ELISÂNGELA NOBORIKAWA FERREIRA

Estudo comparativo de dois meios cromogênicos para identificação de amostras do gênero *Candida*, isoladas da mucosa oral de pacientes portadores de próteses totais completas ou uni maxilares superiores, com ou sem suspeita de candidíase oral

São Paulo

2011

ELISÂNGELA NOBORIKAWA FERREIRA

Estudo comparativo de dois meios cromogênicos para identificação de amostras do gênero *Candida*, isoladas da mucosa oral de pacientes portadores de próteses totais completas ou uni maxilares superiores, com ou sem suspeita de candidíase oral

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ricardo Xavier da Silveira

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Ferreira, Elisângela Noborikawa

Estudo comparativo de dois meios cromogênicos para identificação de amostras do gênero *Candida*, isoladas da mucosa oral de pacientes portadores de próteses totais completas ou uni maxilares superiores, com ou sem suspeita de candidíase oral : [versão original] / Elisângela Noborikawa Ferreira; orientador Fernando Ricardo Xavier da Silveira. -- São Paulo, 2011.

85p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. *Candida*. 2. Candidíase oral. 3. Estomatite sob prótese. 4. Boca – Microbiologia. I. Silveira, Fernando Ricardo Xavier da. II. Título.

Ferreira EN. Estudo comparativo de dois meios cromogênicos para identificação de amostras do gênero *Candida*, isoladas da mucosa oral de pacientes portadores de próteses totais completas ou uni maxilares superiores, com ou sem suspeita de candidíase oral. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / /2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha filha amada Júlia, pelo, carinho, amor e total compreensão nos momentos em que me fiz ausente, e é a razão pela qual sigo, buscando sempre o melhor, para que sinta-se sempre amparada, amada e feliz.

Aos meus pais Tereza e Ezequiel, pela confiança e liberdade que me dispuseram para realizar escolhas em minha vida, as quais me trouxeram possibilidades para chegar até aqui e seguir adiante.

Ao meu namorado Eduardo, pelo incentivo, companheirismo e amor. São coisas fundamentais.

À minha grande amiga Valéria, que sempre esteve comigo, principalmente nas horas difíceis, de escolhas importantes, iluminando o meu caminho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Fernando Ricardo Xavier da Silveira, que me encorajou a enfrentar os desafios da Pós-Graduação, pela oportunidade, incentivo, paciência e principalmente pela amizade, desde os meus tempos de aluna de graduação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Dante Antonio Migliari, Titular da Disciplina de Estomatologia Clínica pelos ensinamentos ao longo dos últimos três anos.

Ao Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Júnior, que, durante a graduação, me despertou para os primeiros passos da atividade científica.

Ao Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya, pela atenção, ensinamentos e solicitude, em diversas etapas de meu desenvolvimento.

Aos profs. Drs. Andréa Lusvarghi Witzel e Fábio de Abreu Alves pela atenção com que me distinguiram durante meu Mestrado.

À Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula, por ter compartilhado comigo sua experiência, abrindo a perspectiva de conhecimento de novos horizontes na pesquisa em Micologia, pelo incentivo e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Flávio Alterthum, pela atenção e cortesia a mim sempre dispensadas.

À Profa. Dra. Mônica Andrade Lotufo, pelos conselhos, ensinamentos, amizade e carinho durante meu período de graduação... Esteve sempre comigo...

Ao Prof. Giuliano Saraceni Issa Cossolin, pelo incentivo, amizade e oportunidade de fazer parte de sua equipe. Aos colegas do Ambulatório de Cirurgia Oral do Serviço de Otorrinolaringologia da UNIFESP.

À Nyna, Maria Aparecida e Cecília, pela paciência, solicitude e atenção.

À grande amiga Luana, por ter estado comigo em todos os momentos...

Aos amigos e colegas da Pós-Graduação, em especial, Ana Paula Molina, Gustavo, Viviana, Rita, Thaís, Carla, Carlos, Gabriela e Inês.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Micologia do ICB II, Carolina, Vanderson, Bruno e Luciana Ruiz. Em especial à Vanessa, Débora, Pedro e Ériques pelo apoio em todos os momentos de minha passagem pelo ICB.

Aos amigos do Biotério do ICB II, Carlos e Luciana.

Aos amigos do setor de apoio técnico do Departamento de Microbiologia do ICB II, José, Elaine e Cláudia, pela paciência e solicitude em todas as horas.

“Olhai bem a vossa mente, nela na certa
encontrareis mil regiões não descobertas.

Percorrei-as, que assim sereis um dia
conhecedor da própria cosmografia.”

Henry David Thoreau (*Walden*, 1854).

RESUMO

Ferreira EN. Estudo comparativo de dois meios cromogênicos para identificação de espécies do gênero *Candida*, isoladas da mucosa oral de pacientes portadores de próteses totais completas ou uni maxilares superiores, com ou sem suspeita de candidíase oral [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Original.

O gênero *Candida* abriga várias espécies de importância médica e embora algumas venham adquirindo interesse crescente, *Candida albicans* continua sendo a mais importante e responsável pelo maior número de infecções. Encontrada na microbiota de seres humanos saudáveis, é responsável pela infecção oral fúngica mais comum, em relação bastante estreita com a estomatite sob prótese (EP). Esta é um processo inflamatório da mucosa oral, comum em portadores de próteses dentárias, parciais ou totais subjacentes a uma prótese, onde também podem estar outros microrganismos, interagindo com diversos fatores, ligados ao hospedeiro e aos próprios microrganismos presentes no biofilme da superfície interna da prótese. A maioria dos casos é assintomática e alguns pacientes relatam dor, prurido ou sensação de ardência. O diagnóstico é clínico, complementado por exames tais como o citológico e o micológico direto. O tratamento é quase sempre empírico, sem a clara certeza se o indivíduo é portador da levedura e se outras espécies, estão envolvidas. Os meios cromogênicos possibilitaram avanço no diagnóstico das candidíases orais. Sua utilização facilita a identificação destas leveduras, com resultados em menor tempo que os dos métodos já padronizados para outras espécies de *Candida*. O CHROMagar Candida (CC) é a referência, fornecendo resultados em 48 horas após semeadura direta do material coletado. O meio denominado *Candida* Chromogenic Agar (CCA), foi recentemente lançado em nosso mercado e tendo em vista o seu baixo custo parece ser mais uma ferramenta para o diagnóstico da candidíase, embora não haja, ainda, literatura disponível sobre o seu emprego. O objetivo do presente trabalho, foi comparar esse novo meio ao CHROMagar *Candida*, quanto à sensibilidade e especificidade no isolamento de espécies do gênero *Candida* da mucosa oral de portadores de próteses totais superiores, com ou sem sintomas de EP. Participaram do estudo, 61 pacientes, de

ambos os gêneros, portadores de próteses totais (45,9%) ou uni maxilares superiores (54,1%). Dentre as 61 amostras coletadas, 45 (73,77%) foram positivas para leveduras em CC, sendo *C. Albicans* (38 amostras, 24 únicas e 14 (36,84%) mistas. Destas, 8 de *C. Albicans* + *C. Tropicalis* (21,05%); 3 de *C. Albicans* + *C. glabrata* (7,89%); 3 de *C. albicans* + *C. tropicalis* + *C. glabrata* (7,89%). Outras espécies presentes foram, 15 *C. tropicalis* (33,33%). Duas únicas (13,33%), duas mistas, *C. tropicalis* + *C. glabrata* (13,33%) e uma *C. tropicalis* + *C. parapsilosis* (6,66%). Em CCA, das 45 amostras, 39 foram positivas (86,6%). *C. albicans*, foi a mais frequente, com 33 isolados (84,6%), sendo, 25 únicas (75,75%) e 8 mistas (24,25%). Assim, *C. albicans* + *C. tropicalis* (5 – 12,82%); *C. albicans* + *C. glabrata* (2 – 5,13%); *C. albicans* + *C. tropicalis* + *C. glabrata* (uma – 2,56%). Outras espécies isoladas foram: *C. tropicalis* (3 – 7,7%), e *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (uma de cada – 2,56%). Foi possível concluir que o CHROMagar Candida foi mais sensível (100% x 65%) e mais específico para *albicans* (84,4% x 73,3%); *tropicalis* (33,3% x 20,0%) e *glabrata* (17,7 % x 8,8%). Ambos apresentaram a mesma especificidade (2,2%), para *krusei* e *parapsilosis*.

Palavras-chave: *Candida*. Estomatite sob prótese. Candidíase Oral.

ABSTRACT

Ferreira EN. Comparative study between two chromogenic media for identification of species of genus *Candida* isolated from oral mucosa of patients wearing complete dentures or superior total prostheses and with signs or not of oral candidiasis [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Original.

The genus *Candida* includes several species of medical importance and although some will acquire increasing interest, *Candida albicans* remains the most important and responsible for more infections. Found in the microbiota of healthy humans, is responsible for the most common oral fungal infection in very close relation with denture stomatitis (EP). This is a frequent inflammation of the oral mucosa in complete or partial dentures wearers, where may also be present other microorganisms, interacting with several factors linked to the host and the microorganisms present themselves, in the inner surface of the biofilm of the prostheses. Most cases are asymptomatic and some patients report pain, itching or burning sensation. The diagnosis is clinical, supplemented by tests such as cytological and mycological. Treatment is often empiric, with no clear certainty whether the individual is only a carrier of yeast and if other species are involved. The chromogenic media enabled advances in the diagnosis of oral candidiasis. Its use facilitates the identification of these yeasts, resulting in less time than those of already standardized methods for other species of *Candida*. The CHROMagar *Candida* (CC) is the reference, providing results in 48 hours from the material collection. The medium called Chromogenic *Candida* Agar (CCA) was recently launched in our market and in view of its low cost seems to be one more tool for the diagnosis of candidiasis, although there is a lack of literature available on it. The objective of this study was to compare this new medium to CHROMagar *Candida* for sensitivity and specificity in the isolation of species of genus *Candida* from the oral mucosa of patients with upper dentures with or without symptoms of EP. Sixty one patients of both genders were recruited wearing complete dentures (45.9%) or uni upper jaw (54.1%) prostheses. Among the 61 samples, 45 (73.77%) were positive for yeasts in CC, and *C. albicans* (38 samples, 24 unique and 14 (36.84%) mixed. From these, 8 of *C. albicans* + *C. tropicalis* (21.05%), 3 of *C. albicans* + *C. glabrata*

(7.89%), 3 of *C. tropicalis* + *C. albicans* + *C. glabrata* (7.89%). Other species were present, being 15 *C. tropicalis* (33.33%). Two unique isolates (13.33%), two mixed: *C. tropicalis* + *C. glabrata* (13.33%) and *C. tropicalis* + *C. parapsilosis* (6.66%). In CCA, from the 45 samples, 39 were positive (86.6%). *C. albicans* was the most frequent, with 33 isolates (84.6%), being unique in 25 (75.75%) and eight in mixed cultures (24.25%). Thus, *C. albicans* + *C. tropicalis* (5 - 12.82%); *C. albicans* + *C. glabrata* (2 - 5.13%), *C. tropicalis* + *C. albicans* + *C. glabrata* (1- 2.56%). Other species isolated were *C. tropicalis* (3 – 7.7%) and *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* (one of each - 2.56%). It was possible to conclude that CHROMagar *Candida* was more sensitive (100% vs. 65%) and more specific for *C. albicans* (84.4% vs. 73.3%), *C. tropicalis* (33.3% vs. 20.0%) and *C. glabrata* (17.7% vs. 8.8%). Both media showed the same specificity (2.2%), for *C. krusei* and *C. parapsilosis*.

Keywords: *Candida*. Denture stomatitis. Oral candidiasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Coloração das colônias em meio CHROMagar CANDIDA.....	41
Figura 4.2 - Coloração das colônias em meio Candida Chromogenic Agar.....	42
Figura 4.3 - Cálculo da Sensibilidade e Especificidade.....	45
Figura 4.4 - Variáveis e equações.....	45
Figura 4.5 - Estomatite sob Prótese – Tipo 1.....	55
Figura 4.6 - Estomatite sob prótese – Tipo 2	55
Figura 4.7 - Estomatite sob prótese – Tipo 3	56
Figura 4.8 - <i>C. albicans</i> em meio cromogênico.....	56
Figura 4.9 - <i>C. tropicalis</i> em meio cromogênico.....	56
Figura 4.10 - Isolados mistos (<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>) em meio cromogênico..	57
Figura 4.11 - Tubos germinativos (A) e Micro cultivo(B) <i>C. albicans</i>	57
Figura 4.12 – Micro cultivo de <i>C. tropicalis</i> (A), <i>C. glabrata</i> (B), <i>C. krusei</i> (C) e <i>C. parapsilosis</i> (D).....	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Distribuição dos pacientes por gênero.....	46
Gráfico 5.2A – Distribuição dos pacientes de gênero feminino por tipo de prótese.....	47
Gráfico 5.2B – Distribuição dos pacientes de gênero masculino por tipo de prótese.....	48
Gráfico 5.3 - Amostras do gênero Candida isoladas em CC.....	53
Gráfico 5.4 - Amostras do gênero Candida isoladas em CCA.....	54
Gráfico 5.5 - Isolamento comparativo das amostras, em CC e CCA.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 5.1 - Distribuição das amostras obtidas em CC, por colonização.....52

Quadro 5.2 - Distribuição das amostras obtidas em CCA, por colonização.....53

Quadro 5.3 - Sensibilidade e especificidade dos meios cromogênicos CC e
CCA.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Distribuição dos pacientes quanto ao gênero, etnia e hábitos (tabaco e álcool).....	47
Tabela 5.2 - Distribuição da amostra quanto tipo de prótese, tempo de uso, última Troca e número de higienizações diárias.....	49
Tabela 5.3 - Distribuição dos sinais clínicos de candidíase oral, por intensidade e gênero.....	49
Tabela 5.4 - História anterior de candidíase, segundo referido pelos pacientes ..	50
Tabela 5.5 - Distribuição do estado de saúde da amostra, por gênero.. ..	51
Tabela 5.6 – Distribuição do uso de medicações pela amostra, por gênero.....	51
Tabela 5.7 - Comparação entre os sinais clínicos de EP e diagnóstico de Candidíase oral, com base nas contagens de UFC/mL.....	58
Tabela 5.8 - Especificidade do CC para espécies do gênero <i>Candida</i>	59
Tabela 5.9 - Especificidade do CCA para espécies do gênero <i>Candida</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD	Agar Sabouraud Dextrose
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
CE	clínica estomatológica
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
CC	CHROMagar CANDIDA®
CCA	Candida Chromogenic Agar®
EP	estomatite sob prótese
FN	falso negativo
FP	falso positivo
min	minuto
mL	mililitro
Mm	milímetro
PD	palato duro
PEP	peptona
T	triagem
UFC	unidades formadoras de colônias

UFC/mL	unidades formadoras de colônias por mililitro.
VN	verdadeiro negativo
VP	verdadeiro positivo

LISTA DE SÍMBOLOS

C	graus Celsius
C	Carbono
KNO ₃	nitrato de potássio
N	Nitrogênio
N	número de indivíduos em uma amostra
NaCl	cloreto de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 Epidemiologia	26
2.1.1 Aspectos demográficos	26
2.2 Etiologia	26
2.3 Fatores predisponentes	27
2.3.1 Trauma	27
2.3.2 Higienização da prótese	28
2.3.3 Fatores sistêmicos	28
2.4 Papel de Candida na patogênese da Estomatite sob prótese	29
2.4.1 Adesão	31
2.4.2 Invasão	31
2.4.3 Destruição tecidual	32
2.5 Características clínicas da candidíase oral na estomatite sob prótese	32
2.6 Identificação de espécies do gênero <i>Candida</i>	33
2.7 Aspectos diagnósticos	34
3 PROPOSIÇÃO	37
4 CASUÍSTICA MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 CASUISTICA	38
4.1.1 Atendimento às normas de Bioética	38
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	38

4.2.1 Exame do paciente	38
4.2.2 Coleta de material.....	39
4.2.2.1 Coleta de saliva	39
4.2.2.2 Coleta de material do sítio suspeito ou não de candidíase oral / palato duro.....	40
4.2.3 Identificação das amostras	41
4.2.3.1 Identificação presuntiva em CHROMagar CANDIDA®.....	41
4.2.3.2 Identificação presuntiva em CANDIDA CHROMOGENIC AGAR®	41
4.2.4. Estudo da micro morfologia.....	42
4.2.4.1 Formação de tubos germinativos em soro fetal bovino.....	42
4.2.4.2 Micro cultivo em Agar <i>corn meal</i> acrescido de <i>Tween</i> 80.....	42
4.2.5 Testes bioquímicos	43
4.2.5.1 Assimilação de fontes de C E N (auxanograma)	43
4.2.5.2 Fermentação de carbo-hidratos (zimograma)	43
4.2.6 Teste de termo sensibilidade (crescimento a 45 ⁰ C).....	44
4.2.7 Crescimento em meio Hipertônico	44
4.2.8 Quantificação das colônias em UFC/mL	44
4.2.9 Cálculo da sensibilidade e especificidade dos meios cromogênicos.....	45
4.2.9.1 Metodologia para o cálculo da sensibilidade e especificidade.....	45
5 RESULTADOS.....	46
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS.....	68

APÊNDICE 76

ANEXOS 77

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* descrito pela primeira vez em 1923 por Berkhout, já nos anos quarenta, evidenciava espécies de importância médica tais como *albicans*, *tropicalis*, *krusei*, *kefir* e *parapsilosis*, após decisão informal adotada no Terceiro Congresso Internacional de Microbiologia (Barnett, 2008). *Candida albicans* constitui a espécie mais importante do gênero, sendo o agente etiológico do maior número de micoses no ser humano universalmente (Odds, 1988). Habitante da microbiota endógena é comumente encontrada na cavidade oral de seres humanos saudáveis, onde participa da microbiota como comensal, sendo a fonte mais comum de reinfecção (Odds, 1987). A partir desses sítios, em determinadas condições de interação com o hospedeiro, pode causar fungúria e fungemia (Krause et al., 1969).

A causa mais comum de candidíase oral é representada pela estomatite sob prótese (EP) em indivíduos portadores de próteses dentárias, parciais ou totais, onde *C. albicans* e outras espécies podem ter papel relevante, interagindo com outros fatores predisponentes (Figueiral et al., 2007).

A EP é um processo inflamatório da mucosa oral subjacente a uma prótese total, parcial ou aparelho dentário removível, excluindo etiologias conhecidas como alergia aos materiais dentários utilizados para a confecção das próteses ou queimaduras relacionadas ao contato direto da prótese com a mucosa oral (Figueiral et al., 2007). Acomete cerca de 60 a 67% dos portadores de prótese total (Pires et al., 2002; Salerno et al., 2011). Apesar da frequência, a estomatite protética (EP), na maioria dos casos é assintomática. Poucos pacientes relatam sintomatologia dolorosa, prurido ou sensação de ardência. A doença é diagnosticada primariamente durante o exame clínico, devido à presença de inflamação ou edema dos tecidos de suporte da prótese (Gendreau; Loewy, 2011).

A identificação presuntiva através dos meios cromogênicos vem sendo utilizada como método seletivo e diferencial para o isolamento de espécies de *Candida*, oferecendo diferenciação direta das espécies. As leveduras do gênero *Candida* secretam enzimas que reagem com substratos cromogênicos, produzindo colônias de diferentes colorações. Essas enzimas são específicas, permitindo que

algumas leveduras sejam identificadas ao nível de espécie pela cor e características macro morfológicas da colônia (Murray et al., 2005).

A identificação rápida e confiável destas espécies é essencial, pois elas diferem em sua virulência e sensibilidade aos antifúngicos. A identificação de *C. albicans* no laboratório de microbiologia é baseada em características morfológicas, tais como a formação de pseudo-hifas, clamidoconídios e blastoconídios, quando cultivada em Agar fubá e a formação de tubo germinativo quando incubada em soro fetal bovino (Agarwal et al., 2011).

A assimilação de fontes de carbono, nitrogênio e a fermentação de fontes de carbono, são testes utilizados rotineiramente na confirmação da identificação de outras espécies de *Candida* (Fotedar; Hedaithy, 2003). Devido ao seu curto período de incubação (24 a 48 horas), os meios cromogênicos possuem o potencial de reduzir o tempo para a identificação de espécies do gênero *Candida* de amostras clínicas, permitindo assim o uso precoce da terapia antifúngica e a possível diminuição da morbidade e mortalidade dos pacientes (Okulicz et al., 2008). Os métodos baseados em biologia molecular são na atualidade, excelentes ferramentas para a identificação de espécies de importância médica e o seu uso foi proposto desde a década de 90. Atualmente, devido à sua grande sensibilidade e especificidade, o método molecular de PCR (Reação em cadeia de polimerase) vem sendo implementado com êxito na identificação de vários patógenos, incluindo diferentes espécies de *Candida* (Barraza et al., 2011).

O envolvimento de *Candida* como potencial causador da EP foi descrito por Cahn em 1936, segundo Ramage et al. (2004). Sua etiologia é multifatorial, sendo a candidíase oral um dos fatores mais comuns. A deficiência na higienização oral e limpeza da prótese estão relacionadas ao desenvolvimento de um biofilme que adere de forma resistente à superfície da prótese (Noriyuki et al., 2011). Outros fatores podem ser incluídos, como próteses mal adaptadas, infecções microbianas, desgaste da prótese, fatores sistêmicos, antibióticos e outras drogas, entre outros (Redding et al., 2009). *Candida albicans* é um microorganismo residente na cavidade oral de indivíduos saudáveis, atuando como comensal na microbiota oral (Abaci et al., 2010), sendo o agente causador mais comum da candidíase oral na EP. Entretanto, outras espécies como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida*

krusei e *Candida parapsilosis* foram isoladas com frequência relativa em pacientes usuários de prótese (Marcos-Arias et al. 2009).

Eventuais alterações no sistema imune do hospedeiro, como a imunossupressão, podem modificar o estágio da levedura de comensal a potencialmente patogênica, ocorrendo manifestação através de várias formas clínicas de candidíase, e até disseminando para formas invasivas (Salerno et al., 2011). Algumas espécies de *Candida* são reconhecidas como patógenos oportunistas que causam significativa morbidade e mortalidade entre pacientes imunossuprimidos (Fotedar; Hedaithy, 2003).

Infecções orais causadas por leveduras do gênero *Candida* e particularmente por *Candida albicans* (candidíases orais), apresentam um evidente aumento de interesse associado à pesquisa desde a década de 80. O aumento da incidência de candidíases orais ocorreu principalmente pelo crescimento da infecção pelo HIV e a pandemia de AIDS. Modificações nas práticas médicas aumentando a utilização de procedimentos invasivos clínicos, e o uso generalizado de terapia imunossupressora também contribuíram para o problema. A *Candida albicans* é capaz de provocar infecção oral quando há uma doença subjacente predisponente no hospedeiro (Williams; Lewis, 2011).

O primeiro passo que evidencia o desenvolvimento do processo infeccioso provocado pelo fungo, é a capacidade que o mesmo apresenta em aderir-se à superfície de resina acrílica das próteses, resultando em diferentes graus de EP. Sem essa adesão, os microorganismos poderiam ser removidos da cavidade oral através da deglutição da saliva ou dos alimentos (Pereira-Cenci et al., 2008).

As atividades de proteinase e fosfolipase juntamente a adesão dos microorganismos às células, são considerados importantes fatores de virulência e facilitadores do estabelecimento da infecção fúngica. A secreção de áspartil proteinase e fosfolipase por *Candida albicans* apresenta taxas elevadas, enquanto nas espécies não *albicans* geralmente apresentam-se baixas (Costa et al., 2009).

A prioridade no tratamento da candidíase oral é a remoção de qualquer fator predisponente identificável, bem como a melhoria na higiene oral através de limpeza e adequação da prótese (Williams; Lewis, 2011).

Existem diferentes modalidades de tratamentos da candidíase oral utilizando agentes antifúngicos. O mecanismo de ação envolve uma alteração no metabolismo do DNA e RNA ou através do acúmulo de um peróxido intracelular, que é potencialmente tóxico para as células fúngicas. É importante avaliar a cronicidade e a gravidade da infecção. Opções iniciais de tratamento envolveram o uso de derivados poliênicos (Nistatina e Anfotericina B). Ao longo do tempo houve uma mudança para o uso de derivados azólicos (Fluconazol, Cetoconazol e Itraconazol). No entanto, algumas espécies do gênero *Candida* têm se tornado resistentes às drogas, como ocorrem com a *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*, especialmente durante longos períodos de administração (Giannini; Shetty, 2011).

Nos casos de EP observados na prática clínica estomatológica, na maioria das vezes o diagnóstico da candidíase oral é clínico, associado ao emprego de exame citológico e/ou micológico direto. O tratamento é, via de regra, empírico e de modo geral a candidíase quando presente é sempre creditada à *C. albicans*. Uma mudança de paradigma no processo diagnóstico dessas afecções tão comuns incluiria a adoção de protocolos clínicos diagnósticos confiáveis, de custo relativamente baixo e de rápida execução, com o objetivo de esclarecer alguns aspectos importantes dos quais citaríamos: a simples presença de leveduras do gênero *Candida* na cavidade oral de portadores de prótese dentárias e EP, possibilitaria o diagnóstico de candidíase oral e, em decorrência, imporia ao clínico o tratamento empírico?

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia

2.1.1 Aspectos Demográficos

A prevalência de espécies do gênero *Candida* em portadores de EP é bastante variável na literatura. A espécie mais predominante é a de *C. albicans*, com frequências entre 60% a 65%, sendo o principal patógeno devido à sua capacidade de se manter e proliferar na cavidade oral produzindo um biofilme microbiano complexo e heterogêneo (Salerno et al., 2011). Outras espécies também estão presentes em frequências variáveis, como *C. glabrata* e *C. tropicalis* representando de 5% a 8% dos isolados (Giannini; Shetty, 2011).

2.2 Etiologia

A etiologia da EP não se deve a uma única causa. A interação da presença de microrganismos (infecção bacteriana e por leveduras) e inúmeros fatores predisponentes como o trauma, superfícies irregulares, higienização deficiente das próteses e uso contínuo por longo tempo, medicações, idade e declínio concomitante das defesas imunológicas, alteração de fluxo salivar, condições sistêmicas, tabagismo, dieta e pH do meio (Ramage et al., 2004; Pereira-Cenci et al., 2008; Macêdo et al., 2009; Gendreau; Loewy, 2011). No passado os materiais utilizados na confecção das próteses sugeriam um potencial alérgico na EP. Essa resposta foi considerada um fator etiológico significativo na doença. Atualmente a modernização dos materiais utilizados elimina virtualmente a resposta alérgica como fator etiológico para a EP (Williams et al., 1997). Newton em 1962, foi o primeiro a introduzir uma classificação clínica para a EP, dividindo-a em três classes de acordo com o aspecto clínico da área de mucosa recoberta pela prótese. Nos três casos a

mucosa se apresentava hiperemiada e eritematosa: classe 1: hiperemia puntiforme, limitada aos óstios das glândulas salivares menores presentes na área; classe 2: inflamação generalizada da mucosa em toda a área recoberta pela prótese, com hiperemia difusa e mucosa lisa e atrófica; classe 3: inflamação generalizada e mucosa hiperêmica, com aparência nodular, típica das hipertrofias papilomatosas, sendo mais intensa na porção central do palato duro, especialmente em casos de próteses com câmara de sucção.

2.3 Fatores predisponentes

2.3.1 Trauma

As forças mecânicas possuem um papel importante nas alterações teciduais provocadas pela instabilidade da prótese. O processo inflamatório na EP é variável, dependendo do tipo de tecido envolvido, bem como da intensidade e concentração das forças transmitidas (Emami et al., 2008). Além disso, o trauma pode reduzir a resistência do tecido contra a infecção em virtude do aumento da permeabilidade do epitélio a antígenos solúveis de *Candida* e toxinas (Sanitá et al., 2011).

O trauma, por si só, não induz um quadro de EP generalizada, mas poderia ser a causa de formas localizadas. *Candida albicans* teria o papel de principal patógeno da doença, atuando igualmente como co-fator, favorecendo a própria adesão e penetração tecidual. A análise imunohistoquímica no tecido da mucosa envolvida, tem demonstrado um possível papel do trauma na variação da expressão de antígenos de membrana pela célula fúngica (Salerno et al., 2011).

2.3.2 Higienização da prótese

O contato da prótese com a mucosa oral cria um ambiente que favorece o desenvolvimento de microrganismos potencialmente virulentos, além de isolar a mucosa subjacente à área de contato, da ação de auto limpeza da musculatura oral. Essa condição propicia o desenvolvimento de anaerobiose e acidez na superfície do tecido, promovendo a proliferação de leveduras. Nessas condições, *C. albicans* desenvolve um biofilme na superfície da prótese, formando um nicho protegido para microorganismos, onde eles estão a salvo do tratamento com antibióticos, criando uma fonte de reinfecção persistente (Chandra et al., 2001; Avon et al., 2007; Christopher et al., 2009). A fixação destes microorganismos na superfície da prótese, permite que os mesmos atuem como um reservatório de infecção contínua e as células do biofilme que se forma, possuem uma maior resistência aos antifúngicos e ao sistema imune do hospedeiro (Kojic; Darouiche, 2004).

A higienização da prótese apenas com a escovação, é inadequada para manter condições que evitem a adesão do biofilme. Outros métodos, como o uso de soluções desinfetantes comerciais, imersão da prótese em hipoclorito de sódio diluído, devem fazer parte da manutenção diária de rotina. A não remoção da prótese durante a noite também está associada com a deficiência de higiene (Gendreau; Loewy, 2011).

2.3.3 Fatores sistêmicos

A cavidade oral, como um reservatório para a colonização por microrganismos patogênicos, propicia o desenvolvimento de infecções sistêmicas. É crescente a evidência de que as infecções orais desempenham um papel na patogênese de muitas doenças sistêmicas. Essas infecções afetam o prognóstico das doenças, não somente em idosos e imunocomprometidos, como também em pacientes saudáveis (Mojon 2002; Senpuku et al., 2003).

A prevalência de diabetes tipo 2, que representa a forma mais comum da doença, é discretamente maior em mulheres e aumenta significativamente com a idade, acometendo cerca de 25% de pacientes idosos com idade entre 60 a 74 anos. A *diabetes mellitus* está correlacionada positivamente com o edentulismo. Estudos demonstram que estes pacientes apresentam um risco de 1,82 vezes maior de serem acometidos pela diabetes do que o paciente dentado. A diabetes não controlada aumenta o risco de infecções orais oportunistas, como a candidíase oral. Pacientes diabéticos possuem uma alta taxa dessa infecção, associada à EP. A diabetes aumenta os efeitos nocivos da irritação mecânica da prótese, e na mucosa oral isolada sob a prótese, cria-se um ambiente onde ocorre um desequilíbrio microbiológico (Dorocka-Bobkowska et al., 2010).

Os níveis salivares de glicose em pacientes diabéticos favorecem o crescimento da levedura, devido ao aumento do número de receptores disponíveis para *Candida*. Em consequência, as células epiteliais de pacientes diabéticos mostram um aumento da aderência de *Candida albicans* em comparação às células de não diabéticos. A degeneração microvascular observada em cortes histológicos de mucosa oral de pacientes diabéticos também pode predispor à colonização por *Candida*, tornando-os mais suscetíveis a essas infecções (Sanità et al., 2011).

O fluxo salivar contínuo é indispensável para a defesa do hospedeiro contra infecções, uma vez que constitui um fator importante equilibrar a microbiota oral, eliminando um grande número de patógenos da cavidade oral. Foi demonstrado que a diminuição dos neutrófilos salivares envolvida com eventos de imunossenescência pode estar relacionada com a predisposição para a infecção oral (Gasparoto et al., 2011). A redução do fluxo salivar associado à diabetes desempenha um papel importante na colonização por *Candida* e na patogênese da candidíase oral (Kadir et al., 2002).

2.4 Papel de *Candida* na patogênese da EP

Candida albicans tem a capacidade de se transformar em um eficaz patógeno devido a fatores como a adesão, dimorfismo, produção de exoenzimas (protease e

fosfolipase) e a formação de biofilme (Abaci et al., 2010). Outra característica associada com a patogenicidade é a propriedade de multiplicação em altas temperaturas, como 39°C e 42°C (Rörig et al., 2009).

Os fatores de virulência são necessários para o estabelecimento da doença, interagindo diretamente com as células hospedeiras, causando danos. A patogenicidade de espécies do gênero *Candida* é mediada por uma série de fatores de virulência, incluindo a adesão e formação de biofilme no tecido hospedeiro, a capacidade de evasão das defesas do hospedeiro e a produção de enzimas hidrolíticas, como proteases e fosfolipases (Silva et al., 2011).

A adesão e formação de biofilme de *Candida*, tanto na prótese, quanto no hospedeiro, é um mecanismo de sobrevivência para garantir a permanência da levedura na cavidade oral. Em biofilmes, as bactérias e os fungos são tipicamente encapsulados em uma matriz de glicoproteínas e polissacarídeos produzidos pelos componentes microbianos, residindo muitas vezes em um estado quiescente, com atividade metabólica reduzida, sendo menos sensíveis ao tratamento com antifúngicos (Ten Cate et al., 2009).

Interações de leveduras do gênero *Candida* sob estado de hifas com as células hospedeiras, são essenciais para a colonização inicial, indução da resposta imune e invasão tecidual. *Candida albicans* é o principal causador de candidíase, sendo o patógeno oportunista responsável por uma grande variedade de infecções. Esse fungo pleomórfico pode crescer tanto na forma de levedura (comensal), ou em formas hifais (patogênico). Sua viabilização se inicia através da formação de tubos germinativos, provenientes da célula de levedura. As interações iniciais do fungo com o hospedeiro são mediadas pela parede da célula fúngica, que compreende vários componentes envolvidos na adesão, denominados adesinas. A aderência de *C. albicans* às superfícies inertes ou substratos biológicos é considerada um atributo essencial de sua virulência (Martin et al., 2011).

Diferenças específicas na composição da parede celular da levedura e formas de hifas, podem explicar as diferenças na resposta imune. *Candida albicans* é capaz de modificar a via de diferenciação das células do sistema imunológico, dependendo de seu estado morfológico, que também pode contribuir para a sua capacidade de escapar da ação do sistema imune (Whiteway; Oberholzer, 2004). Foi

demonstrado que a adesão da forma micelial de *C. albicans* às células epiteliais bucais é mais forte, e também proteinases secretadas quando sob forma de micélio causam mais danos à mucosa oral (Abaci et al., 2010).

As aspartil proteinases secretórias (sap), constituem uma família de enzimas que são capazes de degradar fisiologicamente vários substratos importantes, como a imunoglobulina, albumina e proteínas da pele e mucosa. Estudos demonstram que cepas mutantes de *C. albicans* com deficiência na secreção de proteinase, foram menos virulentas para camundongos. As fosfolipases são enzimas hidrolíticas que degradam fosfolipídios comuns em todas as membranas celulares. Relatos demonstram que cepas de *C. albicans* com atividade de fosfolipase aumentada, foram associadas à potencial de virulência em modelos murinos de candidíase disseminada (Lyon; Resende, 2006).

2.4.1 Adesão

O simples contato físico de *C. albicans* com as células epiteliais, é suficiente para desencadear a rápida formação de hifas e a expressão de genes mediadores da adesão. As adesinas também desempenham um papel importante durante a formação de biofilmes em superfícies diversas. Algumas adesinas específicas como a Hwp1, Als1 e Als3 parecem agir diretamente entre si durante a formação do biofilme (Zakikhany et al., 2007; Wächtler et al., 2011).

2.4.2 Invasão

As infecções orais são caracterizadas pela invasão das células do hospedeiro pelas hifas de *Candida*. Duas vias de invasão vêm sendo descritas: a penetração ativa e a endocitose induzida (Zakikhany et al., 2007; Zhu; Filler; 2010).

Na penetração ativa, as hifas de *C. albicans* podem entrar diretamente nas células do hospedeiro ou nas junções intercelulares. Esse processo é impulsionado

pelas atividades fúngicas e depende de sua viabilidade, não estando, ainda, bem elucidado (Villar et al., 2007; Dalle et al., 2010). Acredita-se que a simples formação de hifas seja suficiente para a invasão.

As enzimas hidrolíticas (proteases, lipases e fosfolipases), contribuem para a invasão e desempenham um papel na virulência em diferentes modelos de infecção. A endocitose induzida é caracterizada pelo rearranjo da célula hospedeira e do citoesqueleto, resultando em englobamento da célula fúngica pela célula hospedeira. Esse processo é mediado pela interação de caderinas da célula hospedeira com a célula fúngica. As aspartil proteinases (SAP 1-3 e SAP 4-6) atuam tanto na penetração ativa, quanto na endocitose induzida (Schaller et al., 2005).

2.4.3 Destruição Tecidual

As fases iniciais de invasão durante as infecções epiteliais, não estão associadas com destruição tecidual significativa. Isso se deve ao fato de que as hifas mortas de *C. albicans* podem sofrer endocitose pela célula do hospedeiro, sem causar qualquer dano. As fases tardias da infecção são caracterizadas por dano celular substancial e destruição tecidual por hifas longas de *C. albicans*. Nessa fase, o fungo sofre uma adaptação para mudança nas condições ambientais, ocasionando o rompimento da célula do hospedeiro (Park et al., 2005; Dalle et al., 2010). A expressão gênica de fungos durante este estágio, revelou respostas para a modificação do pH, avidez por carbono e nitrogênio, interação no metabolismo de fosfatos e estresse nitrosativo (Whiteway; Oberholzer, 2004).

2.5 Características Clínicas da Candidíase oral na EP

É bastante difícil descrever isoladamente as características clínicas da candidíase oral na EP. Tanto a irritação mecânica causada pela prótese inadequada, quanto o biofilme aderido à mesma, somados à invasão da mucosa por leveduras do

gênero *Candida*, conferem um aspecto eritematoso em diversos graus. Assim, clinicamente, um dos critérios utilizados baseia-se na classificação clínica EP proposta por Newton (1962). Na dependência do isolamento e quantificação das espécies, determina-se o diagnóstico de candidíase eritematosa (Coco et al., 2008).

2.6 Identificação de espécies do gênero *Candida*

O isolamento das espécies do gênero *Candida* importantes em saúde pública, tem adquirido ao longo dos anos um interesse crescente. Pela alta prevalência de espécies de *Candida* em indivíduos saudáveis e assintomáticos, elas podem aderir à prótese dental e colonizar a mucosa oral, independente do estado de imunidade de seus portadores. O isolamento dessas leveduras na cavidade oral não implica necessariamente na ocorrência de infecções (Costa; Candido, 2007). A melhoria na tecnologia de confecção de meios de cultura, tem possibilitando ao longo dos anos a identificação de espécies de importância para o diagnóstico da micose mais prevalente universalmente, no entanto, o padrão ouro durante muitos anos para isolamento primário de *Candida*, tem sido baseado em protocolos que incluem semeadura do material clínico em Ágar Sabouraud Dextrose adicionado de cloranfenicol (ASDC), que é o meio mais frequentemente empregado nos isolamentos primários (Agarwal et al., 2011). Testes de micro morfologia, como o de formação de tubos germinativos após crescimento em soro fetal bovino e observação de clamidoconídios após micro cultivo em ágar fubá acrescido de *tween* 80, são importantes na confirmação da espécie *albicans*. Para outras espécies, esse protocolo se torna insuficiente, acrescentando-se a necessidade da realização de testes bioquímicos, que incluem principalmente, assimilação de fontes de C e N (Auxanograma), fermentação de carbo-hidratos (Zimograma) e termo tolerância (Pincus et al., 2007; Giannini; Shetty, 2011).

Embora esses métodos sejam altamente confiáveis, requerem meios micológicos específicos, demandam um tempo longo para a obtenção dos resultados, que na maioria das vezes não são aplicados, porque requerem trabalho extensivo e só podem ser realizados em laboratórios especializados em micologia

(Koehler et al., 1999; Hospenthal et al., 2006). Algumas leveduras incomuns exigem estudos morfológicos e bioquímicos para a sua identificação, ocasionalmente exigindo até 21 dias de incubação (Nadeem et al., 2010). Esse é um grande obstáculo para o clínico, que em razão disso, institui, via de regra, o tratamento de forma empírica com agentes antimicrobianos ou antifúngicos, baseado no teste terapêutico, sendo confirmado o diagnóstico em decorrência à resolução do quadro clínico.

Os fungos podem ser prontamente identificados, mas os sinais clínicos podem não estar presentes, e mesmo com a presença destes, o isolamento de um fungo por si só não pode garantir a sua patogenicidade (Robin; Lane, 2003).

O advento dos meios cromogênicos possibilitou avanço importante no diagnóstico das candidíases orais. A utilização destes meios facilita a detecção e a identificação destas leveduras, fornecendo resultados presuntivos em menor tempo que os obtidos pelos métodos já padronizados de espécies importantes do gênero *Candida*, notadamente *Candida albicans* (Araujo et al., 2005).

A utilidade de um meio seletivo para o isolamento de fungos é evidente, pois o mesmo oferece diferenciação direta e identificação de várias espécies de *Candida*, com grande precisão e de fácil execução, necessitando de um menor tempo e custo menor (Nadeem et al., 2010). As leveduras produzem enzimas que reagem com substratos cromogênicos presentes no meio, permitindo que sejam identificadas ao nível de espécies pela sua cor e características morfológicas da colônia (Murray et al., 2005). Esses meios permitem a detecção do crescimento de espécies múltiplas oriundas de um único espécime clínico, devido à diferenciação de cor da colônia (Bishop et al., 2008).

2.7 Aspectos diagnósticos

A identificação de espécies do gênero *Candida* (C) é de suma importância, devido às espécies emergentes, como *C. glabrata* e *C. krusei*, apresentarem resistência ao fluconazol, e *C. lusitaniae*, que vem sendo relatada como resistente à

anfotericina B. O estabelecimento de uma terapia antifúngica adequada depende diretamente da identificação rápida e precisa das leveduras (Murray et al., 2005; Araujo et al., 2005).

A citologia esfoliativa é a técnica mais freqüentemente utilizada na prática clínica em estomatologia. De fácil execução, o diagnóstico é estabelecido em conjunto com os sinais clínicos, porém seu resultado é demorado pois depende de um exame realizado pelo patologista. Esse método produz um melhor resultado nos quadros de candidíase pseudomembranosa, onde há um maior número de hifas fúngicas (Lund et al., 2010; Giannini; Shetty, 2011; Rabelo et al., 2011). Na candidíase oral, a preparação de espécimes utilizando hidróxido de potássio (KOH), é o melhor teste para a demonstração microscópica de *Candida*. A frequência de isolamento de espécies de *Candida* na cavidade oral é maior que a frequência de observação de manifestações clínicas. Uma cultura positiva na ausência de sinais e sintomas, não implica necessariamente em candidíase, podendo produzir resultados falso-negativos (Teraí; Shimanara, 2009). Outra razão que produz resultados variáveis, decorre do fato da difícil visualização dos fungos sem o uso de corantes contrastantes (Robin; Lane, 2003).

O diagnóstico da candidíase oral pode ser feito com base em biópsia da mucosa, quando no histopatológico, pode-se observar a invasão por estruturas fúngicas, ou seja, a penetração de hifas no epitélio do hospedeiro (Robin; Lane, 2003; Giannini; Shetty, 2011).

O teste de termotolerância de 42°C a 45°C é utilizado para a confirmação correta de *C. dubliniensis*, exigindo identificação adequada em laboratório, pelo fato de existirem implicações epidemiológicas e terapêuticas. Essa espécie está intimamente relacionada com *C. albicans*, pelo fato de ambas possuírem características fenotípicas semelhantes, incluindo a morfologia microscópica e a capacidade de formar tubo germinativo, levando, muitas vezes, a uma identificação incorreta de *C. dubliniensis* como *C. albicans* (Pinjon et al., 1998; Spolidorio et al., 2009; Kim et al., 2010). O crescimento em meio hipertônico (Alves et al., 2002), é um teste também utilizado, na diferenciação de *C. albicans* (cresce em meio hipertônico) de *C. dubliniensis* (não cresce no mesmo meio).

Em pacientes que usam próteses dentárias, 300 UFC / mL em saliva ou maior número de leveduras, frequentemente revelam candidíase associada à EP (Vasquez; Sobel, 2002).

O Ágar sabouraud dextrose é um meio de cultivo que possibilita o crescimento de leveduras, sendo que o cultivo a 37°C por 24 a 48 horas, quando positivo, resulta na formação de colônias de coloração creme. Normalmente é recomendada a utilização juntamente com um segundo meio diferencial (Pagano-Levin ou ágares cromogênicos), pois este método não fornece informações sobre as espécies de *Candida* (Farah et al., 2010).

O CHROMagar Candida® (CHROMagar, Paris, França), tem sido referência para a identificação presuntiva de *Candida albicans*, com resultados de sensibilidades e especificidade superiores a 99% após 48 horas de incubação, de 35° a 37°C (Bernal et al., 1996; Silva et al., 2004; Peng et al., 2007; Rabelo et al., 2011). É um meio diferencial que permite o isolamento seletivo de leveduras e, simultaneamente identifica colônias de *C. albicans* (coloração verde), *C. tropicalis* (colônias azuis) e *C. krusei* (colônias rosas), sendo este superior ao Ágar sabouraud dextrose em inibir o crescimento bacteriano (Pfaller et al., 1996; Hospenthal et al., 2006; Sivakumar et al., 2009).

O objetivo principal do uso deste meio é de obter resultados de cultura de forma rápida o suficiente, fornecendo subsídios para o tratamento adequado aos pacientes com candidíase, devido à resistência de algumas espécies a determinadas drogas antifúngicas, evitando o uso dessas drogas em larga escala, o que poderia levar a resistência de algumas espécies de *Candida* (Madhavan et al., 2011).

Outros meios cromogênicos têm sido utilizados na prática clínica, com resultados variáveis comparativos ao CHROMagar Candida® (Peng et al., 2007; Ozcan et al., 2010). A literatura que pudemos ter à disposição para consulta não nos possibilitou encontrar nenhum trabalho comparando o CHROMagar Candida® com o *Candida* Cromogenic Agar®, sendo este último recente no mercado brasileiro.

3 PROPOSIÇÃO

A proposição do presente trabalho foi estudar comparativamente dois meios cromogênicos (CHROMagar *Candida*[®] e *Candida* Chromogenic Agar[®]), quanto à sensibilidade e especificidade, para a identificação de espécies do gênero *Candida*, isoladas de pacientes portadores de próteses dentárias completas ou unimaxilares superiores, com vistas a contribuir para o diagnóstico mais acurado da candidíase oral.

4 CASUÍSTICA-MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram incluídos no presente estudo 61 pacientes de ambos os sexos e com idades ≥ 18 anos, que freqüentaram o ambulatório de Estomatologia Clínica da FOU SP, entre 27/09/2010 e 27/04/2011, para tratamento (CE) ou triagem (T). Os critérios de inclusão admitiam pacientes portadores de próteses dentárias completas ou unimaxilares superiores com Estomatite sob prótese (EP) ou não. Eram excluídos, pacientes que estivessem sob antibioticoterapia e / ou córticoterapia até os 30 dias antecedentes à consulta.

4.1.1 Atendimento às normas de Bioética.

O recrutamento foi efetivado após a leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo B) e concordância do paciente em participar da pesquisa.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Exame do paciente

O Exame Clínico foi realizado sempre por um único examinador, Estomatologista, sendo que os dados de Anamnese e Exame Físico foram

registrados em Ficha Clínica especialmente desenvolvida para utilização no presente estudo (Anexo C).

Com base no aspecto clínico da mucosa oral recoberta pela prótese total superior, os pacientes foram classificados de acordo com o proposto por Newton, em 1962:

Tipo 0: indivíduos com a área da mucosa oral recoberta pela prótese total superior, sem sinais clínicos de alterações.

Tipo 1: Hiperemia puntiforme limitada aos óstios das glândulas salivares palatinas menores.

Tipo 2: Hiperemia difusa. A inflamação é generalizada e a mucosa apresenta-se lisa e atrófica, abrangendo toda a região recoberta pela prótese.

Tipo 3: Hiperemia granular. Caracterizada por mucosa hiperêmica, com aspecto nodular, podendo estar presente em toda a região recoberta pela prótese, entretanto, mais comumente restrita à região central do palato, sendo particularmente encontrada em áreas sob câmara de sucção das próteses totais quando presentes.

4.2.2. Coleta de material

4.2.2.1. Coleta de saliva

Os pacientes foram orientados a não ingerirem nenhum alimento, sólido ou líquido, exceto água, uma hora antes da coleta, e aqueles com hábito de tabagismo foram igualmente orientados a não fumar no mesmo período.

Saliva total não estimulada foi coletada sempre no período entre 9 e 11 horas da manhã, depositada em uma proveta graduada de plástico estéril durante o intervalo de tempo de 15 minutos, após o que, foi determinado o fluxo salivar, pelo quociente do volume coletado (mL), pelo intervalo de tempo decorrido na coleta

(minutos). Na coleta de saliva total não-estimulada (STN), utilizou-se o método de *spitting*, de acordo com Guebur et al (2006). Os pacientes foram orientados a fazerem jejum (exceto ingestão de água) uma hora antes da coleta e a primeira amostra foi descartada. As provetas contendo a saliva, foram acondicionadas em bolsa com isolamento térmico resfriada e transportadas imediatamente ao Laboratório de leveduras da Seção de Micologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB), para armazenamento e posterior processamento. Foram considerados portadores de hipossalivação, os pacientes cujo fluxo salivar não estimulado se situasse entre 0,1 e 0,2 mL/ min Epstein et al. (1992).

4.2.2.2 Coleta de material do sítio suspeito ou não, de candidíase oral (palato duro)

Para a coleta de material do sítio suspeito, foram utilizadas duas escovas com haste longa (escova cervical Kolplast, Itupeva, SP - Brasil) estéreis, que foram pressionadas contra o sítio de coleta em movimentos circulares, semeadas individualmente em cada uma de duas placas de Petri de 90 mm de diâmetro x 15 mm de altura, previamente identificadas, contendo, respectivamente, os meios, CHROMagar *Candida*® (Biomérieux, Paris - França) *Candida* Chromogenic Agar® (Conda Laboratorios, Barcelona - Espanha), em movimentos circulares e suaves, por toda a superfície do meio, a partir do centro da placa para a periferia. A semeadura foi efetuada próxima à chama de lamparina à álcool, com o operador segurando as duas porções da placa, abertas em ângulo e imediatamente fechadas após a semeadura. Em seguida, foram acondicionadas em bolsa com isolamento térmico resfriada e transportadas imediatamente ao Laboratório da Divisão de leveduras da Seção de Micologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB) para processamento.

4.2.3 Identificação das amostras

A metodologia para identificação e confirmação das amostras foi levada a efeito de acordo com o protocolo de identificação do Laboratório da Divisão de leveduras da Seção de Micologia – Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Anexo D).

4.2.3.1. Identificação presuntiva em CHROMagar® *Candida*

Placas de Petri contendo o meio CHROMagar *Candida*® semeadas com material coletado do palato duro (4.2.2.2) foram incubadas a 37⁰ C, tendo sido feitas leituras a 24 e 48 horas, seguindo-se a orientação do fabricante (Figura 4.1).

Cor de colônia	Espécies de <i>Candida</i> pré-identificadas
Verde	<i>C. albicans</i>
Azul acinzentado	<i>C. tropicalis</i>
Rosa, rosada	<i>C. krusei</i>
Branco a Rosa	<i>Outras espécies</i>

Figura 4.1 – Coloração das colônias em meio CHROMagar CANDIDA®

4.2.3.2 Identificação presuntiva em *Candida* Chromogenic Agar®

Placas de Petri contendo o meio *Candida* Chromogenic Agar® semeadas com material coletado do palato duro (4.2.1.2) foram incubadas a 37⁰ C, tendo sido feitas leituras a 24 e 48 horas, seguindo-se a orientação do fabricante (Figura 4.2).

Microrganismos	Crescimento	Coloração
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 1369)	Bom	Azul
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	Bom	Verde
<i>C. krusei</i> (ATCC 34135)	Bom	Púrpura – rosa
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	Bom	Branco claro – púrpura
<i>C. glabrata</i> (ATCC 2011)		

Traduzido da Bula do Fabricante.

Figura 4.2 – Coloração das colônias em meio Candida Chromogenic Agar®

4.2.4 Estudo da Micro morfologia

4.2.4.1 Formação de Tubos Germinativos em soro fetal bovino

Alíquotas de amostras de 24 horas das leveduras cultivadas em Agar Sabouraud Dextrose (Difco, EUA) e ajustadas à escala 0,5 de McFarland, foram inoculadas em tubos contendo 1 mL de soro fetal bovino. Os tubos foram incubados a 37⁰ C durante o período máximo de 2 horas. Após, utilizando-se pipeta de Pasteur, uma gota da suspensão foi depositada entre lâmina e lamínula e efetuada a observação em microscopia óptica com 10x e 40 x.

4.2.4.2 Microcultivo em Agar *Corn meal*, acrescido de tween 80

Agar *Corn meal*® (Difco, EUA) acrescido de 1% de *Tween* 80 (3,0) mL. Após prévia fusão em banho-maria e manutenção à temperatura em torno de 50⁰ C, foi depositado sobre uma lâmina de vidro, de maneira a formar uma película. Duas estrias paralelas das amostras a serem estudadas, foram semeadas sobre a película, utilizando-se uma alça em “L”. Sobre o conjunto, foi aplicada uma lamínula

estéril e este foi incubado à temperatura de 25⁰ C por até 72 horas, sendo as leituras efetuadas a cada 24 horas. Após 48 horas, a lâmina foi observada ao microscópio (10x e 40x) para se detectar estruturas características (clamidoconídios e produção de hifas).

4.2.5. Testes Bioquímicos

4.2.5.1. Assimilação de fontes de C e N (Auxanograma)

Preparou-se uma suspensão da levedura em 1,0 ml de água destilada na escala 5 de Mcfarland. Após feito o inóculo, adicionou-se a suspensão e a mesma foi vertida em placa de Petri esterilizada, e, logo após, o meio fundido C (sem carbono) ou N (sem nitrogênio) foi vertido na mesma placa. Seguindo-se a homogeneização do inóculo com o meio, esperou-se gelificar, e foram adicionados às placas com meio C os açúcares: glicose, rafinose, inositol, celobiose, sacarose, melibiose, lactose, trealose, dulcitol, ramnose, maltose e xilose e nas placas com meio N acrescentaram-se PEP e KNO₃. As placas foram incubadas a 25°C durante 24-96 horas. A assimilação foi positiva, quando foi observado o crescimento de colônias da levedura ao redor das substâncias.

4.2.5.2 Fermentação de carboidratos (Zimograma)

Para o estudo da fermentação de carboidratos pelos isolados de *Candida*, utilizou-se o meio base para zimograma, adicionado de 1% dos seguintes açúcares: glicose, sacarose, lactose, rafinose, maltose e trealose. Cada meio, com o respectivo açúcar, foi distribuído em tubos de ensaio, contendo em seu interior, tubos de Durham invertidos. Estes foram inoculados com culturas de 24 h das amostras a serem identificadas e após, incubados a 32° por no máximo 14 dias. A produção de ácido e formação de gás revelou a positividade do teste.

4.2.6. Teste de termo sensibilidade (Crescimento a 45° C):

Para a realização dos ensaios foram utilizadas como controles as amostras padrões ATCC 64548 (*C. albicans*) e ATCC 777 (*C. dubliniensis*). A leitura dos ensaios foi realizada segundo Sullivan; Coleman (1998). Foram consideradas *C. albicans* as amostras que apresentaram a capacidade de crescimento a 45°C e a coloração verde clara, nos meios cromogênicos. As amostras que apresentaram coloração verde escura nos meios cromogênicos CHROMagar® Candida e Chromogenic Candida Agar® e não cresceram a 45°C foram consideradas *C. dubliniensis*.

4.2.7. Crescimento em meio hipertônico

As amostras identificadas fenotipicamente como *C. albicans* foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 24 horas. Em seguida foi feita uma suspensão da levedura em água destilada estéril a qual foi ajustada por espectrofotometria para 85% de transmitância em 530 nm. Alíquotas de 20 µL de cada inóculo foram adicionadas a tubos contendo 1,0 mL de caldo Sabouraud suplementado com 6,5% NaCl e, em seguida, incubadas por 96 h. Tubos contendo apenas o meio ágar Sabouraud hipertônico, bem como tubos contendo inóculos das amostras (ATCC 64548 *C. albicans* e ATCC 777 *C. dubliniensis*) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. As culturas foram então examinadas visualmente para a detecção do crescimento das leveduras em intervalos de 24 h (*C. Albicans* cresce em meio hipertônico e *C. dubliniensis* não cresce), após 96 horas de incubação (Alves et al., 2002).

4.2.8. Quantificação das colônias (em UFC/mL)

A avaliação quantitativa dos isolados, foi realizada pela obtenção das unidades formadoras de colônias (UFC) das espécies de *Candida* isoladas, tendo

sido consideradas, para efeito de confirmação do diagnóstico de candidíase oral contagens ≥ 300 UFC / mL (Vazquez; Sobel, 2002) após até três diluições sucessivas de alíquotas de 0,1 mL de saliva em 0,9 mL de solução salina, a partir da observação dos resultados obtidos com a alíquota inicial de 0,1mL de saliva pura. As diluições foram realizadas em triplicata.

4.2.9 Cálculo da sensibilidade e especificidade dos meios cromogênicos

4.2.9.1 Metodologia para o cálculo da sensibilidade e especificidade

Para se efetuar o cálculo de sensibilidade dos dois meios cromogênicos, utilizou-se a metodologia explicitada nas figuras 4.3 e 4.4.

Condição avaliada: isolamento de espécies de <i>Candida</i>	presente	ausente
Meio a ser testado	A	b
CHROMagar Candida / Candida Chromogenic Agar	C	d

Figura 4.3 – Cálculo de sensibilidade e especificidade

Caselas a e c	Condição avaliada para o meio a ser testado	Presente
Caselas b e d	Condição avaliada para o meio a ser testado	Ausente
Sensibilidade	$a / (c) \times 100$	%
Especificidade	$b / (d) \times 100$	%

Figura 4.4 – Variáveis e equações para o cálculo de sensibilidade e especificidade

5 RESULTADOS

Dos 61 pacientes recrutados para o exame inicial e coleta de material, 47 pertenciam ao gênero feminino (77%) e 14 (23%) ao gênero masculino (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 – Distribuição dos pacientes por gênero

As idades variaram entre 39 e 79 anos, com média de 59,01 anos.

Quanto à etnia, 46 pacientes eram leucodermas (75,4%); 10 eram feodermas (16,40%); 5 eram melanodermas (8,19%) e 1 paciente, xantoderma (1,64%). Com relação aos hábitos de tabagismo e ingestão de álcool, 51 pacientes (83,61%) negaram hábito, respectivamente, de tabagismo ou álcool, enquanto 10 pacientes (16,39%) referiram hábito, respectivamente, de tabagismo e álcool. Dentre estes, 4 (40%) referiram uso concomitante de tabaco e álcool. Os 6 que não referiram hábitos concomitantes, eram fumantes, apenas (60%). Esses resultados estão expressos na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Distribuição dos pacientes quanto ao gênero, etnia e hábitos (tabaco e álcool)

Gênero	Etnia				N	%	Hábitos		N	%
	L	F	M	X			Tb	Et		
Feminino	37	06	03	01	47	77,0	41 -	06 +	47	77,0
Masculino	09	04	01	0	14	23,0	06 -	08 +	14	23,0
Total	46	10	04	01	61	100,0	47 -	14 +	61	100,0

L= leucoderma; F= feoderma; M= melanoderma; X= xantoderma.

Tb = tabagismo; Et = etilismo; - = nega; + = refere.

O estudo das variáveis clínicas relativas ao tipo de prótese, distribuídas por gênero (Gráficos 5.2 – A e B), mostrou que os 61 pacientes eram portadores de prótese totais Superiores (100%); 33 pacientes eram portadores de Próteses totais completas (45,9%), 28 pacientes eram portadores de próteses totais unimaxilares superiores combinadas com o uso de prótese parcial removível inferior concomitante (13 - 46,43%) e (15 - 53,57%) eram desdentados parciais inferiores que não portavam nenhum tipo de prótese inferior. As porcentagens exibidas nos gráficos foram calculadas em relação aos gêneros, individualmente.

Gráfico 5.2 A – Distribuição dos pacientes de gênero feminino por tipo de prótese

Gráfico 5.2 B – Distribuição dos pacientes de gênero masculino por tipo de prótese

Com relação ao tempo de uso das próteses (Tabela 5.2): 32 pacientes (52,46%) eram portadores há 20 anos ou mais, com variação de 20 a 37 anos e uso médio de 19,33 anos. Destes, 27 eram do gênero feminino (84,38%) e 5 do gênero masculino (15,62%). A variação para o gênero feminino foi de 20 a 40 anos, com uso médio de 26,61 anos. Para o gênero masculino, foi de 20 a 30 anos, com uso médio de 26,60 anos. Entre os 29 pacientes com tempo de uso de prótese < 20 anos (47,5%), 19 eram do gênero feminino (65,52%) e 10 do gênero masculino (34,48%). A variação foi, para o gênero feminino, de 1 a 15 anos de uso, sendo que o uso médio foi de 9,66 anos. Para o gênero masculino a variação foi de 3 a 15 anos, com uso médio de 11,4 anos. Relativamente à última troca da prótese, em meses, 25 pacientes (40,9%) referiram nunca haver trocado, sendo 20 do gênero feminino (80%) e 5 do gênero masculino (20%). Para os 36 que referiram troca da prótese, 27 eram do gênero feminino (75%) e 9 do gênero masculino (25%), a época da troca variou de 1 a 288 meses da data da consulta, com média geral de 39,24 meses. Quanto aos aspectos de higienização diária da(s) prótese(s): 5 pacientes relataram higienizar a prótese uma vez ao dia (8,2%), sendo 3 do gênero feminino (60%) e dois do gênero masculino (40%); 38 pacientes referiram duas vezes ao dia (62,3%), dos quais 27 eram mulheres (71,05%) e 11 eram homens (28,95%); 18 pacientes (29,5%), higienizavam três vezes ao dia, sendo 17 mulheres (94,44%) e um homem

(5,56%). A média de higienizações diárias foi de 2,21 veze. Essas variáveis estão compiladas na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Distribuição dos pacientes pelo tempo de uso, troca de prótese e número de higienizações diárias

Gên.	Tempo de uso (anos)		Última troca*		Nh/d			
	< 20	≥ 20	Nunca	Já trocaram	1 %	2 %	3 %	
Fem.	19 (65,52%)	27 (84,38%)	20 (80%)	27 (75%)	3 (60)	27 (71)	17 (94)	
Masc.	10 (34,48%)	5 (15,62%)	5 (20%)	9 (25%)	2 (40)	11 (29)	1 (06)	
Total	29 (100%)	32 (100,0%)	25 (100%)	36 (100%)	5 (100)	38 (100)	18 (100)	
Mín.	1		1					
Máx.	40		288					
Med.	19,11		39,24					

*em meses; Nh/d = número de higienizações dia.

Em relação aos sinais clínicos de EP, considerado o total da amostra (61 pacientes) 30 pacientes (49,18%) apresentaram ausência de sinais clínicos, sendo 23 do gênero feminino (76,66%) e 7 do gênero masculino (23,34%). Sinais clínicos positivos foram verificados em 31 pacientes, com a seguinte distribuição: 16 Classe 1, sendo 13 para o gênero feminino (81,25%) e 3 (18,75%) para o masculino; 9 Classe 2, sendo 8 para o gênero feminino (88,8%) e 1 (11,2%) para o gênero masculino; 6 Classe 3, sendo 3 (50%) para cada um dos dois gêneros (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Distribuição dos sinais clínicos de EP por gênero

Gênero	Feminino				Masculino				Total			
	-	1	2	3	-	1	2	3	-	1	2	3
Sinais clínicos*												
Positivos	-x-	13	8	3	0	3	1	3	-x-	16	9	6
Negativos	23	-x-	-x-	-x-	7	-x-	-x-	-x-	30	-x-	-x-	-x-
Total	23	13	8	3	7	3	1	3	30	16	9	6

- = ausente; 1 = Classe 1; 2 = Classe 2; 3 = Classe 3 (Newton, 1962).

* Considerado o total da amostra (61 pacientes).

Quanto à história de candidíases anteriores: 58 pacientes não souberam referir (95,09%). Destes, 44 eram do gênero feminino (75,86%) e 14 (24,14%) do gênero masculino. Os três pacientes (4,91%) que referiram candidíase anterior eram do gênero feminino e apenas uma paciente referiu ter sofrido episódio pregresso de candidíase vaginal (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – História pregressa de candidíase, segundo referência dos pacientes

Gênero	Referiram candidíase anterior	Não souberam informar	Totais
Feminino	3 - 4,91 %	44 - 75,86%	47 - 80,77%
Masculino	0 – 0	14 - 24,14%	14 - 24,14%
Total	3 – 4,91%	58 - 100 %	61 - 100%

A História Médica Atual revelou que dos 61 pacientes examinados, 31 (50,82%) negaram qualquer alteração em seu estado de saúde. Dentre os 30 (49,18%) que referiram alterações de saúde, 18 (60%) eram hipertensos, 6 (20%) referiram diabetes tipo II, 4 (13,3%) referiram gastrite crônica, 5 (16,6%) referiram hiperlipidemia e 2 (6,6%) referiram sofrer de transtorno depressivo. Seis (6) pacientes (18,75%) referiram afecções menos freqüentes. A tabela 5.5 mostra a distribuição do estado de saúde da amostra por gênero.

Com referência ao uso de medicamentos: 26 pacientes (42,63%) negaram o uso de qualquer medicação na data da consulta. Destes, 21 (80,77%) eram do gênero feminino e 5 (19,23%) do gênero masculino. Os medicamentos mais comumente usados pelos 35 pacientes (57,37%) foram os anti-hipertensivos, usados por 18 pacientes (51,43%), seguidos dos hipoglicemiantes orais (6 – 17,43%) e antidiabéticos (5–14,28%). O número de medicamentos usados concomitantemente pelos pacientes variou de 2 a 7, com uso médio de 2,3 medicamentos/dia (entre os 35 que relataram o seu uso) e de 1,3 medicamentos/dia, considerada a amostra como um todo (61 pacientes). A tabela 5.6 traz o uso de medicações pela amostra, com distribuição por gênero:

Tabela 5.5 – Distribuição do estado de saúde da amostra, por gênero

Estado de saúde	Gênero feminino		Gênero masculino		Total	
	N	%	N	%	N	%
Bom estado geral	25	80	6	20	31	50,8
Hipertensão	11	18	7	11,5	18	29,5
Diabetes tipo II	5	8,2	1	1,6	6	9,8
Gastrite	2	-X-	2	-X-	4	-X-
Hiperlipidemia	4	6,5	1	1,6	5	8,3
Depressão	2	-X-	0	-X-	2	-X-
Dermatite	1	-X-	0	-X-	1	-X-
Mioma uterino	1	-X-	0	-X-	1	-X-
Candidíase vaginal	1	-X-	0	-X-	1	-X-
<i>Stent</i> aórtico	1	-X-	0	-X-	1	-X-
Hipotireoidismo	1	-X-	0	-X-	1	-X-
Labirintite	1	-X-	0	-X-	1	-X-
Glaucoma	0	-X-	1	-X-	1	-X-
<i>Talassemia minor</i>	0	-X-	1	-X-	1	-X-
Bronquite	1	-X-	0	-X-	1	-X-

Tabela 5.6 – Distribuição do uso de medicações pela amostra, por gênero:

Uso de medicações*	Gênero feminino		Gênero masculino		Total	
	N	%	N	%	N	%
Não usam	21	80,7	5	19,3	26	-X-
Anti-hipertensivos	11	31,4	7	20	18	51,4
Hipoglicemiantes	5	14,2	1	2,8	6	17
Antidislipemínicos	4	11,4	1	2,8	5	14,2
Protetor gástrico	3	8,5	2	5,7	5	14,2
Anti-agregante	2	5,7	2	5,7	4	11,4
Anti-depressivo	2	5,7	2	5,7	2	11,4

*Vários pacientes referiram uso concomitante de 2 a 7 medicamentos.

No isolamento presuntivo de espécies do gênero *Candida*, das amostras coletas dos 61 pacientes recrutados para o presente estudo, 45 (73,77%) foram positivos para leveduras em CC, sendo 38 *C. albicans* (84,4%) e destas, 24 únicas (63,16%) e 14 (36,84%) mistas, com outras espécies do gênero. Assim, *C. albicans* + *C. tropicalis* (8 – 21,05%); *C. albicans* + *C. glabrata* (3 – 7,89%); *C. albicans* + *C. tropicalis* + *C. glabrata* (3 – 7,89%). Outras espécies do gênero foram isoladas, das quais, 15 *C. tropicalis* (33,33%) únicas ou em associação com outras espécies, sendo duas únicas (13,33%) duas mistas, das quais, uma *C. tropicalis* + *C. glabrata* (13,33%) e uma *C. tropicalis* + *C. parapsilosis* (6,66%). Note-se que a associação de *C. tropicalis* com *C. albicans* somente (8 amostras), bem como a associação com *C. albicans* + *C. glabrata* (3 amostras) já foi computada no item referente à espécie *C. albicans*. Com respeito à *C. glabrata*, obtivemos 8 amostras no geral (17,7%), sendo uma única (2,22 %). Suas associações com *C. albicans* (3), com *C. albicans* + *C. tropicalis* (3) e com *C. tropicalis* (uma) já foram computadas nos itens correspondentes às espécies, *C. albicans* e *C. tropicalis*. Apenas uma amostra de *C. krusei* foi isolada (2,22%), em colonização única. Duas amostras de *C. parapsilosis* (4,44%) foram obtidas, uma em colonização única e outra associada à *tropicalis* já computada. Os resultados estão compilados no quadro 5.1 e gráfico 5.3:

Amostra	N
<i>C. albicans</i>	24
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>	8
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	3
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i> + <i>C. glabrata</i>	3
<i>C. tropicalis</i>	2
<i>C. tropicalis</i> + <i>C. glabrata</i>	1
<i>C. tropicalis</i> + <i>C. parapsilosis</i>	1
<i>C. glabrata</i>	1
<i>C. krusei</i>	1
<i>C. parapsilosis</i>	1
Total	45

Quadro 5.1 – Distribuição das amostras obtidas em CC, por colonização

Gráfico 5.3 – Amostras do gênero *Candida* isoladas em CC

Quanto ao isolamento presuntivo em meio CCA, das 45 amostras de leveduras obtidas dos 61 pacientes, 39 amostras foram positivas (86,6%). *C. albicans*, foi a mais frequente, com 33 isolados (84,6%), sendo 25 únicas (75,75%) e 8 mistas (24,25%) com outras espécies do gênero. Assim, *C. albicans* + *C. tropicalis* (5 – 12,82%); *C. albicans* + *C. glabrata* (2 – 5,13%); *C. albicans* + *C. tropicalis* + *C. glabrata* (uma – 2,56%). Outras espécies do gênero foram isoladas, dentre as quais, *C. tropicalis* (3 amostras isoladas – 7,7%), e *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (uma amostra isolada de cada – 2,56%). Os resultados estão compilados no quadro 5.2 e gráfico 5.4.

Amostra	N
<i>C. albicans</i>	25
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>	5
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	2
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i> + <i>C. glabrata</i>	1
<i>C. tropicalis</i>	3
<i>C. glabrata</i>	1
<i>C. krusei</i>	1
<i>C. parapsilosis</i>	1
Total	39

Quadro 5.2 – Distribuição das amostras obtidas em CCA por colonização

Gráfico 5.4 - Amostragem do gênero Candida isoladas em CCA

Os dados comparativos do isolamento nos dois meios são mostrados no gráfico 5.5 (CC na primeira coluna e CCA na segunda):

Gráfico 5.5 – Isolamento comparativo das amostras em CC e CCA

Para a confirmação da suspeita clínica de Candidíase oral, foram considerados os resultados das amostras advindas da coleta de saliva, com contagem ≥ 300 UFC/mL após até três diluições sucessivas, sendo que as amostras com contagem abaixo dessa faixa foram consideradas advindas de portadores com ausência de candidíase oral. Das 45 amostras positivas para leveduras, 15 (33,33%) provinham de pacientes sem sinais de EP e 30, (66,66%) de pacientes com sinais

clínicos de EP. Desses totais, 8 (53,33%) apresentaram resultados FN (sinais clínicos compatíveis com ausência de EP e ≥ 300 UFC/mL) e 7 (46,66%), resultados VN (ausência de sinais clínicos para EP e contagens < 300 UFC/mL). Resultados FP (pacientes com sinais clínicos de EP, mas com contagens < 300 UFC/mL) foram verificados para 11, (36,66%) amostras e VP (sinais clínicos compatíveis com EP e contagens ≥ 300 UFC/mL), para 19 (63,33 %) amostras (Tabela 5.7).

Os sinais clínicos de EP foram anotados com base na Classificação clínica proposta por Newton em 1962 e estão ilustrados na figura 4.5 (Tipo 1), figura 4.6 (Tipo 2) e figura 4.7 (Tipo 3):

Figura 4.5 – Estomatite sob prótese (Tipo 1)

Figura 4.6 – Estomatite sob prótese (Tipo 2)

Figura 4.7 – Estomatite sob prótese (Tipo 3)

As semeaduras nos meios cromogênicos possibilitaram diferir as espécies pela cor do isolado, conforme mostram as figuras 4.8 – *C. Albicans* em meio cromogênico; 4.9 – *C. Tropicalis* em meio cromogênico e 4.10 – Isolados mistos, (*C. Albicans* + *C. Tropicalis*) em meio cromogênico.

Figura 4.8 – *C. albicans* em meio cromogênico

Figura 4.9 – *C. tropicalis* em meio cromogênico

Figura 4.10 – Isolados mistos (*C. albicans* + *C. tropicalis*) em meio cromogênico

As figuras 4.11 e 4.12 ilustram as imagens obtidas nos testes de micro-morfologia:

Figura 4.11 – Tubos germinativos (A) e Micro cultivo (B) de *C. Albicans*

Figura 4.12 – Micro cultivo de *C. Tropicalis* (A), *C. Glabrata* (B), *C. Krusei* (C) e *C. Parapsilosis* (D)

Tabela 5.7 – Comparação entre os sinais clínicos de EP e diagnóstico de Candidíase oral, baseados nas contagens de UFC/mL

Am.	Sinais Clínicos		UFC/mL		Diluição		Diagnóstico			
	-	+	-	+	-	+	VN	FN	VP	FP
01		1		27,0 * 10	X					X
02	-	0	4,4 * 10 ⁴			3	X			
03		1		2,0 * 10	X					X
04		1		46,0 * 10 ³		2			X	
05	-	0	76,0 * 10 ²			1		X		
06	-	0	1,0 * 10		x		X			
07	-	0	110,0 * 10		X			X		
08		1		72,0 * 10	x				X	
09		2		46,0 * 10	x				X	
11		1		67,0 * 10	x				X	
13		2		1,0 * 10	x					X
14		2		51,0 * 10	x				X	
15	-	0	80,0 * 10 ²			1	X			
16		1		31,0 * 10 ²		1			X	
17	-	0	6,0 * 10			2			X	
19	-	0	65,0 * 10		X			X		
21		3		87,0 * 10 ²		1			X	
23		1		6,0 * 10	x					X
24		1		169,0 * 10	X				X	
25		3		16,0 * 10	x					X
26	-	0	45,0 * 10		x		X			
27		1		172,0 * 10	x				X	
28		1		41,0 * 10	x				X	
29		3		107,0 * 10	X				X	
30		2		59,0 * 10	x				X	
31		1		8,0 * 10	X					X
33		2		61,0 * 10 ²		1			X	
34		2		12,0 * 10	x					X
35	-	0	14,0 * 10		X		X			
37		3		76,0 * 10	X				X	
39	-	0	6,0 * 10		X		X			
41		1		6,0 * 10	x					X
42		1		3,0 * 10	X					X
43	-	0	189,0 * 10		X			X		
45		2		72,0 * 10 ²		1			X	
46		3		146,0 * 10 ³		2			X	
50		1		51,0 * 10	X				X	
51		1		1,0 * 10	X					X
52	-	0	24,0 * 10		X		X			
53		3		45,0 * 10 ²		1			X	
56	-	0	98,0 * 10		X			X		
58		1		9,0 * 10	X		X			
59		2		19,0 * 10	X					X
60	-	0	3,0 * 10		X		X			
61	-	0	4,0 * 10		X		X			
Total	15	30					7	8	19	11

VN = verdadeiro negativo; FN = falso negativo; VP = verdadeiro positivo; FP = falso positivo.

Nos testes para diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* (esta última não cresce a 45° C nem em meio hipertônico), todas as amostras identificadas como *C. albicans* em CC e CCM mesmo as que se apresentaram com coloração verde-escuro (mais típica de *C. dubliniensis*), cresceram quando semeadas em ASD e incubadas à temperatura de 45° C em caldo Sabouraud, suplementado com 6,5% de NaCl, após leitura de até 96 horas.

O cálculo de sensibilidade para os dois meios cromogênicos (CC e CCA) apresentou os seguintes resultados expressos no quadro 5.3:

Meios Cromogênicos	Sensibilidade
CC	100 %
CCA	65 %

Quadro 5.3 – Sensibilidade dos meios cromogênicos CC e CA

O meio CC apresentou os índices de especificidade indicados na tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Especificidade do CC para espécies do gênero *Candida*

Espécie	Especificidade
<i>Candida albicans</i>	100%
<i>Candida tropicalis</i>	100%
<i>Candida glabrata</i>	100%
<i>Candida krusei</i>	100%
<i>Candida parapsilosis</i>	100%

O meio CCA apresentou os índices de especificidade indicados na tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Especificidade do CCA para espécies do gênero *Candida*

<i>Candida albicans</i>	52%
<i>Candida tropicalis</i>	52,9%
<i>Candida glabrata</i>	50%
<i>Candida krusei</i>	100%
<i>Candida parapsilosis</i>	50%

6 DISCUSSÃO

Aspectos Demográficos:

O perfil demográfico de nossa casuística (61 pacientes), refletiu quanto aos aspectos de gênero, idade e etnia, de maneira geral, o perfil dos pacientes atendidos tanto em nosso ambulatório de Estomatologia clínica, quanto no de Triagem: predomínio de pacientes de gênero feminino (77%), média de idade em torno da quinta década (59 anos) e etnia leucoderma (75%). Esses resultados são difíceis de comparar com a literatura, tendo em vista as especificidades regionais, principalmente quanto aos aspectos étnicos. Em relação ao gênero e faixa etária, nossos resultados evidenciam um sinal comum aos países em desenvolvimento, com relação à perda dentária, ou seja, encontramos aqui, pacientes desdentados em faixas etárias mais precoces. Embora nosso protocolo tenha admitido somente pacientes portadores de, pelo menos prótese total unimaxilar superior, a maior fração era composta de portadores de prótese total completa (33 – 61 – 54%). O perfil de nossa amostra mostrou-se semelhante quanto ao gênero, mas a literatura relata idades mais avançadas em relação ao uso de prótese total (Dorocka-Bobkowska et al., 2010; Sanitá et al., 2011). Com referência ao gênero, nossa amostra revelou um perfil de predomínio para o gênero feminino, como era de se esperar, pois a constituía a maioria de nossa amostra.

Dentre os aspectos relativos ao estado de saúde dos indivíduos e comorbidades, merecem destaque a hipertensão arterial e diabetes tipo II, doenças de alta morbidade e mortalidade universalmente, que em nossa amostra estavam presentes com, respectivamente 60% e 20% dentre os 49% dos pacientes que referiram alteração no estado de saúde. Aqui merecem destaque a afirmação de Dorocka-Bobkowska et al., 2010, que relatam discreto predomínio da diabetes no gênero feminino e um risco 1,82 maior de susceptibilidade a diabetes para os desdentados comparativamente aos dentados. Outra constatação em nossos resultados referiu-se a referência às dislipidemias em 8,2 % da amostra (terceira

comorbidade mais presente), que pode ser um indicador de tendência à hipertensão e diabetes.

Dentre os medicamentos mais utilizados e até em razão direta com as comorbidades presentes na amostra, os mais frequentes foram os anti-hipertensivos (51%), os hipoglicemiantes orais (17%) e os antilipídêmicos (14%), pontificando o uso concomitante de 2 a 7 medicamentos, com uso médio de 2,3 medicamentos/dia, considerando-se os 35 pacientes que referiram seu uso.

Aspectos relacionados à estomatite sob prótese

Para o presente estudo, com relação às variáveis clínicas para se estabelecer suspeita de estomatite sob prótese, foi considerada a classificação de Newton (1962). Do total dos 45 pacientes colonizados por espécies do gênero *Candida* (Tabela 5.7), 15 (33,4%) não apresentavam sinais clínicos de EP e foram classificados como da Classe 0. Dos 30 pacientes que apresentavam sinais clínicos de EP, houve predomínio de suspeitos de EP da Classe 1 (16 – 53,4%), seguidos de suspeitos da Classe 2 (8 – 26,6%) e suspeitos da Classe 3 (6 – 20%). Nossos resultados apresentaram valores maiores que os encontrados por Coco et al., (2008) para frequências de Classe 0 (31%); Classe 1 (33%); Classe 2 (25%) e Classe 3 (14%) respectivamente. Em termos de hierarquia das classes mais prevalentes, nossos resultados foram semelhantes aos desses autores. Embora muitos dos nossos pacientes apresentassem além de sinais clínicos de EP, sintomatologia relacionada a desconforto (principalmente prurido ou sensação de ardência na mucosa sob a prótese), nossos resultados não nos autorizam a concordar com Coco et al. (2008), quando afirmam ser a EP, uma doença altamente debilitante e que causa perda significativa de qualidade de vida em seus portadores.

Quando consideramos os sinais clínicos advindos dos 45 pacientes colonizados e admitindo o balizamento de 300 UFC/mL, situado nos limites inferiores dos propostos por Vazquez e Sobel em 2002 para diagnóstico de candidíase oral e abaixo do qual o indivíduo seria apenas portador, obtivemos entre os que apresentavam ausência de sinais clínicos (15 pacientes), 7 VN (46 %) e 8 FN (44%)

e entre os que apresentavam sinais clínicos (30 pacientes), 19 VP (63%) e 11 FP (37%). Embora não dispuséssemos de estudos para comparar com esses resultados em particular, na literatura a que tivemos acesso, julgamos serem subsídios importantes para o auxílio ao diagnóstico das candidíases orais em portadores de EP, levando-nos a pensar, que este é realmente difícil, pois pacientes com ausência de sinais clínicos podem apresentar colonização compatível com candidíase oral e, inversamente, pacientes com sinais clínicos, eventualmente exacerbados, podem ser, desse ponto de vista, apenas portadores, concordando com Robin e Lane (2003) e Costa e Candido (2007).

Levando-se em conta, que a cavidade oral é fonte importante de reinfecção, nos casos de candidíases, cuidados especiais deveriam ser tomados com relação aos portadores de próteses totais superiores, unimaxilares ou não, levando-nos por nossos resultados a concordar com Mojon (2002), Senpuku et al., (2003) e ressaltar o alerta de Krause et al. (1969), de que espécies de *Candida* residentes na cavidade oral podem causar sob determinadas condições, fungúria e fungemia, levando a quadros clínicos graves e de alta morbidade e mortalidade.

A frequência de espécies do gênero *Candida* em portadores de estomatite protética é bastante variável na literatura. Pires et al. (2002) relataram frequências entre 60% e 100%, com predominância de *C. albicans* (70%). Segundo Salerno et al., (2011), a variação está na faixa 60% a 65%, sendo *C. albicans* mais prevalente. Outras espécies também estão presentes em frequências variáveis. *Candida glabrata* e *C. tropicalis* representam de 5% a 8% dos isolados (Giannini; Shetty, 2011). No entanto, *C. albicans* continua sendo o principal patógeno, devido à sua capacidade de se manter e proliferar na cavidade oral produzindo um biofilme bacteriano complexo e heterogêneo (Salerno et al., 2011). Em nosso trabalho, as frequências de isolamento de espécies do gênero *Candida* em conjunto somaram 73,77%, igualmente com predominância de *C. Albicans* (84,4 a 84,6 %) tendo sido maior que a relatada por Salerno et al. (2011) e situada na ampla faixa citada por Pires et al., em 2002. Obtivemos *tropicalis* e *glabrata* em frequências maiores (33,3%; 17,7%) do que as encontradas por Giannini e Shetty em 2011. Além destas foram identificadas *C. Krusei* (2,2%) e *C. parapsilosis* (4,4%). Deve ser ressaltada a afirmação de Araujo et al (2005) e Murray et al. (2005) quanto ao estabelecimento de uma terapia antifúngica adequada, dependente da identificação rápida e precisa

das leveduras, tendo em vista a emergência de espécies (*glabrata* e *krusei*), as quais têm apresentado resistência a alguns imidazólicos.

Em relação ao fluxo salivar, Kadir et al. (2002) e Gasparoto et al. (2011) realçam a importância direta do fluxo salivar normal para uma boa resistência à infecção por leveduras do gênero *Candida*. Em nosso estudo, nenhum paciente referiu queixa de xerostomia, sendo que o fluxo salivar de nenhum deles foi compatível com hipossalivação, situando-se na média em 0,5 mL/minuto com o mínimo de 0,12 mL e o máximo de 1,0 mL por minuto.

CHROMagar Candida® x Candida Chromogenic Agar:

O meio CC (Odds; Bernaerts, 1994) é considerado o padrão-ouro na identificação presuntiva de espécies do gênero *Candida*. A literatura cita resultados de sensibilidade e especificidade superiores a 99% para *C. albicans* (Bernal et al., 1996; Silva et al., 2004; Peng et al., 2007; Rabelo et al., 2011). Em nosso estudo obtivemos resultados de 100% de sensibilidade e especificidade para todas as espécies isoladas, concordando com a literatura. O meio CCA apresentou resultados de sensibilidade e especificidade muito inferiores ao CC. A sensibilidade obtida foi 65% e a especificidade de 52 % para *C. albicans*; 52,9% para *C. tropicalis*; 50%; para *C. glabrata* e *parapsilosis*. Para *C. krusei*, ambos os meios foram 100% específicos. Não obtivemos parâmetros na literatura que pudemos consultar para comparação dos índices de especificidade.

O meio CCA recentemente lançado, não alcançou os resultados esperados, já que se os mesmos fossem semelhantes aos do meio CC, o seu custo mais baixo justificaria plenamente o seu emprego na prática clínica. Consideramos, entretanto, a utilização do meio CC imprescindível nos protocolos clínicos para manuseio das candidíases não importando as metodologias de uso corrente.

Considerações finais:

O exame micológico direto, exige conhecimentos especializados em micologia para a correta interpretação da espécie o que nos faz concordar com Robin e Lane (2003) e Terai e Shimanara (2009).

O exame citológico é sem dúvida, o exame complementar mais utilizado na prática estomatológica para subsidiar o diagnóstico clínico das candidíases em sua forma pseudo-membranosa, por evidenciar, segundo Lund et al. (2010) e Giannini e Shetty (2011) maior número de hifas da levedura. Somos de opinião, que o mesmo se presta, apenas para evidenciar a presença de filamentos e/ou formas unicelulares, que em conjunto com o clínico, levam ao diagnóstico de candidíase somente.

Quanto ao uso da biópsia, citado Robin e Lane (2003) e Giannini e Shetty, (2011), jamais deveria ser utilizado como exame complementar mandatório nas suspeitas de candidíase oral, primeiro, porque é desnecessário e invasivo não justificando, em nossa opinião o seu uso para esse fim específico. Hifas mortas podem sofrer, segundo Park et al (2005) e Dalle et al (2010), endocitose pela célula do hospedeiro nas fases precoces da infecção, sem porém, causar destruição tecidual. Queremos lembrar que a quantificação (UFC/mL) é, a nosso ver, muito importante para o diagnóstico das candidíases associadas à EP, visto que fatores ligados à irritação pela prótese inadequada podem mimetizar sinais clínicos de candidíases orais, principalmente as formas eritematosas comumente associadas à EP, segundo a afirmativa de Costa e Candido (2007), com a qual concordamos. Enfatizamos a importância da orientação quanto aos cuidados com a prótese e vida média útil, pois nossa amostra evidenciou uso médio maior do que os cinco anos recomendados em geral para as revisões (19,33 anos), além de estado da prótese incompatível com a referência ao número diário de higienizações referido (2,2 vezes ao dia, na média). Esses cuidados visariam minimizar os traumas que são fatores importantes na EP.

Em relação ao tratamento das candidíases associadas à presença de EP, a prática comum em Estomatologia é considerá-la por *C. albicans*. Nossos resultados evidenciaram, além de *C. albicans* (a mais freqüente), a presença de *C. tropicalis*, *C.*

glabrata; *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Lembramos aqui que, principalmente *C. glabrata* e *krusei*, têm apresentado, conforme relatam Araújo et al. (2005) e Murray et al. (2005) e, resistência a medicamentos.

7 CONCLUSÕES

O meio cromogênico CHROMagar *Candida* apresentou 100% de sensibilidade para isolamento de espécies do gênero *Candida*, tendo sido mais sensível do que o meio *Candida* Chromogenic Agar, que apresentou sensibilidade de 65%.

O meio cromogênico CHROMagar *Candida* apresentou especificidade maior do que o meio *Candida* Chromogenic Agar para o isolamento das espécies: *C. albicans* (100,% x 52%); *C. tropicalis* (100% x 52,9%); *C. glabrata* (100 % x 50%) e *C. parapsilosis* (100% x 50%).

Ambos os meios apresentaram a mesma especificidade (100%), para o isolamento da espécies, *C. krusei*.

REFERÊNCIAS¹

Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk M, Boyacioglu H. Determining *Candida* spp. Incidence in Denture Wearers. *Mycopathologia*. 2010;169:365–72.

Agarwal S, Manchanda V, Verma N, Bhalla P. Yeast identification in routine clinical microbiology laboratory and its clinical relevance. *Indian J Med Microbiol*. 2011 Apr-Jun;29(2):172-7.

Alves SH, Milan EP, Sant'ana PL, Oliveira LO, Santurio JM, Colombo AL. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;(43):85-6.

Araujo CR, Miranda KC, Passos XS, Souza LKH, Lemos JA, Khrais CHA, et al. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais, convencionais e pelo método cromógeno CHROMagar *Candida*. *Rev Patol Trop*. 2005 jan-abr;34(1):37-42.

Avon SL, Goulet JP, Deslauriers N. Removable acrylic resin disk as a sampling system for the study of denture biofilms in vivo. *J Prosthet Dent*. 2007 Jan;97(1):32-8.

Barnett JA. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast*. 2008;25:385–417.

Barraza DE, Martínez AD, Flores-Padilla L, Mendoza-De Elias R, Sánchez-Vargas LO. Comparison between conventional methods, ChromAgar *Candida*® and PCR method for the identification of *Candida* species in clinical isolates. *Rev Iberoam Micol*. 2011 Jan-Mar;28(1):36-42.

Bernal S, Mazuelos EM, García M, Aller AI, Martínez MA, Gutiérrez MJ. Evaluation of CHROMagar *Candida* medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1996 Apr;24(4):201-4.

Bishop JA, Chase N, Lee R, Kurtzman CP, Merz WG. Production of White Colonies on CHROMagar *Candida*™ by Members of the *Candida glabrata* Clade and Other Species with Overlapping Phenotypic Traits. *J Clin Microbiol*. 2008 Oct;46(10):3498-500.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Chandra J, Duncan MK, Murhejee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Develop, Architect, Drug Resist. 2001 sept;183(18):5385–94.

Christopher R, Pusateri CR, Monaco EA, Edgerton M. Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. Arch Oral Biol. 2009 Jun;54(6):588-94.

Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol. 2008 Oct; 23(5):377-83.

Costa KRC, Candido RC. Diagnóstico laboratorial da candidíase oral. News lab. 2007(83):138-45.

Costa KRC, Ferreira JC, Komesu MC, Candido RC. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. Mycopathologia. 2009 Feb;167(2):73-9.

Dalle F, Wächtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. Cell Microbiol. 2010 Feb;12(2):248-71.

Dorocka-Bobkowska B, Ziolkiewicz-Zozulinska D, Wierusz-Wysocka B, Hedzelek W, Szumala-Kakol A, Budtz-Jorgensen E. *Candida*-associated denture stomatitis in type 2 diabetes Mellitus. Diabetes Res Clinical Pract. 2010;90:81-6.

Emami E, Grandmont P, Rompré PH, Barbeau J, Pan S, Feine JS. Favoring Trauma as an Etiological Factor in Denture Stomatitis. J Dent Res. 2008;87:440-4.

Epstein JB, Stevenson-Moore P, Scully C. Management of xerostomia. J Canad Dent Assoc. 1992;58(2):140-3.

Farah CS, Lynch N, McCullough MJ. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. Aust Dent J. 2010 Jun;55 Suppl 1:48-54.

Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors – a large cohort. J Oral Rehabil. 2007;34:448–55.

Fotedar R, Hedaithy SS. Identification of chlamydospore-negative *Candida albicans* using CHROMagar medium. *Mycoses*. 2003 Apr;46(3-4):96-103.

Gasparoto TH, Sipert CR, Oliveira CE, Porto VC, Santos CF, Campanelli AP, et al. Salivary immunity in elderly individuals presented with candida-related denture stomatitis. *Gerodontology*. 2011; doi: 10.1111/j.1741-2358.2011.00476.x.

Gendreau L, Loewy Z. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *J Prosthodont Res*. 2011;20:251–60.

Giannini PJ, Shetty KV. Diagnosis and Management of Oral Candidiasis. *Otolaryngol Clin N Am*. 2011;44:231–40.

Guebur MI, Rapoport A, Sassi LM, Oliveira BV, Cervantes O, Ramos GHA, et al. Avaliação de perda de fluxo salivar total não estimulado durante a radioterapia em cabeça e pescoço. *Rev Bras Implant Prot*. 2006;13(50):57-61.

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 Jan;1:3-5.

Kadir T, Pisiriciler R, Akyüz S, Yarat A, Emekli N, Ipbüker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiological and systemic factors. *J Oral Rehabil*. 2002 May;29(5):452-7.

Kim TH, Park BR, Kim HR, Lee MK. *Candida dubliniensis* screening using the germ tube test in clinical yeast isolates and prevalence of *C. dubliniensis* in Korea. *J Clin Lab Anal*. 2010;24(3):145-8.

Koehler AO, Chu KC, Houang ET, Cheng AF. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 1999 Feb; 37(2):422-6.

Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Apr;17(2):255-67.

Krause W, Matheis H, Wulf K. Fungemia and funguria after oral administration of *Candida albicans*. *Lancet*. 1969;1:598-9.

Lund RG, et al. Occurrence, isolation and differentiation of *Candida* spp. and prevalence of variables associated to chronic atrophic candidiasis. *Mycoses*. 2010 May;53(3):232-8.

Lyon JP, Resende, MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Nov;102(5):632-8.

Macêdo DPC, Farias AMA, Neto RGL, Silva VKA, Leal AFG, Neves RP. Opportunistic yeast infections and enzymatic profile of the etiological agents. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009 mar-abr;42(2):188-91.

Madhavan, P, Jamal F, Chong PP, Ng K.P. Identification of local clinical *Candida* isolates using CHROMagar Candida™ as a primary identification method for various *Candida* species. *Trop Biomed*. 2011;28(2): 269–74.

Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. *Arch Oral Biol*. 2009 Feb;54(2):127-31.

Martin R, Wächtler B, Schaller MD, Hube B. Host-pathogen interactions and virulence associated genes during *Candida albicans* oral infections. *Int J Med Microbiol*. 2011;3010(5):417-22.

Mojon P. Oral Health and Respiratory Infection. *J Can Dent Assoc*. 2002;68(6):340-5.

Murray MP, Zinchuk R, Larone DH. CHROMagar Candida as the Sole Primary Medium for Isolation of Yeasts and as a Source Medium for the Rapid-Assimilation-of-Trehalose Test. *J Clin Microbiol*. 2005 Mar;43:1210–2.

Nadeem SG, Hakim ST, Kazmi SU. Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. *Libyan J Med*. 2010 Feb 9;5. doi: 10.3402/ljm.v5i0.2144.

Newton AV. Denture sore mouth: a possible aetiology. *Br Dent J*. 1962;1:357-60.

Noriyuki H, Mori H, Taguchi H, Taniguchi M, Aoki H, Sawada T, et al. Management of oral candidiasis in denture wearers. *J Prosthodont Res*. 2011 Jan;55(1):48-52.

Odds FC. *Candida* and candidosis. 2^a ed. London: Ballière Tyndall; 1988. 468 p.

Odds FC. *Candida* infections: an overview. *Crit Rev Microbiol*. 1987;15:1-5.

Odds F, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol*.1994;32:1923-9.

Okulicz JF, Rivard RG, Conger NG, Nguyen MX, Hospenthal DR. Primary isolation of *Candida* species from urine specimens using chromogenic medium. *Mycoses*. 2008 Mar;51(2):141-6.

Ozcan K, Ilkit M, Ates A, Turac-Bicer A, Demírhind H. Performance of Chromogenic *Candida* Agar and CHROMagar *Candida* in recovery and presumptive identification of monofungal and polyfungal vaginal isolates. *Medical Mycology*.2010Feb;48: 29–34.

Park YN, Morschhäuser J. *Candida albicans* MTL alpha tup1Delta mutants can reversibly switch to mating-competent, filamentous growth forms. *Mol Microbiol*. 2005 Dec;58(5):1288-302.

Peng CF, Lee KM, Lee SH. Characterization of Two Chromogenic Media of *Candida* ID2 and CHROMagar *Candida* for Preliminary Identification of Yeasts. *J Biomed Lab Sci*. 2007;19(2):63-9.

Pereira-Cenci T, Cury ADB, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci*. 2008;16(2):86-94.

Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol*. 1996 Jan;34(1):58-61.

Pincus DH, Orenga S, Chatellier S. Yeast identification - past, present, and future methods. *Med Mycol*. 2007 Mar;45(2):97-121.

Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 1998 Jul;36(7):2093-5.

Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil*. 2002 Nov;29(11):1115-9.

Rabelo GD, Noborikawa E, Siqueira CS, Silveira FRXS, Lotufo MA. Detection of single and mixed colonization of *Candida* species in patients with denture stomatitis. *Braz J Oral Sci*. 2011;10(3):184-18.

Ramage G, Tomsett K, Wickers BL, Ribot-Lopez J, Redding W. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;98:53-9.

Redding S, Bhatt B, Rawls HR, Siegel G, Scott K, Lopez-Ribot J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 May;107(5):669-72.

Robin F. Lane, DVM. Diagnostic testing for fungal diseases. *Vet Clin Exot Anim*. 2003;6:301–14.

Rörig KCO, Colacite J, Abegg MA. Production of virulence factor in vitro by pathogenic species of the genus *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009 mar-abr;42(2):225-7.

Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Mar;16(2):e139-43.

Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo RT, Silva MM, Oliveira EGM, Vergani CE. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Jun;111(6):726-33.

Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005 Nov;48(6):365-77.

Senpuku H, Sogameb A, Inoshitac E, Tsuhaa Y, Miyazakid H, Hanada N. Systemic Diseases in Association with Microbial Species in Oral Biofilm from Elderly Requiring Care. *Gerontol*. 2003;49:301–309.

Silva JO, Franceschini SO, Lavrador MAS, Candida RC. Performance of selective and differential media in the primary isolation of yeasts from different biological samples. *Mycopathologia*. 2004;157:29–36.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *Microbiol Rev*. 2011;1-18.

Sivakumar VG, Shankar P, Nalina K, Menon T. Use of CHROMagar in the differentiation of common species of *Candida*. *Mycopathologia*. 2009 Jan; 167(1):47-9.

Spolidorio DMP, Boriollo MFG, Estrela C, Spolidorio LC. Diferentes métodos fenotípicos para isolamento e identificação de espécies de *Candida*. *ROBRAC*. 2009;(18):18-26.

Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clean Microbiol*. 1998;36:329-34.

Ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res*. 2009 Feb;88(2):105-15.

Terai H, Shimanara M. Usefulness of culture test and direct examination for the diagnosis of oral atrophic candidiasis. *Int J Dermatol*. 2009;48:371–3.

Vazquez JA, Sobel JD. Mucosal candidiasis. *Infect Dis Clin N Am*. 2002;16:793–820.

Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect Immun*. 2007 May;75(5):2126-35.

Wächtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From Attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One*. 2011 Feb;6(2):e17046.

Whiteway M, Oberholzer U. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2004 Aug;7(4):350-7.

Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microbiol. 2011 Jan; 28;3:5771.

Williams DW, Potts AJC, Wilson MJ, Matthews JB, Lewis MAO. J Oral Pathol Med, 1997;26(2):83-9.

Zakikhany K, Naglik JR, Schmidt-Westhausen A, Holland G, Schaller M, Hube B. In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. Cell Microbiol. 2007 Dec;9(12):2938-54.

Zhu W, Filler SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. Cell Microbiol. 2010;12(3):273–82.

Apêndice A - Fluxograma de processamento das amostras coletadas

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: “Estudo comparativo de dois meios cromogênicos para identificação rápida de espécies do Gênero *Candida*, isoladas da mucosa oral de pacientes de ambulatório de Estomatologia Clínica”.

Pesquisadores responsáveis: CD Elisângela Noborikawa (Executora do projeto).

Prof. Dr. Fernando Ricardo Xavier da Silveira (Orientador).

Instituição/Departamento: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – Departamento de Estomatologia.

Telefone para contato: 11-30917803.

Prezado(a) Senhor(a):

- O Sr(a). está sendo convidado(a) a participar deste projeto de pesquisa de forma totalmente **voluntária**.
- Antes de concordar em participar desta pesquisa é muito importante que o Sr(a). compreenda as informações e instruções contidas neste documento.
- Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes que o Sr(a). se decidir a participar.
- O Sr(a). tem o direito de **desistir** de participar da pesquisa a qualquer momento, bem como, de solicitar a remoção de suas informações, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

Objetivo do estudo: Testar a eficiência de dois meios de cultura para identificação rápida de espécies de fungo do gênero *Candida*, para melhoria no tratamento dessa infecção.

Procedimentos.

A pesquisa consiste de três partes distintas, sendo a sua colaboração espontânea, caso o Sr(a). concorde, efetivada na **Primeira e Segunda** partes, que necessitarão apenas uma visita ao ambulatório de Estomatologia Clínica da FOU SP. As três etapas da pesquisa serão descritas a seguir, para que o Sr(a). tome ciência do teor do protocolo a ser desenvolvido:

Primeira parte: o Sr(a). será submetido (a) a um exame clínico igual ao exame pelo qual o Sr(a). passou ao ser matriculado na Disciplina de Estomatologia Clínica da FOU SP, que constará de entrevista (anamnese) e exame completo de sua cavidade oral (boca), realizado pela CD Elisângela Noborikawa, sendo os resultados anotados em ficha especialmente preparada para o presente projeto.

Segunda parte: Será coletado material de sua cavidade bucal, através de uma pequena escova, de haste longa, estéril, descartável, a qual será tirada da embalagem à sua vista e levemente pressionada e girada sobre a região mucosa palatina (céu da boca) em movimentos suaves ou de outro local de sua boca, no caso de se suspeitar que o Sr (a) possui uma infecção por esse fungo, denominada candidíase oral (conhecida como “sapinho”). Esse material será aplicado em duas placas de vidro (Placas de Petri), contendo dois meios especiais para crescimento de fungos pertencentes ao Gênero *Candida*, denominados “Chromagar Candida”, e “Candida Chromogenic Agar” que possibilitam a identificação de espécies desse fungo, caso eles estejam presentes em sua boca. A coleta poderá também ser executada, por meio de uma haste coletora com a ponta em forma de cotonete, estéril, a qual será retirada da embalagem à sua vista e levemente pressionada e girada sobre a sua mucosa bucal, em movimentos suaves. Esse material será aplicado às placas de vidro da mesma maneira. Após essa coleta, o (a) Sr. (a) será convidado (a) a depositar saliva em um tubo graduado, durante 15 minutos, após o que, será medida a quantidade de saliva que o(a) Sr(a). expele espontaneamente em mL/ minuto. Essa saliva será também utilizada para quantificação (contagem) das colônias de fungo, quando presentes, por mL de saliva, com o objetivo de determinar se o(a) Sr.(a). é portador ou não da infecção pelo fungo.

Terceira parte: As placas serão levadas para laboratório e incubadas, para posterior identificação da positividade ou não, para o fungo, bem como, da identificação da espécie. Em caso de positividade, serão aplicados testes laboratoriais para confirmar as espécies(s) identificadas.

Benefícios.

Os benefícios diretos para o Sr(a)., no caso de diagnóstico positivo para o fungo e para a infecção serão uma maior rapidez no diagnóstico da infecção, bem como no seu

tratamento, que poderá ser iniciado mais prontamente e efetuado com a prescrição de medicamentos mais eficientes e adequados.

Os benefícios indiretos para o Sr(a)., no caso de positividade para o fungo e negatividade para a infecção (no caso do Sr(a). ser apenas um(a) portador(a) do fungo), serão um melhor conhecimento sobre esse tipo de infecção e interação desse microrganismo com o ser humano, recebendo orientação especial para higienização correta de sua prótese (dentadura ou ponte móvel), para diminuir a presença do fungo em sua boca.

Riscos. A sua participação no presente projeto de pesquisa não representará qualquer risco de ordem física ou psicológica, não exigindo nenhum procedimento além dos que foram descritos na Primeira e Segunda partes da pesquisa.

Sigilo. As informações fornecidas pela participação do(a) Sr(a). serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Li e entendi perfeitamente o teor deste documento e concordo em participar voluntariamente deste projeto de pesquisa, e para tanto, firmo, nesta data, o presente documento que está emitido em duas vias de igual teor, uma das quais ficará em meu poder.

São Paulo, ____ de _____ de 20____.

Nome/assinatura/documento de identidade do voluntario

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR - 245438
Protocolo 11/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Estudo comparativo de dois meios cromogênicos para identificação rápida de espécies do Gênero Candida, isoladas da mucosa oral de pacientes de ambulatório estomatológico**", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Elisângela Noborikawa Ferreira, sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) Fernando Ricardo Xavier da Silveira.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 09 de junho de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO C – Ficha Clínica

Nº Atendimento:____		Data:____/____/____	
Gênero: ☐ F ☐ M		Idade:____	Etnia:____
		Profissão:____	Procedência: _____
Naturalidade: _____		Nacionalidade: Bras. ☐ Estrang. ☐	

Motivo da Consulta: ☐ Tratamento Odontológico ☐ Ambulatório de Estomatologia clínica

História da Doença Atual: _____

História Odonto-estomatológica _____

História Médica Pregressa: _____

História Médica Atual: _____

Antecedentes Familiais: _____

História dos Hábitos:

Fumante? NÃO ☐ SIM ☐ quant.diária _____ tempo _____

Alcool? NÃO ☐ SIM ☐ quant.diária _____ tempo _____ Ferm. ☐ Dest. ☐

Outros Hábitos: _____

Exame Físico Geral: _____

Exame Físico Intra-Bucal: _____

História de candidíase: nega: ☐ N/sabe ☐ bucal ☐ sistêmica ☐ recorrências ☐

tratamento: não ☐ sim ☐

Medicamentos utilizados:

Data da coleta Chromagar: __/__/__

Data da coleta Conda: __/__/__

Chromagar: __/__/__ N/Placa: __ Resultado: _____

Conda : __/__/__ N/Placa: __ Resultado _____

Coleta de saliva __/__/__ Fluxo salivar:_____

Suspeita clínica de Estomatite sob prótese: ☐ não ☐ sim

Suspeita clínica de Candidíase oral : ☐ não ☐ sim

Aspecto clínico: ☐ Eritematosa ☐ Pseudomembranosa ☐ Hiperplásica
☐ Aguda: ☐ Crônica

Sítio da coleta: _____

Paciente:

1 – portador de prótese total completa ☐

2 – portador de prótese total uni maxilar superior ☐

3 – dentado uni maxilar inferior ☐

4 – portador de prótese parcial removível inferior ☐

5 – portador de prótese parcial removível inferior ☐

6 – portador de prótese parcial fixa inferior ☐ Região (ões):_____

7 – portador de prótese parcial fixa inferior ☐ Região (ões):_____

Refere higienização da prótese Sim ☐ Não ☐ Se Sim, quantas vezes ao dia? ☐

Em caso de prescrição, indicar medicamento, forma de administração, dosagem, duração, data do início e do fim do tratamento, data da alta e tempo de seguimento para avaliação:_____

Dra. Elisângela Noborikawa, CD

ANEXO D – Ficha para o protocolo de identificação laboratorial (continua)

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

SEÇÃO DE MICOLOGIA

DIVISÃO DE LEVEDURAS

Procedência:

Registro:

Observações:

1. Exame direto:

2. Crescimento em meios usuais:

Crescimento em meios com ácido graxo:

3. Microcultivo e tubo germinativo:

PM: BL: AR: TG:

MV: CL: Outros:

4. Ascospores e ascóspores:

Positivos: Negativos:

5. Outras provas

- Síntese amido:

- Produção melanina:

- TTC;

6. Auxanograma

KNO₃:

PEP:

ANEXO D – Ficha para o protocolo de identificação laboratorial (continuação)

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

SEÇÃO DE MICOLOGIA

DIVISÃO DE LEVEDURAS

Glicose:

rafinose:

Inositol:

celobiose:

Sacarose:

melibiose:

Lactose:

trealose:

Dulcitol:

ramnose:

Maltose:

xilose:

6. Zimograma

Glicose:

Lactose:

Maltose:

Sacarose:

Trealose:

Rafinose:

Diagnóstico: