) pacientes com infecção pelo HIV e 201 (109 adultos e 92 crianças) pacientes sem infecção pelo HIV. Os autores identificaram colonização oral por 62/71 cepas de *C. albicans* sorotipo A e 9/71 cepas de *C. albicans* sorotipo B.

Estudos realizados no Brasil apresentaram taxas de colonização oral pelo sorotipo A de 69,3% (Sant'Ana et al., 2002), 70% (Pires et al., 1996; Melo et al., 2004) e 74,6% (Milan, 2001), quando analisadas o total de *C. albicans* isoladas em ambos os

estudos. Estes achados estão de acordo com os dados do presente estudo, no entanto foi encontrada incidência mais alta do sorotipo A do que as relatadas pelos autores acima.

O presente trabalho verificou o predomínio de *C. albicans* e grande diversidade de espécies não-*albicans*, incluindo-se *C. dubliniensis*. No entanto, estudos futuros são necessários para compreender diferenças microbiológicas e clínicas entre os sorotipos de *C. albicans*.

Casos de colonização ou infecção por mais de uma espécie de levedura na cavidade oral de pacientes com aids tem sido relatada por alguns autores (Martins et al., 1997; Milan, 2001; Tacconelli et al., 2002).

A taxa de colonização mista e coinfeção por *C. albicans* e *C. não-albicans* em cavidade oral de 82 pacientes com aids, publicada por Martins et al. (1997) foi de 18%. No estudo realizado por Milan (2001) a taxa de coinfeção oral por mais de uma espécie foi de 8,6% e as associações mais freqüentes foram *C. albicans* + *C. glabrata* (5 casos) e *C. albicans* + *C. tropicalis* (2 casos). Tacconelli et al. (2002) identificou taxa de colonização mista de 18%, idêntica a taxa relatada por Martins et al. (1997) e associação de *C. albicans* + *C. glabrata* (7 casos) a mais prevalente, concordando com os relatos achados por Milan (2001).

No presente estudo foram isoladas 154 cepas de 140 pacientes do grupo positivo. A taxa de colonização mista foi de 16,88% e mostrou-se próxima às taxas relatadas por Martins et al (1997) e Tacconelli et al. (2002). Foi identificada em 12 pacientes, dos quais 2/12 apresentaram colonização por três espécies de *Candida* e 8/12 por duas espécies (Tabela 17). Ao contrário dos estudos de Milan (2001) e Tacconelli et al. (2002), no presente trabalho não foi evidenciada prevalência de associação de espécies, uma vez que estas foram diferentes entre si. É importante ressaltar que 2/12 pacientes apresentaram associação pela mesma espécie (*C. albicans* sorotipo A), no entanto uma associação mostrou diferença entre os perfis moleculares e a outra entre os perfis fenotípicos. Não existem relatos na literatura sobre estas diferenças, por este motivo não foi possível comparar este dado. A este achado ressaltamos a importância de se realizar um isolamento e identificação das leveduras de forma eficaz e confiável.

Candida dubliniensis é uma levedura considerada emergente, originalmente associada com a colonização e infecção oral em pacientes HIV-positivos e com aids (Sullivan et al., 1995; Coleman et al., 1997; Sullivan et al., 1997). Segundo Sullivan e Coleman (1998), na maioria dos casos, isola-se *C. albicans* e *C. dubliniensis* na mesma placa e, como a identificação é desenvolvida a partir de uma única colônia, *C. dubliniensis* pode ser negligenciada ou erroneamente identificada, com base na produção de tubo germinativo.

Nesse sentido, há grande preocupação de vários autores na inclusão de meios de isolamento que permitam a identificação preliminar de *C. dubliniensis*, como é o caso do CHROMagar Candida (CHROMagar Microbiology, Paris, France) e do ágar Sabouraud com azul de metileno que evidencia fluorescência de *C. albicans*, mas não em *C. dubliniensis*, permitindo diferenciá-las. Os testes fenotípicos que permitem a caracterização de *C. dubliniensis* incluem sacarose (+), xilose (-) e ausência de crescimento a 42-45°C (Kirkpatrick et al., 1998). No entanto, estudos evidenciaram que os testes fenotípicos, quando utilizados isoladamente são insuficientes para a identificação definitiva de *C. dubliniensis* (Schoofs et al., 1997; Kirkpatrick et al., 1998; Odds et al., 1998).

Com relação à incidência desta levedura, os melhores dados disponíveis são os da população irlandesa, onde foi isolada da boca de 27% de indivíduos HIV positivos e de 32% de pacientes com aids e candidíase oral. Da cavidade oral de indivíduos sadios foi isolada de 3% e dos HIV negativos, mas com candidíase oral foi de 14,6% (Sullivan e Coleman, 1998; Sullivan et al., 1998; Sullivan et al., 1999). Nos Estados Unidos, as taxas elevadas variaram de 11,1 a 17,5% (Kirkpatrick et al., 1998; Meiller et al., 1999).

O primeiro relato brasileiro na literatura foi realizado por Sano et al. (2000) que isolaram *C. dubliniensis* da cavidade oral de uma criança de 3 anos HIV positiva, atendida no departamento de pediatria do HC/Unicamp.

No estudo de Milan et al (2001), 13/177 (7,3%) isolados da cavidade oral com colônias verdes no CHROMagar Candida[®] apresentaram crescimento débil ou ausente a 42°C. Apesar deste método fenotípico ser considerado o melhor teste de triagem, a identificação definitiva de *C. dubliniensis* só pode ser determinada através do uso de provas

moleculares apropriadas. Dos 13 isolados selecionados, quatro apresentaram identificação genotípica de *C. dubliniensis* e foram recuperados de três pacientes com categorias clínicas A2 e A3, de acordo com o sistema de classificação do CDC.

De acordo com Sullivan et al. (1999), muitos dos pacientes HIV positivos colonizados por *C. dubliniensis* têm história de candidíase oral recorrente e têm recebido tratamentos prolongados com azólicos. Os fatores de risco para adquirir infecção por *C. dubliniensis* permanecem obscuros (Kirpatrick et al., 1998; Schoofs et al., 1998). Segundo Milan (2001), a baixa incidência (2,2%) de isolados de *C. dubliniensis* coletados da cavidade oral de pacientes assintomáticos na fase inicial da aids, pode estar associada à ausência do uso prévio de azólicos, uma vez que os pacientes não tinham utilizado antifúngicos nos últimos 10 meses.

No presente trabalho, 10/132 (7,6%) isolados da cavidade oral com colônias verdes no CHROMagar Candida[®] apresentaram xilose negativa (Tabela 15). A ausência de crescimento a 42°C foi evidenciada em 7/132 (5,3%) dos isolados e o crescimento débil a 42°C em 22/132 (16,6%) dos isolados. Apesar do método fenotípico de crescimento a 42°C ser considerado o melhor teste de triagem, o mesmo não mostrou 100% de eficácia. Ao contrário do teste de xilose, que assim como Kirkpatrick et al. (1998), mostrou-se eficaz. Assim como no estudo de Milan (2001), a identificação definitiva de *C. dubliniensis* só pode ser determinada através do uso de prova molecular apropriada. Dos 10 isolados selecionados, dois apresentaram identificação genotípica de *C. dubliniensis* e foram recuperados de pacientes com categorias clínicas A2 e C3, de acordo com o sistema de classificação do CDC (Tabela 16).

Igualmente ao descrito por autores nacionais, o presente estudo determinou uma baixa incidência 2/132 (1,5%) de *C. dubliniensis* na população HIV positiva brasileira. Segundo Milan (2001), a baixa incidência de *C. dubliniensis* na população HIV positiva brasileira pode refletir uma peculiaridade genuína dessa população, em decorrência de aspectos geográficos, sociais e clínicos. Não sendo de surpreender que *C. dubliniensis* tenha exibido padrões epidemiológicos em diferentes países.

No entanto, verificou-se que o paciente C3 fez uso prévio de fluconazol e nistatina e apresentava, no momento da coleta da amostra, carga viral indetectável e CD4⁺ abaixo de 200 cels/mm³ e que o paciente A2 não fez uso prévio de antifúngico e apresentava, no momento da coleta da amostra, carga viral detectável e CD4⁺ acima de 350 cels/mm³. A estes achados, concluímos que ainda é incerta a correlação entre *C. dubliniensis* e a categoria clínica da aids, a contagem de CD4⁺, a carga viral e o uso prévio de azólicos.

O presente estudo foi concordante com a literatura e verificou que os testes fenotípicos de identificação de *C. dubliniensis* não são confiáveis, sendo necessária a utilização de métodos moleculares, tais como o seqüenciamento, para diferenciá-las.

A revolução na biologia molecular tem aumentado, dramaticamente, a capacidade dos pesquisadores para estudar inúmeras infecções fúngicas, especialmente aquelas causadas pelo patógeno oportunista *C. albicans* e outras espécies de *Candida*. Muitos sistemas moleculares encontram-se disponíveis para os propósitos científicos epidemiológicos, genéticos, evolutivos, taxonômicos e sistemáticos (Boriollo et al., 2005).

Métodos de genotipagem mostram similaridade entre amostras colonizadoras e infectantes, demonstrando a provável origem endógena da maioria das infecções por tais patógenos (Cole et al., 1996; Nucci et al., 2001).

Recentemente, a genotipagem de *C. albicans* tem sido realizada na tentativa de definir associações patogênicas. Essas técnicas incluem o PFGE para a realização da cariotipagem, o qual é empregado principalmente para esclarecer as diferenças inter e intra específicas, sendo considerado a melhor abordagem para a diferenciação entre cepas. O espectro de cariótipos de *C. albicans* isolados de pacientes HIV positivos é amplo, segundo alguns autores e reduzido, de acordo com outros (Capoluongo et al., 2000).

Com o objetivo de determinar a variabilidade genotípica de 41 cepas de *C. albicans* (78% sorotipo A e 22% sorotipo B) isoladas da cavidade oral de 41 pacientes com colonização oral, Capoluongo et al. (2000), através da técnica de PFGE, observaram a geração de 41 perfis genotípicos distintos, indicando alta variabilidade genotípica. O

sorotipo A foi dominante e o sorotipo B estava presente nos pacientes em estágio avançado da doença (35% nos estágios B e C) conforme classificação do CDC, no entanto esta diferença não foi significativa.

Pfaller et al. (1994) avaliaram, por PFGE, 121 isolados de *C. albicans*, recuperados de 71 episódios de candidíase orofaríngea em 29 pacientes avaliados durante uma média de 3 meses. Os autores observaram considerável diversidade genética entre as cepas de *C. albicans* obtidas de indivíduos com aids e candidíase orofaríngea. Embora 38% dos pacientes estivessem infectados ou colonizados pelo mesmo subtipo de DNA em culturas seqüências, a maioria (62%) dos pacientes apresentaram episódios seqüenciais de infecção causados por subtipos diferentes de DNA de *C. albicans*.

Lupetti et al. (1995) realizaram estudo comparativo por PFGE de isolados da cavidade oral de 40 pacientes com infecção pelo HIV (sintomáticos para candidíase oral) e 26 indivíduos saudáveis. Sete a 10 bandas cromossômicas dos perfis genotípicos foram obtidas com significância e reprodutibilidade diferentes na distribuição do DNA. Foram identificadas 7 classes de *C. albicans*, as quais foram designadas como tipo A (8 bandas), B (8 bandas), C (7 bandas), D (9 bandas), X (10 bandas), Y (10 bandas) e Z (9 bandas). Os autores demonstraram que os tipos mais encontrados foram A, B, C e D em ambos os grupos. Para o grupo com infecção pelo HIV foram encontrados os tipos B (61,5%) e C (38,5%) e para o grupo saudável os tipos B (45%), C (25%), A (15%) e D (7,5%). A prevalência dos tipos de genótipos B e C, em pacientes com infecção pelo HIV, assim como nos indivíduos saudáveis, sugere que cepas comensais na cavidade oral de indivíduos saudáveis seja talvez subsequente agente prevalente de candidíase oral nos indivíduos imunocomprometidos.

O presente trabalho observou considerável diversidade genotípica entre as cepas de *C. albicans* sorotipo A, uma vez que identificou 15 perfis genômicos entre as 115 cepas estudadas, dos quais os perfis predominantes A₁ (56,5%) apresentou 7 bandas cromossômicas e o perfil A₃ (16,5%) apresentou 8 bandas cromossômicas (Tabela 18 e Figuras 4 e 5). Estes achados foram similares aos resultados descritos por Lupetti et al. (1995), que encontraram 7 classes de *C. albicans* para 66 cepas estudadas e verificaram que as classes B e C eram as mais prevalentes, com 8 e 7 bandas

cromossômicas, respectivamente. Ao realizar análise visual dos perfis predominantes de ambos os estudos, observou-se que os mesmos são idênticos, no entanto não podemos afirmar estes achados sem realizar corrida eletroforética com as cepas juntas. A estes achados podemos sugerir que existe um perfil predominante entre as cepas de *C. albicans* que colonizam a cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV, antes e pós-tratamento com anti-retrovirais, uma vez que Lupetti e colaboradores não citam o uso de TARV pelos pacientes estudados.

Em relação às 15 cepas de *C. albicans* sorotipo B observou-se, no presente estudo, uma baixa diversidade genotípica, uma vez que foi identificado três perfis genômicos diferentes. O perfil predominante B₁ (86,6%) apresentou 7 bandas cromossômicas e os demais B₂ (6,7%) e o B₃ (6,7%) apresentaram 9 e 8 bandas cromossômicas, respectivamente. Verificou-se que o perfil predominante B₁ de *C. albicans* sorotipo B mostrou-se idêntico (100% similaridade) ao perfil predominante A₁ de *C. albicans* sorotipo A (Tabela 18 e Figuras 6 e 7). Não existem dados na literatura, que comparem, genotipicamente, os sorotipos de *C. albicans*.

No estudo de Capoluongo et al. (2000) foram identificadas 9/41 cepas de *C. albicans* sorotipo B isoladas da cavidade oral de 41 pacientes com infecção pelo HIV, as quais mostraram variação das bandas em padrão gaussiano e foram associadas a indivíduos em estágio avançado da doença (B e C), conforme classificação do CDC. Achados similares foram observados no presente estudo, no qual verificou que 41/65, 8/65, 1/65 e 1/65 das cepas do perfil predominante A¹ de *C. albicans* sorotipo A foram isoladas de pacientes no estágio C3, B3, B2 e C2, respectivamente, segundo classificação do CDC. Para o perfil A³ de *C. albicans* sorotipo A verificou que 14/21, 3/21 e 1/21 das cepas foram isoladas de pacientes no estágio C3, B2 e C2, respectivamente. Em relação ao perfil predominante B¹ de *C. albicans* sorotipo B verificou-se que 10/18 cepas foram identificadas de pacientes no estágio C3 e 2/18 no estágio B2. Tanto o perfil B² quanto o B³ de *C. albicans* sorotipo B foram identificados de pacientes no estágio B2.

A análise do perfil molecular de *C. glabrata* observou heterogeneidade em relação a todos os 7 perfis estudados (Tabela 19 e Figuras 8 e 9) e mostrou que PFGE é uma técnica eficaz para determinar a variabilidade desta espécie, assim os resultados descritos por Di Francesco et al. (1999) e Klempp-Selb et al. (2000).

Heterogeneidade também foi observada no estudo do perfil molecular das duas cepas *C. dubliniensis*, por PFGE, que revelou similaridade do perfil genômico D² de 93% e 88% entre os perfis predominantes A¹ e A³ de *C. albicans* sorotipo A, respectivamente. O perfil genômico D¹ mostrou similaridade de 59% entre os perfis predominantes A¹ e A³ de *C. albicans* sorotipo A (Tabela 19 e Figuras 10 e 11).

O tratamento da candidíase oral é geralmente efetivo e envolve, usualmente, o uso tópico ou sistêmico de terapia antifúngica com drogas, como os poliênicos (anfotericina B e nistatina) e os azólicos (fluconazol, itraconazol e cetaconazol). No entanto, em razão da imunossupressão nos pacientes com infecção pelo HIV, episódios de reinfecção são comuns e muitos destes pacientes são submetidos a tratamentos mais longos, como no caso da infecção oral por *C. albicans* (Pfaller et al., 1994).

No presente estudo foi evidenciado que 45,7% dos pacientes fizeram uso prévio de antifúngico e que, no momento da coleta, 4,3% estavam fazendo uso de antifúngicos (Tabela 13). Não foi evidenciada significância em relação ao uso dos antifúngicos, quando comparado os dois grupos de pacientes estudados, exceto para nistatina que apresentou significância para o grupo que apresentou colonização por *Candida* spp. (p=0.014) (Tabela 14).

Segundo Schuman et al. (1998), o uso prévio de antifúngicos foi associado à maior colonização por espécies de *Candida* não-*albicans* (p=0.012).

Tacconelli et al. (2002) realizaram estudo da suscetibilidade aos azólicos de 69 pacientes com candidíase oral, que apresentavam infecção pelo HIV e estavam em uso de TARV. O uso prévio de fluconazol, itraconazol e nistatina foi observado em 69%, 16% e 11% dos pacientes, respectivamente. Os autores compararam a resistência ao fluconazol e itraconazol com a era pré TARV. Verificaram significativa redução de fluconazol de 45%

para 10% ($p < 0.001$) e de itraconazol de 37% para 7% ($p < 0.001$). Este estudo mostra que o uso de TARV reduz o uso de antifúngico, conseqüentemente, resulta em menor colonização/infecção por *Candida não-albicans* e menor ocorrência de resistência.

Os valores de CIM para *C. glabrata* e *C. krusei* são habitualmente mais elevados do que para *C. albicans*, visto que as duas primeiras espécies são naturalmente menos sensíveis aos azólicos. (Millon et al., 1994; Rex et al., 1995b; Rex et al., 1997).

Milan et al. (1998) conduziram o primeiro estudo brasileiro, para avaliar a suscetibilidade aos antifúngicos de isolados de *Candida* spp. de cavidade bucal de pacientes com aids, utilizando a metodologia preconizada pelo NCCLS e observaram taxa de S-DD/resistência de 19% a um ou mais azólicos, entre 109 pacientes colonizados ou infectados por leveduras em cavidade bucal. As taxas de S-DD / resistência ao fluconazol, itraconazol e cetoconazol foram de 10%, 16% e 13%, respectivamente. Cerca de 3,5% (3/85) dos isolados de *C. albicans* e 75% (18/24) das espécies não-*albicans* (8 *C. glabrata*, 7 *C. krusei* e 3 outras) foram S-DD / resistentes a um ou mais azólicos.

Salobrenã et al. (1999) estudaram 140 isolados de colonização ou infecção bucal de pacientes com aids e obtiveram taxa de resistência / S-DD de 8,5% (12/140) para fluconazol e cetoconazol e de 10% (14/140) para itraconazol. É importante salientar que 100% dos isolados de *C. não-albicans* (3 *C. krusei* e 2 *C. glabrata*) foram S-DD ou resistentes aos três azólicos, enquanto 5,2% (7/135) das *C. albicans* foram S-DD ou resistentes ao fluconazol e cetoconazol e 6,6% (9/135) foram S-DD ou resistentes ao itraconazol.

A taxa de resistência ao fluconazol varia de 4 a 15% e os fatores de risco mais relevantes são: imunossupressão profunda, exposição prévia aos azólicos, com uso prolongado ou de elevadas doses desses agentes, e uso prolongado de antibióticos. O nível plasmático de RNA do HIV-1 é bom preditor de colonização orofaríngea por *Candida*. No entanto, ainda não está claro se este marcador é considerado fator de risco para a ocorrência de resistência ao fluconazol (Fichtenbaum et al., 2000).

Barchiese et al. (2002) ao avaliarem a prevalência de colonização em função da carga viral, quantificação de linfócitos CD4⁺, esquema anti-retroviral utilizado e antecedente de candidíase de orofaringe demonstraram que 93% das amostras foram sensíveis e que 7% foram S-DD ao fluconazol.

Colombo et al. (2006) realizaram, de março de 2003 a dezembro de 2004, estudo multicêntrico prospectivo de 712 casos de candidemia, diagnosticados em diferentes centros de saúde de nove grandes cidades do Brasil. Os autores observaram que a taxa de incidências de levedura foi de 40,9% para *C. albicans*, 20,9% para *C. tropicalis* e 20,5% para *C. parapsilosis*. Foi observada resistência ao fluconazol em 6 (0,8%) dos isolados, incluindo *C. albicans* (1), *C. glabrata* (2) e *C. krusei* (3). Sensibilidade dose dependente foi identificada em 27 (4%) dos casos, sendo: *C. albicans* (1), *C. glabrata* (15), *C. krusei* (5), *C. tropicalis* (2), *C. guilliermondii* (2), *C. pelliculosa* (1) e *Pichia ohmeri* (1).

Ao avaliar o perfil de suscetibilidade dos 154 isolados (130 *C. albicans* e 24 *C. não-albicans*), no presente estudo, foi possível observar maiores valores de CIM para espécies não-*albicans*, as quais mostraram-se S-DD aos azólicos, principalmente para *C. glabrata* (Tabela 23).

Os 130 isolados de *C. albicans* (115 sorotipo A) e 15 (sorotipo B) mostraram-se sensíveis às drogas estudadas e não evidenciaram diferenças significativas nos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ entre os sorotipos (Tabela 22).

O presente estudo foi concordante com a literatura e permitiu verificar a necessidade de vigilância periódica em relação à suscetibilidade aos antifúngicos azólicos das espécies de *Candida* não-*albicans*.

Este é o único estudo transversal, realizado no Brasil, que se propõe a avaliar o impacto da TARV sobre a colonização oral por *Candida* spp. em pacientes com infecção pelo HIV, com ênfase em três importantes variáveis da área da saúde: a epidemiologia, a clínica e a microbiologia.

6- CONCLUSÃO

6.1- Estudo epidemiológico e clínico

- A distribuição da frequência das IO, no total de pacientes estudados, foi: candidíase (40,1%), tuberculose (20,9%), herpes zoster (16,3), PCP (15,7) e toxoplasmose (11,7).
- As IO que apresentaram significância para o grupo colonizado foram: herpes zoster ($p=0.006$), linfoma não Hodgkin ($p=0.021$).
- A presença de colonização foi significativamente maior em pacientes com carga viral detectável ($p=0.002$) e $CD4^+ < 200/mm^3$ ($p=0.006$), observando significância de 0.001 quando comparado com o grupo não colonizado.
- O uso prévio de nistatina ($p=0.014$) foi significativamente maior no grupo colonizado.
- Não houve diferenças entre os grupos estudados segundo a categoria clínica da doença, embora houvesse predomínio da categoria C3 em ambos.
- O uso de IP não influenciou na presença ou ausência de colonização oral por *Candida* spp..

6.2- Estudo microbiológico

- Foi identificada colonização mista por *Candida* spp. em cavidade oral de 12 pacientes.
- Houve predomínio de *C. albicans* sorotipo A e grande diversidade de espécies não *albicans*, sendo as mais prevalentes *C. glabrata* e *C. tropicalis*
- Os testes fenotípicos não apresentaram poder discriminatório adequado para a identificação de *C. dubliniensis*, quando comparados à identificação genotípica.

- Foi demonstrada considerável diversidade genotípica entre as *C. albicans* sorotipo A, as quais apresentaram 15 perfis genômicos. O perfil predominante (A¹) foi identificado em 56,5% das cepas.
- Noventa (86,6%) das cepas de *C. albicans* sorotipo B apresentaram perfil genômico homogêneo e 100% de similaridade com o perfil predominante de *C. albicans* sorotipo A.
- As sete cepas de *C. glabrata* mostraram perfis genômicos heterogêneos.
- Os dois perfis genômicos (D¹ e D²) das duas cepas de *C. dubliniensis* revelaram similaridade de 93% e 59%, quando comparados ao perfil predominante de *C. albicans* sorotipo A, respectivamente.
- As cepas de *C. albicans* mostraram-se sensíveis aos antifúngicos avaliados, enquanto as espécies não-*albicans* apresentaram S-DD aos azólicos, principalmente *C. glabrata*.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander JW, Boyces ST, Babcock GF. The process of microbial translocation. *Annals of Surgery* 1990; 212:496-510.
2. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389-402.
3. Arikan S, Ostrosky-Zeichner L, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Gordon D, Wallace T et al. In vitro activity of nistatin compared with those of liposomal nystatin, amphotericin B, and fluconazole against clinical *Candida* isolates. *J. Clin. Microbiol* 2002; 40(4):1406-12.
4. Asakura K, Iwaguchi S, Homma M, Sukai T, Higashide K, Tanaka K. Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *C. glabrata*. *J Clin Microbiol* 1991; 137:2531-8.
5. Atkinson JC, Yeh C, Oppenheim FG, Bermudez D, Baum BJ, Fox FC. Elevation of salivary antimicrobial proteins following HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990; 3(1):41-8.
6. Bachmann SP, Patterson TF, Ribot JLL. *In vitro* activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *Journal Clinical Microbiology* 2002; 40:2228-30.
7. Bagg T, Sweeney MP, Lewis MA, Jackson MS, Coleman D, Al MA et al. High prevalence of non-*albicans* yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. *Palliat Med* 2003; 7:477-81.
8. Barchiesi F, Hollis RJ, Del Poeta M, Mcgough DA, Scalise G, Rinaldi MG, et al. Transmission of fluconazole-resistant *Candida albicans* between patients with AIDS and oropharyngeal candidiasis documented by pulsed-field gel electrophoresis. *Clin Infect Dis* 1995; 21:561-4.
9. Barchiese F; Maracci M; Radi B; Arzeni D; Baldassarri I; Giacometti A 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. *JAC* 2002; 50:999-1002.

10. Barturen B, Bikandi J, San Millan R, Morangues MD, Regulez P, Quindós G, Pontón J. Variability in expression of antigens responsible for serotype specificity in *Candida albicans*. *Microbiology* 1995; 141(7): 1535-43.
11. Benson DA, Karshch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:17-20.
12. Berenguer J, Diaz-Guerra TM, Ruiz-Diez B, De Quir os JCB, Rodriguez-Tudela JO, Martinez-Suarez JV. Genetic dissimilarity of two fluconazole-resistant *Candida albicans* strains causing meningitis and oral candidiasis in the same AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1542-5.
13. Binolfi A, Biasoli MS, Luque AG, Tosello ME, Magaro HM. High prevalence of oral colonization by *Candida dubliniensis* in HIV-positive patients in Argentina. *Med Mycol* 2005; 43:431-37.
14. Blanco MT, Hurtado C, Perez-Giraldo C, Moran FL, Gonzalez-Velasco C, Gomez-Garcia AC. Effect of ritonavir and saquinavir on *Candida albicans* growth rate and in vitro activity of aspartyl peptidases. *Med Mycol*. 2003; 41:167-70.
15. Bodey GP. *Candidiasis, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*. 3rd Ed. Ed Raven Press. New York; 1993.
16. Boletim Epidemiológico – Aids e DST. Brasil, Brasília, Novembro de 2006.
17. Borg-Von Zepelin M, Meyer I, Thomssen R, Würzner R, Sanglard D, Telenti A, Monod M. HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *J Invest Dermatol* 1999; 113(5): 747-51.
18. Boriollo MFG, Höfling JF, Mendes A, Rosa EAR. Molecular tools for the characterization of *Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923) in epidemiological surveys. *Estud Biol* 2005; 27(58):21-47.
19. Bostock A, Khattak MN, Matthews R, Burnie J. Comparison of PCR fingerprinting by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1993; 139:2179-84.

20. Branchini ML, Geiger DC, Fischman O, Pignatari AC. Molecular typing of *Candida albicans* strains isolated from nosocomial candidemia. *Ver Inst Med Trop São Paulo* 1995; 37:483-7.
21. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1994; 32:452-6.
22. Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS (CNDST/AIDS). Revisão da Definição Nacional de AIDS em Adultos, 1992. Brasília: Divisão de DST/AIDS.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS (CNDST/AIDS). Revisão da Definição Nacional de AIDS em Indivíduos com 13 anos ou mais, 1998a. Brasília: Divisão de DST/AIDS.
24. Brasil. Ministério da Saúde. Critérios de definição de casos de aids em adultos e crianças. 2004.
25. Brasil. Ministério da Saúde. Recomendações para Terapia Anti-Retroviral em Adultos e Adolescentes Infectados pelo HIV. 2004.
26. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução 196/1996. Conselho Nacional de Saúde. Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, 1996.
27. Brawner DL. Comparison between methods for serotyping of *Candida albicans* produces discrepancies in the results. *J Clin Microbiol* 1991; 29(5):1020-5.
28. Brawner DL e Cutler JE. Oral *Candida albicans* isolates from non-hospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1989; 27(6): 1335-41.
29. Campisi G, Pizzo G, Milici ME, Mancuso S, Margiotta V. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects. *Oral Medicine* 2002; 93:281-286.

30. Campos J, Del Romero J, Castilha J, Garcia S, Rodriguez C, Bascones A. Oral candidiasis as a clinical marker related to viral load, CD4 lymphocyte count and CD4 lymphocyte percentage in HIV-infected patients. *Journal Oral Pathology Medicine* 2002; 31:5-10.
31. Capoluongo E, Moretto D, Giglio A, Belardi M, Prignano G, Crescimbeni E et al. Heterogeneity of oral isolates of *Candida albicans* in HIV-positive patients: correlation between candidal carriage, karyotype and disease satge. *J Med Microbiol* 2000; 49(11):985-91.
32. Cassone A, De Bernardes F, Torosantucci A, Tacconelli E, Tumbarello M, Cauda R. In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *J Infect Dis* 1999; 180(2):448-53.
33. Cauda R, Tacconelli E, Tumbarello M, Morace , De Bernardis F, Torosantucci A et al. Role of protease inhibitors in preventing recurrent oral candidiasis in patients with HIV infections: a prospective case-control study. *JAIDS* 1999; 21(1):20-5.
34. Cavassani VGS; Sobrino JA; Homem MGN; Ropoport A. Oral candidiasis as prognostic marker of HIV-infect patients. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2002; 5(8):630-4.
35. CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 1992,1993. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescent and adults. *MMWR*, 41(RR-17):1-19.
36. CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 1998. Report of the NIH panel do define principles of therapy oh HIV infection and guidelines for use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. *MMWR*, 47 (RR5): 1-41.
37. Cidrim JJC, Moreira JLB. *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1999. 287p.
38. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved M27-A2. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. 2º ed.

39. Cole GT, Halawa AA, Anaisse EJ. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clin Infect Dis* 1996; 22(suppl 1):73-88.
40. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennet DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS* 1997; 11(5):557-67.
41. Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Gough DA, Rinaldi MG. Comparison of Etest and National committee for clinical laboratory standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:535-40.
42. Colombo AL e Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36:599-607.
43. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, Matta DA et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8):2816-2823.
44. Conover WJ. 1971. *Practical Nonparametrics*. New York: John Wiley & Sons.
45. Cormican MG, Hollis RJ, Pfaller MA. DNA macrorestriction profiles and antifungal susceptibility of *Candida* (Torulopsis) **glabrata**. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 25:83-7.
46. Costa CR; Cohen AJ; Fernandez OFL; Miranda KC, Passos XS; Souza LKH et al. Asymptomatic oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 2006; 48(5):257-61.
47. Crocco EI, Mímica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB, et al. Identification of *Candida* species and antifungal susceptibility in vitro: a study on 100 patients with superficial candidiasis. *An Bras Dermatol* 2004; 79(6):689-97.
48. Defontain A, Coarer M, And JP. Bouchara. Contribution of various techniques of molecular analysis to strain identification of *Candida glabrata*. *Microb Ecol H Dis* 1996; 9:27-33.

49. Diekema DJ, Messer AS, Hollis RJ, Wenzel RP, Pfaller MA. An outbreak of *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 29:147-53.
50. Di Francesco LF, Barchiese F, Caselli F, Cirini O, Scalise G. Comparison of four methods for DNA typing of clinical isolates of *Candida glabrata*. *J Med Microbiol* 1999; 48(10):955-63.
51. Dignani MC, Solomkin JS, Anaisse E. *Candida*. In : Anaisse E, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. *Medical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003. p. 195-239.
52. Diz Dios P, Ocampo A, Miralles C, Limeres J, Tomás I. Changing prevalence of human immunodeficiency virus-associated oral lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2000; 90(4):403-4.
53. Diz Dios P, Ocampo A, Miralles C, Otero I, Iglesias I, Rayo N. Frequency of oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients on protease inhibitor therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 87:437-41.
54. Dunic L, Vesic S, Jevtovic DJ. Oral candidiasis and seborrheic dermatitis in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *HIV Medicine* 2004;5: 50-4.
55. Espinel-Ingroff A, Quart A, Steele-More L, Metcheva I, Buck GA, Bruzzese VL, et al. Molecular karyotyping of multiple yeast species isolated from nine patients with AIDS during prolonged fluconazole therapy. *J Med Vet Mycol* 1996; 34:111-6.
56. Eyeson JD, Tenant-Flowers M, Cooper DJ, Johnson NW, Warnakulasuriya KAS. Oral manifestations of an HIV positive cohort in the era of highly active anti-retroviral therapy (HAART) in South London. *Journal Oral Pathology Medicine* 2002; 31:169-74.
57. Fidel Jr PL. Immunity to *Candida*. *Oral Diseases* 2002; 8:69-75.
58. Fichtenbaum CJ, Koletar S, Yiannoutsos C, Holland F, Potaje J, Cohn SE et al. Refractory mucosal candidiasis in advanced human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 2000; 30(5):749-56.

59. Fleiss JL. 1981. Statistical Methods for Rates and Proportions. New York: John Wiley & Sons, 2nd ed.
60. Fonseca JS e Martins GA. 1994. Curso de Estatística. Editora Atlas S.A., 5^a ed.
61. Fricker-Hidalgo H, Vandapel O, Duchesne MA, Mazoyer MA, Monget D, Lardy B, et al. Comparison of the New API *Candida* System to the ID 32 C System for Identification of Clinically Important Yeast Species. J Clin Microbiol 1996; 34(7): 1846-48.
62. Fukushima C, Matsue H, Saeki S, Kawano T, Machida I, Kondo Y et al. Salivary IgA and oral candidiasis in asthmatic patients treated with inhaled corticosteroid. J. Ashma 2005; 42:601-04.
63. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin Microbiol Rev 1999; 12:501-17.
64. Goldani LZ e Mario PS. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. J infect 2003;46:150-60.
65. Gottfredson M, Cox GM, Indridason OS, de Almeida GMD, Heald AE, Perfect JR. Association of plasma levels of human immunodeficiency virus type I RNA and oropharyngeal *Candida* colonization. J Infect Dis 1999; 180(2): 534-7.
66. Gottfredsson M, Cox GM, Perfect JR. Molecular methods for epidemiological and diagnostic studies of fungal infections. Pathology 1998; 30:405-18.
67. Greenspan D, Gange SJ, Phelan JA, Navazesh M, Alves MEAF, MacPhail LA, Mulligan R, Greenspan JS. Incidence of oral lesions in HIV-1-infected women: Reduction a with HAART. Journal Dental Research 2004; 83:145-50.
68. Greenspan D e Greespan JS. Managment of the oral lesions of HIV infection. J Am Dent Assoc 1991; 122:26.

69. Greenspan D, Komaroff E, Redford M, Phelan JA, Navazesh M, Alves MEAF et al. Oral mucosa lesions and HIV viral load in the women's interagency HIV study (WIHS). *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 25(1):44-50.
70. Gruber A, Lukasser-Vogl E, Borg-von Zepelin M, Dierich MP, Würzner R. Human immunodeficiency virus type 1 gp160 and gp41 binding to *Candida albicans* selectively enhances candidal virulence in vitro. *J Infect Dis* 1998; 177(4): 1057-63.
71. Gruber A, Speth C, Lukasser-Vogl E, Zangerler R, Borg-von Zepelin M, Dierich MP, et al. Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor attenuates *Candida albicans* virulence properties in vitro. *Immunopharmacology*. 1999; 41:227-34.
72. Guimarães MDC. Temporal trends in AIDS-associated opportunistic infections in Brazil 1980-1999. *Saúde Pública, Rio de Janeiro* 2000; 16(Sup.1):21-36.
73. Gupta E, Vajpayee M, Xess I, Seth P. Oral candidiasis in HIV-infected patients and its relation to CD4⁺ counts: an adjunct clinical marker of HIV disease progression. *Tropical Doctor* 2006; 36:127.
74. Hanseclever HF, Mitchell WO. Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1961; 82:570-3.
75. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:462-78.
76. Hoog RS, Heath KV, Yip B, Craib KJ, O'Shaughnessy M, Schechter MT, et al. Improved survival among HIV-infected individuals following initiation of antiretroviral therapy. *JAMA* 1998; 279(6):450-4.
77. Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath LL, Murray CK. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; 5:1-5.
78. Hunter KD, Gibson J, Lockhart PB, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod* 1998;85(5):558-64.

79. Jevtovic DJ, Salemovic D; Ranin J; Zerjav S; Djurkovic-Djakovic O. HIV Medicine 2005. 6:140-143.
80. King D, Rhine-Chalberg J, Pfaller MA, Moser SA, Merz WG. Comparison of four DNA based methods for strain delineation of *Candida lusitaniae*. J Clin Microbiol 1995; 33:1467-70.
81. Kirkpatrick WR, Revankar SG, McAtee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI et al. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from immunodeficiency virus-patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. J Clin Microbiol 1998; 36(10):3007-12.
82. Klempp-Seld B, Rimek D, Kappe R. Karyotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* from patients with Candida sepsis. Mycoses 2000; 43(15):159-63.
83. Korting HS, Schaller M, Eder G, Hamm G, Böhmer U, Hube B. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-Infected patients. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(8):2038-42.
84. Kromery V e Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. Causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect 2002; 50:243-60.
85. Kumar BV, Padshetty NS, Bay KY, Rao MS. Prevalence of *Candida* in the oral cavity of diabetic Subjects. J. Assoc Phis India 2005; 53:599-602.
86. Kurtzman CP e Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeast based on nucleotide divergente in the 5' end of the large subunit (26S) ribosomal DNA gene. J Clin Microbiol 1997; 35:1216-23.
87. Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Merz WG. Association of electrophoretic karyotype of *Candida stllatoidea* with virulence for mice. Infect Immune 1988; 56:1814-9.
88. Lacaz CS; Porto E; Martins JEC. Micologia Médica: Fungos, Actinomicetos e Algas de interesse médico. 7º ed. Savier. São Paulo, 1984. 479 p.

89. Laskaris G, Hadjivassiliou M, Stratigos J. Oral signs and symptoms in 160 HIV-infected patients. *J Oral Path Med* 1992; 21:120-3.
90. Lasker BA, Carle GF, Kobayashi GS, Medoff G. Comparison of the separation of *Candida albicans* chromosome-sized DNA by pulsed-field gel electrophoresis technique. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:3783-3793.
91. Le Guennec R, Eeynes J, Mallie M, Pujol C, Janbon F, Bastide JM. Fluconazole- and itraconazole-resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients: multilocus enzyme electrophoresis analysis and antifungal susceptibilities. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2732-37.
92. Lischewski A, Ruhnke M, Tennagen I, Schönian G, Morschhauser J, Hacker J. Molecular epidemiology of *Candida* isolates from AIDS patients showing different fluconazole resistance profiles. *J Gen Microbiol* 1995; 33:769-71.
93. Lockhart S, Fritch JJ, Meier AS, Schroepel K, Srikantha T, Galask R, et al. Colonizing population of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1501-9.
94. Lopez Giro L, Ramos L, Ramadan S, Bulacio L. Comparison of different methods for species identification of genus *Candida*. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37:16-21.
95. Lott TJ, Boiron P, Reiss E. An electrophoretic karyotype for *Candida albicans* reveals large chromosomes in multiples. *Mol Gen Genet* 1987; 209:170-4.
96. Lupetti A, Guzzi G, Paladini A, Swart K, Campa M, Senesi S. Molecular typing of *Candida albicans* in oral candidiasis: karyotype epidemiology with human immunodeficiency virus-seropositive patients in comparison with that with healthy carriers. *J Gen Microbiol* 1995; 33:1238-42.
97. Magee BB e Magee PT. Electrophoretic karyotypes and chromosome numbers in *Candida* species. *J Gen Microbiol* 1987; 133:425-30.
98. Magee PT, Bowdin L, Staudinger J. Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2674-9.

99. Margiotta V, Campisi G, Mancuso S, Accurso V, HIV infection: oral lesions, CD4⁺ cell count and viral load in an Italian study population. *J Oral Pathol Med* 1999; 28(4): 173-7.
100. Mariano PLS, Milan EP, Matta DA, Colombo AL. *Candida dubliniensis*: Identification in Brazilian Yeast Stock Collection. *Mem Instit Oswaldo Cruz* 2003; 98: 533-38.
101. Martinez M, Lopes-Ribott JL, Kirkpatrick W, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J. Clin Microbiol* 2002; 40:3135-39.
102. Martins MD, Lozano-Chiu M, Rex JH. Point prevalence of oropharyngeal carriage of fluconazole-resistant *Candida* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 1997; 25(4):843-6.
103. McMullan-Vogel CG, Jude HD, Ollert MW, Vogel CW. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14(3):183-9.
104. Meiller TF, Jabra-Rizk MA, Baqui AAMA, Kelly JI, Meeks VI, Merz WG et al. Oral *Candida dubliniensis* as a clinically important species in HIV-positive patients in the United States. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 14(3):183-9.
105. Melo NR; Taguchi H; Jorge J; Pedro RJ; Almeida OP; Fukushima K et al. Oral *Candida* flora from brazilian human Immuno deficienciency virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy rra. *Mem Inst Oswaldo Cruz RJ* 2004; 99(4):425-431.
106. Merz WG. *Candida lusitanae*: frequency of recovery, colonization, infection and amphotericin B resistance. *J Clin Microbiol* 1984; 20:1194-05.
107. Merz WG, Gonnely C, Hieter P. Variation of electrophoretic karyotypes among clinical isolates of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1988; 26:842-5.

108. Milan EP. Avaliação fenotípica e genotípica de leveduras isoladas da cavidade oral de pacientes com aids. [Tese – Doutorado] São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo, 2001.
109. Milan EP, Brurattini MN, Callas EG, Fischman O, Costa PRO, Colombo AL. Azole resistanse among oral *Candida* species isolates from aids patients under ketoconazole exposure. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 32(3):211-6.
110. Milan EP, Sant’Ana PL, Melo ASA, Sullivan DJ, Coleman DC, Lewi D et al. Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *Diag Microbiol Infect Dis* 2001; 41:29-35.
111. Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T, et al. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immuodeficiency vírus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1115-8.
112. Miyakawa Y, Kuriboyashi T, Kagaya K, Suzuki M, Nazase T, Fukasawa Y. Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* 1992; 60(6):2493-9.
113. Moore R e Chaisson RE. Natural history of HIV infection in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13(14):1933-42.
114. Moretti-Branchini ML. Principais infecções fúngicas no paciente com infecção pelo HIV. *Paciente em foco* 2002.
115. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A. Wayne, PA, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995.
116. Nguyen MH, Peacock JEt Jr, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, et al. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J mEd* 1996; 100:617-23.

117. Nho S, Anderson MJ, Moore CB, Denning DW. Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and HhaI digestion of fluconazole-resistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains. J Clin Microbiol 1997; 35:1036-39.
118. Nucci M, Anaisse EJ. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? Clin Infect Dis 2001; 33:1959-67.
119. Odds FC. *Candida and Candidosies*. 2nd ed. London: Bailliere Tindall; 1988.
120. Odds FC e Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol 1994; 32(8):1923-29.
121. Odds FC, Nuffel LV, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. J Clin Microbiol 1998; 36(10):2869-73.
122. Olive DM e Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 1999; 37:1661-9.
123. Oliver M, González MI, Mendoza M, Albornoz MCB. Serotipos de *Candida albicans* aislados en pacientes HIV positivos. Rev Iberoam Micol 1999; 14(4):204-7.
124. Panganathan K, Reddy BVR, Kumarasamy N. Oral lesions and conditions associated with human immunodeficiency virus infection in 300 south Indian patients. Oral Dis 2000; 6:152-7.
125. Patton LL, McKaig RG, Eron JJ, Lawrence HP, Strauss RP. Oral hairy leukoplakia and oral candidiasis as predictors of HIV viral load. AIDS 1999; 13(5):2174-6.
126. Patton LL, McKaig RG, Strauss R, Rogers D, Eron JJ. Changing prevalence of oral manifestations of human immunodeficiency virus in the era of protease inhibitor therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2000; 89(3):299-304.
127. Pertselidis A e Fondon JW. Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLAST phemy). Genome Biology 2002; 2:1-10.

128. Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* 1996; 22(suppl 2):S89-S94.
129. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41:5729-31.
130. Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Redding SW, Smith J, Farinacci G, Fothergill AW, et al. Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiases. *J Clin Microbiol* 1994; 32:59-64.
131. Pires MFC, Birman EG, Costa CR, Gambale W, Paula CR. *Candida albicans* byotypes isolated from the oral cavity of HIV-positive patients. *Rev Microbiol* 1996; 27(1):46-51.
132. Pontieri E, Gregori L, Gennarelli M, Ceddia T, Novelli G, Dallapiccola B, et al. Correlation of SfiI macrorestriction endonuclease fingerprinting analysis of *Candida parapsilosis* isolates with source of isolation. *J Med Microbiol* 1996; 45:173-8.
133. Powderly WG, Gallant JE, Ghannoum MA, Mayer KH, Navarro EE, Perfect JR. Oropharyngeal candidiasis in patients with HIV: suggest guidelines for therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15(18):1619-23.
134. Powderly WG, Robinson K, Keath EJ. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus – positive patients: evidence for two patterns of recurrence. *J Infect Dis* 1993; 168:463.
135. Ramsey H, Morrow B, Soll DR. An increase in switching frequency correlates with an increase in recombination of the ribosomal chromosomes of *Candida albicans* strain 3153A. *Microbiology* 1994; 140:1525-31.
136. Redding S, Smith J, Farinacci G, Rinaldi M, Fothergill A, Rhin-Chalberg Pfaller M. Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in patient with AIDS: documentation by in vitro susceptibility testing and DNA subtype analysis. *Clin Infect Dis* 1994; 18:249-42.

137. Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeauvais P, et al. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol* 1998; 36:249-57.
138. Rex JH, Chester R, Cooper CR Jr, Merz WG, Galgiani NJ, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob Agents Chemother* 1995a; 39(4):906-9.
139. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bortlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole and *Candida* infections. *Clin Infect Dis* 1997; 24(2):235-47.
140. Rex JH, Rinald MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995b; 39:1-8.
141. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, et al. Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. *J Infect Dis* 2000; 30:622-78.
142. Ribeiro AR Miranda AE, Gambale W, Paula CR. Prevalence and axoenzyme secretion by *Candida albicans* isolates from oral and vaginal mucosae of HIV-infected women. *Mycopathologia* 2004; 157:255-61.
143. Rosa EAR, Pereira CV, Rosa RT, Höfling JF. Evaluation of different dehydrogenases to recognize *Candida* species commonly isolated from human oral cavities. *Rev Argent Microbiol* 1999; 31:165-72.
144. Rustchenko-Bulgac EP. Variations of *Candida albicans* electrophoresis karyotypes. *J Bacteriol* 1991; 173:6586-96.
145. Rustchenko-Bulgac EP, Sherman F, Hicks JB. Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1990; 172:1276-83.
146. Salobrenã AC, Cepeda LAG, Cañada FO, Barrionuevo DO, Garcia LC, Quindós G. Resistencia in vitro a los antifúngicos em *Candida albicans* de pacientes infectados por el HIV con y sin candidosis oral. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16(4):194-7.

147. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-Lopes NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M 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* 2005; 22:83-92.
148. Sanglard D e Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:73-85.
149. Sano A, Vilela MMS, Takahashi I, Fukushima K, Takizawa K, Silva MTN et al. Isolation of *Candida dubliniensis* from the oral cavity of an HIV-positive child from Brazil. *Jap J Med Mycol* 2000; 3:57-59.
150. Sant'Ana PL, Milan EP, Martinez R, Telles FQ, Ferreira MS, Alcantara AP et al. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(2):253-7.
151. Schechter M, Rachid M. Manual de HIV/AIDS. Revinter, Rio de Janeiro, 2004.
152. Schoofs AG, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Goossens H. Cross-sectional study of oral candidosis in HIV-infected individuals. *Mycoses* 1998; 41:203-11.
153. Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Goossens H. Use of specialized isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16(4):296-300.
154. Schwartz DC e Cantor CR. Separation of yeast chromosomal sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37:67-75.
155. Schuman P, Sobel JD, Ohmit SE, Mayer KH, Carpenter CJ, Rompalo A et al. Mucosal candidal colonization and candidiasis in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1998; 27:1161-7.
156. Snell RG e Wilkins RJ. Separation of chromosomal DNA molecules from *C. albicans* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1986; 14:4401-6.
157. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:322-70.

158. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characterization and identification. J Clin Microbiol 1998; 36:329-34.
159. Sullivan D, Haynes K, Bille J, Boerlin P, Rodero L, Lloyd S et al. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. J Clin Microbiol 1997; 35:960-64.
160. Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S. *Candida dubliniensis*: an update. R Iberoam Micol 1999; 16:72-6.
161. Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S, Gee S, Pinjon E, McCartan B, Shanley DB et al. *Candida dubliniensis*: an update. Rev Iberoam Micol 1999; 16(2): 72-6
162. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. Nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology 1995; 141 (Pt7):1507-21.
163. Suzuki T, Kobayashi I, Mizuguchi I, Banno I, Tanaka K. Electrophoretic karyotypes in medically important *Candida* species. J Gen Appl Microbiol 1988; 34:409-16.
164. Tacconelli E; Bertagnolio S; Posterano B, Tumbarello M; Boccia S; Fadda G et al. Azole susceptibility patterns and genetic relationship among oral *Candida* strains isolated in the era of highly active antiretroviral therapy. JAIDS 2002; 31:38-44.
165. Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang G, Hamada T, Ueta E et al. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. J Oral Pathol Med 2003; 32:586-94.
166. Telles FQ, Silva N, Carvalho MM, Alcântara AP, Matta D, Barberino MG, Bartezak S, Colombo AL. Evaluation of efficacy and safety of itraconazole oral solution for the treatment of oropharyngeal candidiasis in AIDS patients. The Brazilian Journal of Infectious Disease 2002; 5:60-66.
167. The SAS System for Windows (Statistical Analysis System). Versão 8.02. SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA.

168. Thrash-Bingham C, Gor man JA. DNA translocations contribute to chromosome length polymorphisms in *Candida albicans*. *Curr Genet* 1992; 22:93-100.
169. Torssander J, Crhyssanthou E, Penetri B. Increased prevalence oral *Candida albicans* serotype B in homosexual men: a comparative and longitudinal study in HIV-infected and HIV-negative patients. *Mycoses* 1996; 39(9-10):353-6.
170. Tumbarello M, Tacconelli E, Caldarola G, Morace G, Cauda R, Ortona L. Fluconazole resistance oral candidiasis in HIV-infected patients. *Oral Dis* 1997; 3 Suppl1: S110-2.
171. Tappuni AR & Fleming GJP. The effect of antiretroviral therapy on the prevalence of a oral manifestation in HIV-infected patients: a UK study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92:623-28.
172. Vargas KG e Joly S. Carrige frequency, intensity of carrige, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. *J Clin Microbiol* 2002; 40(2):341-50.
173. Vasquez JA, Beckley A, Sobel JD, Zervos MJ. Comparison of restriction enzyme analysis versus pulsed-field gradient gel electrophoresis as a typing system for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1991; 29:926-7.
174. Velegraki A. In vitro susceptibility to itrconazole and fluconazole of switch phenotypes of *Candida albicans* serotype A and B, isolated from immunocompromised hosts. *J Med Vet Mycol* 1995; 33(1):83-5.
175. Vidoto V, Koga-Ito CY, Milano R, Fianchino B, Potón J. Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16(4):208-10.
176. Voss A, Kluytmans JA, Koeleman JG, Spanjarard L, Vandenbroucke-Grauls CM, Verbrug HA, et al. Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in five Dutch university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 909-12.

177. Williams DW, Wilson MJ, Potts AJ, Lewis MA. Phenotypic characterization of *Candida albicans* isolated from chronic hyperplastic candidosis. J Med Microbiol 2000; 49(2): 199-202.
178. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. Clin Infect Dis 1995; 20:115-25.
179. Wingeter MA; Guilhermetti E; Shinobu CS; Takaki I; Svidzinski TIE. Microbiol identification and in vitro sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV-positive individuals. Ver. Soc. Bras. Med. Trop. 2007; 40(3):272-76.
180. Yang YL; Lo HJ; Hung cc; Li Y. Effect of prolonged HARRT on oral colonization with *Candida* and candidiasis. BCM Infectious Diseases 2006; 6:8.
181. Zegarelli DJ. Fungal infections of the oral cavity. Otolaryngol Clin North Am 1993; 26(6): 1069-89.

8- APÊNDICES

APÊNDICE 1

Termo de Consentimento Informado



TÍTULO: Terapia anti-retroviral e colonização oral por *Candida* spp. em pacientes com aids.

PESQUISADORES: Ana Cecília Nastrini Delgado e Maria Luiza Moretti

LOCAL: Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp

- 1. INTRODUÇÃO:** Você está sendo solicitado a participar de uma pesquisa realizada para estudar vários aspectos relacionados ao fungo causador da candidíase oral. Neste documento, denominado “Termo de Informação e Consentimento para Pesquisa Clínica”, constarão as informações relativas ao estudo em questão. Por favor, leia-o cuidadosamente, e não hesite em perguntar qualquer coisa sobre as informações abaixo.
- 2. JUSTIFICATIVA:** Os doentes com diagnóstico de aids, na grande maioria, apresentam candidíase oral (sapinho).
- 3. OBJETIVOS:** Este estudo pretende caracterizar o agente causador dessa doença, analisar aspectos clínicos relacionados aos pacientes e avaliar a sensibilidade a antifúngicos, a fim de facilitar a prevenção e tratamento desta freqüente infecção.
- 4. PROCEDIMENTOS DA PESQUISA:** Se você aceitar participar deste projeto, será solicitado a assinar o formulário de consentimento. Um profissional da área de saúde fará uma entrevista e a seguir colherá de sua cavidade oral (boca), material para exame, antes e após o tratamento do “sapinho”, caso você esteja com candidíase oral no momento. O mesmo exame será realizado após 6, 12, 18 e 24 meses e a qualquer momento, caso você apresente sinais de candidíase oral. A colheita será feita com *swab* (espécie de cotonete).
- 5. DESCONFORTO, RISCOS E BENEFÍCIOS:** O método de colheita da cavidade oral, descrito acima, e o exame clínico aos quais os participantes da pesquisa serão submetidos são atraumáticos, não invasivos e isentos de dor ou danos ao participante. Por outro lado oferecem elevada possibilidade de gerar conhecimento para a compreensão, diagnóstico, prevenção ou alívio desta infecção fúngica, que afeta o bem estar e a sobrevivência dos participantes desta pesquisa e de outros indivíduos.

- 6. CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS:** Você tem direito a privacidade. Toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá confidencial nos âmbitos possíveis da lei, assegurando proteção de sua imagem, sigilo e respeito de valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos. A menos que a revelação seja exigida por ação legal ou regulatória, todos os esforços foram feitos para protegê-lo de ser identificado pessoalmente. Como condição de sua participação nesta pesquisa, você permite acesso aos dados obtidos durante o estudo, aos pesquisadores envolvidos nesta pesquisa, aos membros do Comitê de Ética responsáveis pela análise do projeto e a agência financiadora. Os resultados deste estudo poderão ser apresentados em congressos ou em publicações, porém sua identidade não será divulgada nessas apresentações.
- 7. DIREITO em PARTICIPAR, RECUSAR ou SAIR:** Sua participação depende da sua total e livre decisão ou dos seus responsáveis. Você poderá decidir a não participar deste projeto sem que isto acarrete qualquer perda ou prejuízo dos seus direitos ou atendimento como paciente. Uma vez esclarecido e caso você concorde em participar, será solicitado a assinar este formulário de consentimento. Será fornecida a você uma cópia, que deverá ser guardada. Pacientes com menos de 18 anos ou impossibilitados de assinar este formulário de consentimento, devem ser representados por um responsável ou tutor legal, que poderá assinar em seu nome.
- 8. CONTATOS:** Se ainda houver qualquer dúvida sobre o estudo você poderá receber mais esclarecimentos falando com a Prof. Maria Luiza Moretti, (019) 3788-7013, mluiza.moretti@terra.com.br ou também discutir seus direitos como paciente de pesquisa clínica com o Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp, (019) 3788-8936.

CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Declaro que fui informado do objetivo do projeto e dos procedimentos, riscos e benefícios da minha participação. Eu, de livre e espontânea vontade, concordo em participar e estou ciente de que poderei suspender minha participação a qualquer momento, sem que isto afete meus direitos de receber atendimento médico conforme necessário.

_____	____/____/____
Assinatura do paciente ou responsável	Data
_____	____/____/____
Assinatura do médico assistente	Data
_____	____/____/____
Assinatura da testemunha	Data

APÊNDICE 2

Ficha Clínica



DATA: ____ \ ____ \ ____

- Ambulatório Geral de Doenças Infecciosas – HC/FCM Unicamp
- Ambulatório do Grupo de Pesquisa Clínica – HC/FCM Unicamp

Terapia anti-retroviral e colonização oral por *Candida* spp. em pacientes com aids.

1. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome: _____

HC: _____ Idade: _____

Procedência: _____ Telefone: () _____

Sexo: Masculino Feminino Raça: Branco Negro Pardo

2. CRONOLOGIA DO HIV

Diagnóstico da infecção (HIV): ____ \ ____ \ ____

3. ATIVIDADE DE RISCO PARA AQUISIÇÃO DE HIV

Sexual Usuário de drogas injetáveis Receptor de sangue Vertical

4. DADOS CLÍNICOS

- Infecção oportunistas causadas por vírus, bactérias, protozoários e neoplasias prévia e/ou atual:

Diagnóstico 1 _____

Diagnóstico 2 _____

Diagnóstico 3 _____

Diagnóstico 4 _____

Diagnóstico 5 _____

- Infecção oportunistas causadas por fungos prévia e/ou atual:

Diagnóstico 1 _____

Diagnóstico 2 _____

Diagnóstico 3 _____

Diagnóstico 4 _____

Diagnóstico 5 _____

• Candidíase oral atual: Ausente Presente

• Classificação da categoria clínica da infecção pelo HIV: _____

5. TERAPIA ANTIFÚNGICA

Uso atual: Não Sim Qual(s): _____

Uso prévio: Fluconazol Itraconazol Cetoconazol

Miconazol Anfotericina B Nistatina

6. TERAPIA ANTI-RETROVIRAL

Uso regular de TARV: Não Sim

EsqueMa TARV: _____

7. QUADRO LABORATORIAL ATUAL

CD4⁺ _____ Data: ____ \ ____ \ ____

Carga viral _____ Data: ____ \ ____ \ ____

8. OBSERVAÇÕES

APÊNDICE 3

Soluções e Padrão de Peso molecular utilizados na tipagem molecular de *Candida* spp.

- **Caldo YEPD**

Extrato de levedura (Difco)	5 g
Dextrose (Synth).....	10 g
Bactopeptona (Oxoid).....	10 g
Água destilada q.s.p	500 mL

Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada e autoclavados a 121°C, durante 5 minutos.

- **EDTA 50mM pH 8,0**

EDTA (Synth).....	18,61g
Água destilada q.s.p	1000 mL

O EDTA foi dissolvido em 700mL de água destilada no agitador magnético. Pastilhas de NaOH foram acrescentadas até dissolução total do EDTA. O pH foi ajustado para 8,0. O volume foi completado para 1000mL. A solução foi autoclavada a 121°C, durante 15 minutos e estocada em TA.

- **EDTA 0,5M pH 8,0**

EDTA (Synth).....	186,1g
Água destilada q.s.p	1000 mL

O EDTA foi dissolvido em 700 mL de água destilada no agitador magnético. Pastilhas de NaOH foram acrescentadas até dissolução total do EDTA. O pH foi ajustado para 8,0. O volume foi completado para 1000 mL. A solução foi autoclavada a 121°C, durante 15 minutos e estocada em TA.

- **Solução de N-Lauroylsarcosine a 10%**

N-Lauroylsarcosine (Sigma)	10 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

O N-lauroylsarcosine foi dissolvido em água destilada, esterilizado por filtração e estocado em TA.

- **Tris 1M pH 7,5**

Trizma base (Synth)	60,6 g
Água destilada q.s.p.	500 mL

O trizma base foi adicionado a 300mL de água destilada e o pH foi ajustado para 7,5. O volume foi completado para 500mL e a solução foi autoclavada a 121°C, durante 15 minutos.

- **Solução tampão para proteinase K (NET)**

Trizma base 1M pH 7,5	1 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	90 mL
N-Lauroylsarcosine 10%	10 mL

Todos os componentes da fórmula, previamente esterilizados, foram homogeneizados e estocados em TA.

- **Gel de agarose de baixo ponto de fusão dos blocos**

Agarose low melt (Bio Rad)	0,1 g
EDTA 0,5M pH 7,5	2,5 mL
Água destilada	7,5 mL

A agarose foi diluída em água destilada e EDTA 0,5M pH 7,5, até tornar-se completamente límpida. A temperatura foi estabilizada a 58°C, em banho-maria, até o preparo dos blocos.

- **Gel de agarose para PFGE (0,8%)**

Agarose ultra-pure (Gibco).....	1,2 g
TBE 5X	15 mL
Água destilada	135 mL

A agarose foi dissolvida em água destilada e TBE 5X até tornar-se completamente límpida. A temperatura foi estabilizada a 58°C, em banho-maria, até o preparo do gel.

- **Solução TBE 5X**

Trizma base	54 g
Ácido bórico (Synth).....	27,5 g
EDTA 0,5M pH 8,0	10 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O trizma base e o ácido bórico foram dissolvidos em água destilada no agitador magnético e o EDTA foi adicionado. A solução foi autoclavada a 121°C, durante 15 minutos e estocada em TA.

- **Solução TBE 0,5X**

TBE 5X	100 mL
Água destilada	900 mL

As substâncias foram homogeneizadas e estocadas em TA.

- **Solução de brometo de etídio para corar o gel de PFGE (6µL/100mL)**

Brometo de etídio (10mg/mL)	15 µL
Água destilada	250 mL

As substâncias foram homogeneizadas e dispensadas em cuba para corar o gel de eletroforese.

- **Solução estoque – Proteinase K**

Proteinase K (Sigma)	100 mg
Água destilada	5 mL

A proteinase K foi diluída em água destilada (20mg/mL) e estocada em alíquotas de 0,5mL, mantidas a -20°C.

- **Solução de Lyticase**

Lyticase (Sigma) 10.000UI	1 frasco
Solução tampão para lyticase	8 mL

A lyticase foi diluída em 8mL de tampão (100u/80µL) e estocada em alíquotas de 1,0mL, mantidas a -20°C.

- **Solução tampão para Lyticase**

Glicerol	15 mL
NaH ₂ O ₄ 0,1M pH 7,0	1,5 mL
NaH ₂ O ₄ 0,1M pH 7,0.	10 mL
Água destilada	12 mL

As substâncias, previamente autoclavadas, foram homogeneizadas e estocadas em TA.

APÊNDICE 4

Cepas de *C. albicans* sorotipo A isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV

nº	Paciente	Cepa	CHROMagar®	TG	Xilose	42°C	Perfil genômico
1	01	01	verde-claro	+	+	+	A ¹
2	03	03	verde-claro	+	+	+	A ¹
3	06	06	verde-escuro	+	+	+/-	A ⁵
4	07	07	verde-claro	+	+	+	A ¹
5	09	09 A	verde-claro	+	+	+	A ⁶
6	10	10	verde-claro	+	+	+	A ³
7	11	11	verde-claro	+	+	+	A ²
8	12	12	verde-azulado	+	+	+	A ¹
9	13	13	verde-claro	+	+	+	A ²
10	14	14	verde-claro	+	-	+/-	A ³
11	15	15	verde-claro	+	+	+	A ⁴
12	16	16	verde-claro	+	+	+	A ¹
13	17	17	verde-claro	+	+	+	A ³
14	18	18	verde-claro	+	+	+/-	A ¹
15	19	19 A	verde-claro	+	+	+/-	A ⁴
16	20	20	verde-claro	+	+	+	A ¹
17	21	21	verde-azulado	+	+	+	A ¹
18	23	23	verde-claro	+	+	+	A ¹
19	25	25	verde-azulado	+	+	+	A ¹
20	26	26	verde-claro	+	+	+	A ³
21	27	27	verde-escuro	+	+	+/-	A ¹
22	29	29	verde-claro	+	+	+/-	A ¹
23	31	31	verde-azulado	+	+	+/-	A ¹
24	32	32	verde-azulado	+	+	+/-	A ¹
25	33	33	verde-claro	+	+	+	A ¹
26	34	34	verde-claro	+	+	+	A ¹
27	36	36	verde-claro	+	+	+	A ¹
28	37	37	verde-claro	+	+	+/-	A ¹
29	38	38	verde-claro	+	+	+	A ¹⁰
30	39	39	verde-claro	+	+	+	A ¹
31	40	40	verde-azulado	+	+	+	A ¹

n°	Paciente	Cepa	CHROMagar®	TG	Xilose	42°C	Perfil genômico
32	41	41	verde-claro	+	+	+	A ¹
33	42	42	verde-claro	+	+	+	A ¹
34	43	43	verde-claro	+	+	+	A ⁶
35	44	44	verde-claro	+	+	+	A ¹
36	45	45	verde-claro	+	+	+/-	A ¹
37	46	46	verde-claro	+	-	+/-	A ³
38	47	47	verde-claro	+	+	+	A ¹
39	48	48	verde-azulado	+	+	+	A ¹
40	49	49	verde-azulado	+	+	+	A ¹
41	51	51	verde-azulado	+	+	+	A ¹
42	52	52	verde-claro	+	+	+	A ¹
43	53	53	verde-escuro	+	+	+	A ¹
44	55	55	verde-escuro	+	+	+/-	A ¹
45	56	56	verde-claro	+	-	-	A ¹
46	57	57	verde-claro	+	+	+	A ¹
47	58	58	verde-claro	+	+	+	A ³
48	59	59 A	verde-claro	+	+	+	A ¹
49	60	60	verde-claro	+	-	-	A ¹
50	61	61	verde-claro	+	+	+	A ⁷
51	62	62	verde-escuro	+	+	+	A ¹¹
52	63	63	verde-claro	+	+	+	A ¹
53	64	64	verde-claro	+	+	+	A ¹
54	65	65	verde-claro	+	+	+	A ¹
55	66	66	verde-claro	+	+	+	A ¹
56	67	67	verde-claro	+	+	+	A ¹
57	68	68	verde-claro	+	+	+	A ¹
58	69	69	verde-claro	+	+	+/-	A ¹
59	70	70 A	verde-claro	+	+	-	A ¹²
60	70	70 B	verde-claro	+	+	+	A ¹²
61	71	71	verde-claro	+	+	+	A ³
62	75	75	verde-claro	+	+	+	A ³
63	77	77	verde-claro	+	+	+	A ¹³
64	79	79	verde-claro	+	+	+	A ¹
65	80	80	verde-claro	+	+	+	A ¹
66	81	81	verde-claro	+	+	+	A ⁴
67	82	82	verde-claro	+	+	+	A ⁸

n°	Paciente	Cepa	CHROMagar®	TG	Xilose	42°C	Perfil genômico
68	83	83 A	verde-claro	+	+	-	A ⁶
69	84	84	verde-claro	+	+	+/-	A ³
70	85	85A	verde-claro	+	-	+/-	A ¹
71	85	85B	verde-claro	+	-	-	A ⁵
72	86	86 A	verde-claro	+	+	+	A ⁶
73	89	89 A	verde-claro	+	+	+/-	A ¹²
74	90	90	verde-claro	+	+	+	A ³
75	91	91	verde-claro	+	+	+	A ¹
76	92	92	verde-claro	+	+	+	A ³
77	97	97	verde-claro	+	+	+	A ³
78	100	100	verde-claro	+	+	+	A ³
79	101	101	verde-claro	+	+	+	A ¹
80	103	103 A	verde-claro	+	+	+	A ¹
81	105	105	verde-claro	+	+	+	A ¹
82	106	106	verde-claro	+	+	+	A ¹
83	107	107	verde-claro	+	+	+	A ¹⁴
84	108	108	verde-claro	+	+	+/-	A ³
85	111	111	verde-claro	+	+	+	A ¹
86	112	112	verde-claro	+	+	+	A ³
87	113	113	verde-claro	+	+	+/-	A ¹
88	114	114	verde-claro	+	+	+	A ¹
89	115	115	verde-claro	+	+	+	A ¹
90	116	116	verde-claro	+	-	-	A ⁹
91	117	117	verde-claro	+	+	-	A ³
92	118	118	verde-claro	+	+	+/-	A ¹
93	119	119	verde-claro	+	+	+	A ⁶
94	120	120	verde-claro	+	+	+	A ⁶
95	122	122	verde-claro	+	+	+	A ⁶
96	123	123	verde-claro	+	+	+	A ¹
97	124	124	verde-claro	+	+	+	A ⁶
98	125	125	verde-claro	+	+	+	A ³
99	126	126	verde-claro	+	+	+	A ¹
100	128	128	verde-claro	+	+	+	A ⁴
101	129	129	verde-claro	+	+	+/-	A ¹
102	130	130	verde-claro	+	+	+	A ⁷
103	133	133	verde-claro	+	+	+	A ¹⁵

n°	Paciente	Cepa	CHROMagar®	TG	Xilose	42°C	Perfil genômico
104	134	134	verde-claro	+	+	+/-	A ¹
105	136	136	verde-claro	+	+	+/-	A ⁴
106	137	137	verde-claro	+	+	-	A ³
107	139	139	verde-claro	+	+	+	A ⁴
108	140	140	verde-claro	+	+	+	A ¹
109	141	141	verde-claro	+	+	+	A ¹
110	142	142	verde-claro	+	+	+	A ⁴
111	143	143	verde-claro	+	+	+	A ³
112	144	144	verde-claro	+	+	-	A ¹
113	145	145 B	verde-claro	+	-	-	A ¹
113	146	146	verde-claro	+	+	+	A ¹
115	147	147	verde-claro	+	+	+/-	A ¹

n°: número de cepas

Cepas: número das cepas

TG: prova do tubo germinativo

Xilose: prova de assimilação de xilose

42°C: crescimento a 42°C em ASD = (+): positivo, (-): negativo e (+/-): leve crescimento.

APÊNDICE 5

Cepas de *C. albicans* sorotipo B isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV

nº	Paciente	Cepa	CHROMagar®	TG	Xilose	42°C	Perfil genômico
1	04	04	verde-claro	+	+	+/-	B ¹
2	09	09 B	verde-escuro	+	+	+/-	B ¹
3	24	24	verde-claro	+	+	+/-	B ¹
4	28	28	verde-claro	+	+	+/-	B ¹
5	30	30	verde-claro	+	+	+	B ²
6	72	72	verde-claro	+	+	+	B ¹
7	73	73	verde-claro	+	+	+	B ¹
8	94	94	verde-claro	+	+	+	B ¹
9	98	98	verde-claro	+	+	+	B ³
10	102	102	verde-claro	+	+	+	B ¹
11	104	104	verde-claro	+	+	+	B ¹
12	110	110	verde-claro	+	+	-	B ¹
13	132	132	verde-claro	+	+	+	B ¹
14	135	135	verde-claro	+	+	+/-	B ¹
15	138	138	verde-claro	+	+	+	B ¹

nº: número de cepas

Cepas: número das cepas

TG: prova do tubo germinativo

Xilose: prova de assimilação de xilose

42°C: crescimento a 42°C em ASD = (+): positivo, (-): negativo e (+/-): leve crescimento.

APÊNDICE 6

Cepas de *Candida* não *albicans* isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV

nº	Paciente	Cepa	CHROMagar®	Microrganismo	Perfil genômico
1	74	74	verde-claro	<i>Candida dubliniensis</i>	D ¹
2	127	127 B	verde-claro	<i>Candida dubliniensis</i>	D ²
3	05	05	lilás	<i>Candida glabrata</i>	G ¹
4	08	08	lilás	<i>Candida glabrata</i>	G ²
5	50	50	lilás	<i>Candida glabrata</i>	G ³
6	54	54 A	lilás	<i>Candida glabrata</i>	G ⁴
7	83	83 B	lilás	<i>Candida glabrata</i>	G ⁵
8	86	86 C	lilás	<i>Candida glabrata</i>	G ⁶
9	127	127 A	lilás	<i>Candida glabrata</i>	G ⁷
10	22	22	azul	<i>Candida tropicalis</i>	nd
11	54	54 B	azul	<i>Candida tropicalis</i>	nd
12	86	86 B	azul	<i>Candida tropicalis</i>	nd
13	89	89 B	azul	<i>Candida tropicalis</i>	nd
14	99	99	rosa	<i>Candida krusei</i>	nd
15	103	103 B	rosa	<i>Candida krusei</i>	nd
16	35	35	branco	<i>Candida parapsilosis</i>	nd
17	02	02	rosa	<i>Candida guilhermondi</i>	nd
18	103	103 C	lilás	<i>Candida kefir</i>	nd
19	19	19 B	branco	<i>Candida norvegensis</i>	nd
20	78	78	branco	<i>Candida norvegensis</i>	nd
21	87	87	branco	<i>Candida norvegensis</i>	nd
22	145	145 A	roxo	<i>Candida calliculosa</i>	nd
23	59	59 B	roxo	<i>Candida lipolytica</i>	nd
24	76	76	azul	<i>Candida sake</i>	nd

nº: número de cepas

Cepas: número das cepas

nd : perfil genômico não denominado.

APÊNDICE 7

Concentração inibitória mínima de antifúngicos avaliada em cepas de *C. albicans* sorotipo A isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

n°	Cepa	CIM (µg/mL)					
		F	C	I	5F	A	N
01	01	0,25	0,03	0,06	0,125	1	2
02	03	0,25	0,03	0,06	0,125	0,50	1
03	06	0,50	0,03	0,06	0,125	0,50	1
04	07	0,25	0,03	0,06	< 0,125	0,50	1
05	09 A	0,25	0,03	0,06	< 0,125	0,50	0,50
06	10	0,50	0,03	0,06	0,25	0,50	1
07	11	0,125	0,03	0,06	< 0,125	0,25	1
08	12	0,25	0,03	0,06	< 0,125	0,25	1
09	13	0,25	0,03	0,06	< 0,125	1	2
10	14	0,25	0,03	0,06	0,125	1	2
11	15	0,25	0,03	0,125	< 0,125	1	2
12	16	0,25	0,03	0,125	< 0,125	1	2
13	17	0,25	0,03	0,06	< 0,125	1	2
14	18	0,25	0,03	0,06	< 0,125	1	2
15	19 A	0,25	0,03	0,06	< 0,125	0,5	2
16	20	0,25	0,03	0,06	0,125	0,25	1
17	21	0,50	0,03	0,03	0,125	1	2
18	23	0,25	0,03	0,125	< 0,125	0,50	2
19	25	0,25	0,06	0,06	0,125	1	2
20	26	0,50	0,06	0,06	0,125	1	2
21	27	2	0,06	0,03	0,125	1	2
22	29	0,5	0,03	0,03	< 0,125	1	2
23	31	1	0,06	0,03	< 0,125	0,50	1
24	32	0,25	0,03	0,03	< 0,125	0,25	1
25	33	0,125	0,03	0,03	< 0,125	0,25	1
26	34	0,50	0,03	0,03	< 0,125	0,50	2
27	36	0,50	0,03	0,03	0,125	0,50	1
28	37	0,25	0,03	0,125	< 0,125	0,25	1
29	38	0,25	0,06	0,03	< 0,125	0,25	1
30	39	0,25	0,03	0,03	< 0,125	0,25	1

n°	Cepa	CIM (µg/mL)					
		F	C	I	5F	A	N
31	40	1	0,03	0,03	< 0,125	0,25	1
32	41	0,25	0,03	0,03	< 0,125	0,50	1
33	42	0,50	0,06	0,03	< 0,125	1	1
34	43	0,50	0,03	0,03	< 0,125	0,50	1
35	44	0,50	0,03	0,01	< 0,125	0,25	2
36	45	0,25	0,03	0,06	< 0,125	0,25	1
37	46	0,50	0,03	0,03	< 0,125	0,50	2
38	47	0,50	0,03	0,03	0,125	0,25	1
39	48	0,50	0,03	0,03	< 0,125	0,25	1
40	49	0,50	0,06	0,03	< 0,125	0,50	1
41	51	0,50	0,03	0,03	< 0,125	0,25	2
42	52	0,25	0,03	0,03	< 0,125	1	1
43	53	1	0,03	0,06	1	0,50	2
44	55	1	0,03	0,06	< 0,125	1	1
45	56	0,25	0,03	0,03	0,25	0,50	2
46	57	0,25	0,06	0,06	< 0,125	0,50	1
47	58	0,50	0,03	0,06	0,125	0,25	1
48	59 A	0,50	0,03	0,06	< 0,125	0,25	0,5
49	60	0,50	0,03	0,03	0,25	0,25	1
50	61	0,50	0,03	0,03	< 0,125	0,25	1
51	62	0,25	0,03	0,06	2	1	1
52	63	0,50	0,03	0,06	< 0,125	0,25	1
53	64	0,50	0,03	0,06	0,125	0,25	1
54	65	0,50	0,03	0,06	0,125	0,25	1
55	66	0,50	0,03	0,06	0,125	0,50	1
56	67	0,50	0,03	0,06	0,125	0,25	1
57	68	0,50	0,03	0,06	0,125	0,50	1
58	69	1	0,03	0,06	0,125	0,50	1
59	70 A	0,50	0,03	0,06	0,5	0,50	1
60	70 B	0,50	0,03	0,06	0,5	0,25	1
61	71	0,50	0,03	0,06	0,125	0,50	1
62	75	0,50	0,03	0,06	< 0,125	0,25	1
63	77	0,50	0,03	0,06	< 0,125	0,25	1
64	79	0,25	0,03	0,06	0,125	0,50	1
65	80	0,50	0,03	0,06	1	0,50	1

n°	Cepa	CIM (µg/mL)					
		F	C	I	5F	A	N
66	81	1	0,06	0,06	0,125	0,25	1
67	82	0,50	0,03	0,06	< 0,125	1	2
68	83 A	0,50	0,03	0,03	0,125	0,25	2
69	84	0,25	0,06	0,03	0,125	1	1
70	85A	1	0,03	0,06	< 0,125	0,50	2
71	85B	0,50	0,03	0,06	< 0,125	0,50	2
72	86 B	1	0,03	0,125	0,125	0,50	2
73	89 A	0,25	0,03	0,125	< 0,125	0,50	2
74	90	0,25	0,03	0,06	0,125	0,25	2
75	91	0,50	0,03	0,06	0,125	0,50	2
76	92	0,125	0,03	0,03	< 0,125	0,50	2
77	97	0,25	0,03	0,125	< 0,125	0,25	2
78	100	0,25	0,06	0,06	< 0,125	0,50	2
79	101	0,125	0,03	0,03	< 0,125	0,25	2
80	103 A	0,25	0,03	0,06	< 0,125	0,50	2
81	105	0,50	0,03	0,06	< 0,125	0,50	2
82	106	0,25	0,03	0,125	< 0,125	0,25	2
83	107	0,25	0,03	0,06	< 0,125	0,50	2
84	108	0,50	0,03	0,06	< 0,125	0,50	2
85	111	0,50	0,03	0,125	< 0,125	0,50	2
86	112	0,25	0,03	0,06	< 0,125	0,25	2
87	113	0,50	0,03	0,06	< 0,125	0,25	2
88	114	0,125	0,03	0,03	< 0,125	0,50	2
89	115	0,25	0,03	0,03	0,125	0,25	1
90	116	1	0,03	0,06	< 0,125	0,25	1
91	117	1	0,03	0,06	< 0,125	0,25	1
92	118	1	0,03	0,03	< 0,125	0,25	1
93	119	0,125	0,03	0,03	< 0,125	0,25	1
94	120	0,25	0,03	0,03	0,125	0,50	1
95	122	0,50	0,03	0,06	0,125	0,50	1
96	123	0,50	0,03	0,03	< 0,125	0,25	1
97	124	0,25	0,03	0,03	< 0,125	0,25	1
98	125	0,25	0,03	0,06	< 0,125	0,25	1
99	126	0,25	0,03	0,06	< 0,125	0,25	1
100	128	0,50	0,03	0,03	0,125	0,25	1

n°	Cepa	CIM (µg/mL)					
		F	C	I	5F	A	N
101	129	0,50	0,03	0,03	0,125	0,25	1
102	130	0,25	0,03	0,03	0,125	0,25	1
103	133	0,50	0,03	0,125	0,125	0,50	2
104	134	0,25	0,03	0,03	< 0,125	0,50	2
105	136	1	0,03	0,06	< 0,125	0,50	2
106	137	0,125	0,03	0,03	< 0,125	0,25	2
107	139	0,125	0,03	0,03	< 0,125	0,50	2
108	140	0,50	0,03	0,125	< 0,125	0,50	2
109	141	0,50	0,03	0,06	< 0,125	0,50	2
110	142	0,50	0,03	0,06	0,125	0,25	2
111	143	0,25	0,03	0,06	0,125	0,50	2
112	144	2	0,03	0,06	< 0,125	0,50	2
113	145 B	0,25	0,03	0,06	< 0,125	0,50	2
114	146	0,25	0,03	0,03	< 0,125	0,125	2
115	147	0,50	0,03	0,01	0,125	0,125	1

n°: número de cepas

Cepas: número das cepas

F: Fluconazol

C: Cetoconazol

I: Itraconazol

5F: 5-Fluocitosina

A: Anfotericina B

N: Nistatina

APÊNDICE 8

Concentração inibitória mínima de antifúngicos avaliada em cepas de *C. albicans* sorotipo B isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

n°	Cepa	CIM (µg/mL)					
		F	C	I	5F	A	N
01	04	0,50	0,03	0,06	0,50	0,50	1
02	09 B	0,25	0,03	0,06	0,125	0,25	1
03	24	2	0,50	0,125	1	0,50	2
04	28	1	0,03	0,03	< 0,125	1	1
05	30	0,25	0,03	0,03	0,50	0,25	1
06	72	0,50	0,03	0,06	1	0,50	1
07	73	1	0,03	0,06	0,50	0,50	2
08	94	0,50	0,03	0,06	0,50	0,50	2
09	98	0,50	0,03	0,125	< 0,125	0,50	2
10	102	0,50	0,06	0,06	0,50	0,25	2
11	104	0,25	0,03	0,125	0,50	0,50	2
12	110	0,50	0,03	0,03	0,125	0,50	2
13	132	0,125	0,03	0,125	0,50	0,50	2
14	135	0,50	0,03	0,06	0,50	0,50	2
15	138	0,125	0,03	0,03	0,125	0,50	2

n°: número de cepas

Cepas: número das cepas

F: Fluconazol

C: Cetoconazol

I: Itraconazol

5F: 5-Fluocitosina

A: Anfotericina B

N: Nistatina

APÊNDICE 9

Concentração inibitória mínima de antifúngicos avaliada em cepas de *Candida não albicans* isoladas da cavidade oral de pacientes com infecção pelo HIV, em uso de TARV.

n°	Cepa	CIM (µg/mL)					
		F	C	I	5F	A	N
01	74	0,25	0,03	0,06	< 0,125	0,25	1
02	127 B	0,25	0,03	0,06	< 0,125	0,125	1
03	05	8	0,50	0,50	< 0,125	0,50	1
04	08	8	0,25	0,25	< 0,125	0,25	0,50
05	50	16	0,25	0,50	< 0,125	0,25	0,50
06	54 A	16	0,50	0,50	0,25	0,25	0,50
07	83 B	8	0,125	0,50	< 0,125	1	2
08	86 C	16	0,50	0,50	< 0,125	1	2
09	127 A	8	0,25	0,25	< 0,125	0,50	0,50
10	22	0,50	0,03	0,03	0,125	0,50	2
11	54 B	1	0,03	0,03	0,125	0,50	2
12	86 A	0,25	0,03	0,06	0,125	0,25	2
13	89 B	2	0,125	0,50	< 0,125	1	2
14	99	16	0,25	0,25	1	0,5	2
15	103 B	16	0,125	0,125	2	1	2
16	35	1	0,03	0,06	< 0,125	0,50	2
17	02	4	0,03	0,03	< 0,125	0,125	1
18	103 C	0,50	0,03	0,03	0,125	0,50	0,50
19	19 B	16	0,125	0,125	2	0,50	1
20	78	4	0,03	0,06	0,25	0,50	2
21	87	4	0,06	0,125	2	1	2
22	145 A	-	-	-	-	-	-
23	59 B	-	-	-	-	-	-
24	76	1	0,06	0,06	< 0,125	0,06	0,5

n°: número de cepas

Cepas: número das cepas

F: Fluconazol

C: Cetoconazol

I: Itraconazol

5F: 5-Fluocitosina

A: Anfotericina B

N: Nistatina