

## Identificação e perfil da candidíase oral por *Candida* em pacientes Brasileiros submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço e em pacientes com prótese total removível



<https://doi.org/10.56238/sevened2023.004-031>

### Mara Cristina Lopes Amorim

Mestre em Ciências da Estomatologia, Hospital da Polícia Militar de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.  
ORCID: 0009-0000-9404-663X

### Susana Johann

Professora Adjunta, Doutora em Microbiologia, Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.  
ORCID: 0000-0001-8068-1720

### Carlos Augusto Rosa

Professor Titular, Doutor em Microbiologia, Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.  
ORCID: 0000-0002-0151-114X

### Evandro Neves Abdo

Professor Adjunto, Doutor em Estomatologia, Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.  
ORCID: 0000-0002-8753-435X

### Vagner Rodrigues Santos

Professor Titular, Doutor em Patologia Oral, Laboratório de Microbiologia e Biomateriais, Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.  
ORCID: 0000-0002-5370-4867  
E-mail: vegneer2003@yahoo.com.br

### RESUMO

Introdução: A candidíase é a infecção fúngica oral mais comum em humanos, afetando principalmente

pacientes debilitados ou imunocomprometidos, como os irradiados para câncer de cabeça e pescoço. Objetivo: Identificação de espécies de *Candida* em pacientes irradiados de cabeça e pescoço e em portadores de prótese dentária total removível por três métodos microbiológicos. Material e Métodos: Foram coletadas amostras com swabs descartáveis estéreis de vinte e sete pacientes por meio de citologia esfoliativa. Os meios de Sabouraud contendo o inóculo foram deixados em ambiente aeróbio a 36°C durante 24 horas. Para tanto, leveduras foram levadas ao Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos para realização do respectivo teste de identificação de *Candida* com Candifast®, CHROMagar® e PCR E11®. Resultados: A candidose clínica pseudomembranosa foi mais prevalente no Grupo 1, enquanto a estomatite protética foi a forma clínica mais frequente no Grupo 2. Houve diferenças na identificação quando comparados os três métodos. Por outro lado, a PCR foi mais rápida e eficaz quando comparada com o CHROMagar, seguido pelo Candifast®. PCR (E11 e NLI/NL4) identificou no Grupo 1 como *C. albicans* (37,1%), *C. tropicalis* (55%), (7,4%) *C. krusei*. No Grupo 2 a PCR permitiu a identificação de 68% de *C. albicans*, 20% de *C. tropicalis*, 8% de *C. glabrata* e 4% de *C. parapsilosis*. Conclusão: O Kit Candifast® mostrou-se deficiente na identificação de várias espécies de *Candida*, quando comparado ao método de identificação molecular utilizado (PCR E11 e PCR NL1/NL4). O meio CHROMagar® *Candida* foi um bom método para a identificação presuntiva de espécies de *Candida*.

**Palavras-chave:** Radioterapia, Candidíase oral, Estomatite protética, Métodos microbiológicos, Identificação de *Candida*.



## 1 INTRODUÇÃO

A candidíase é a doença fúngica oral mais comum em humanos, podendo apresentar diversas manifestações clínicas bucais, muitas vezes dificultando o diagnóstico [1,2].

No passado, a candidíase era considerada apenas uma infecção oportunista, que acometia pacientes debilitados por outras doenças. Entretanto, hoje se sabe que a candidíase oral pode ocorrer em pessoas relativamente saudáveis como resultado de uma complexa interação entre hospedeiro e microrganismo [3,4].

Dentre as espécies conhecidas de *Candida*, a *Candida albicans* é a mais comum na boca e a mais citada em trabalhos científicos [5]. Entretanto, outras espécies estão sendo identificadas em pacientes com candidíase, o que atualmente justifica um maior interesse na pesquisa de outros microrganismos deste gênero. Os avanços da medicina têm levado à sobrevida prolongada de pacientes imunocomprometidos e à importância crescente das infecções fúngicas oportunistas [6,7]. *Candida* é a levedura oportunista mais comum e causa infecções graves caracterizadas por altas taxas de mortalidade. Os agentes antifúngicos são particularmente tóxicos para as células humanas e o uso de tais drogas deve obedecer a critérios rigorosos. Entretanto, uma terapia antifúngica precoce e agressiva que leve em consideração o agente etiológico envolvido pode melhorar o prognóstico dos pacientes infectados [8].

A candidíase oral é uma comorbidade comum associada à mucosite oral em pacientes com câncer e região irradiada de cabeça e pescoço. Complicações como mucosite oral, disgeusia, interrupção da alimentação e da fala e do tratamento oncológico são comorbidades observadas nesses pacientes [9]. A candidíase geralmente está associada à mucosite oral nesses pacientes, o que dificulta ainda mais o tratamento. A hipossalivação causada pela radioterapia facilita a colonização por espécies de *Candida* [10,11].

Devido ao fato de o tratamento instituído para esses pacientes nem sempre ser específico, há um aumento significativo na resistência das espécies de *Candida* aos antifúngicos presentes no mercado. Isso pode ser devido à instituição de um tratamento prolongado e à seleção incorreta de princípios ativos em relação à etiologia do agente da infecção, ou mesmo pela seleção de espécies ou cepas com resistência intrínseca às drogas utilizadas. Todo esse processo gera efeitos colaterais como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Portanto, é de extrema importância a identificação precisa das espécies de *Candida infectantes*, bem como o estabelecimento de protocolos específicos para o tratamento, pois conhecendo o microrganismo e sua suscetibilidade aos métodos antifúngicos o paciente pode ser tratado de forma mais eficaz e menos agressiva [12,13,14].

Estudos epidemiológicos relacionados à candidíase em pacientes com próteses são de grande importância para avaliar essa prevalência fúngica [15]. A correta identificação das espécies isoladas, a verificação dos fatores de virulência e a análise do perfil dos agentes de suscetibilidade dos



antifúngicos a esses microrganismos podem contribuir para o desenvolvimento de outras pesquisas controles e determinar uma nova proposta terapêutica para o tratamento da candidíase [16,17]. As técnicas laboratoriais convencionais para identificação de leveduras (cultura, características bioquímicas, fisiológicas e morfológicas) têm um longo tempo de liberação ("turnaroundtime"). Nessas condições, técnicas moleculares mais rápidas e sensíveis são de grande valia.

Nos últimos anos, surgiram alguns meios de cultura cromogênicos capazes de diferenciar a espécie *C. albicans* e outras leveduras de interesse clínico. Estes meios de cultivo para fungos são baseados na mudança de cor desenvolvida pelas colônias através de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromogênicos. O meio CHROMagar® *Candida* produzido pela Difco tem sido utilizado para isolar e identificar presumivelmente algumas espécies de *Candida* presentes na cavidade oral, incluindo *C. albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*. Este método baseia-se na utilização do substrato  $\beta$ -glucosaminidase e diferencia leveduras de acordo com a morfologia e cor das colônias. Seu uso facilita a detecção e identificação dessas leveduras e também proporciona resultados em menor tempo do que os obtidos pelos métodos tradicionais [18,19].

Testes bioquímicos para detecção de espécies de *Candida* e resistência de microrganismos a agentes antifúngicos, como o Candifast®, têm se mostrado úteis, práticos e eficazes, assim como técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O segredo do sucesso da PCR está na sua capacidade de amplificar uma sequência precisa de DNA aliada à sua simplicidade, acurácia, alta sensibilidade e especificidade [20].

O objetivo do presente estudo é identificar *espécies de Candida em pacientes brasileiros com neoplasias malignas irradiados de cabeça e pescoço e naqueles que fazem uso de próteses dentárias removíveis, utilizando meio de cultura CHROMagar® Candida, testes bioquímicos como Candifast® e testes moleculares como PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).*

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 UNIVERSO DE PACIENTES E AMOSTRA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG), com projeto número CAAE- 0561.0.203.438-11. Os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para autorizar a coleta das amostras.

Os pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço foram encaminhados por hospitais públicos e privados de Belo Horizonte e selecionados no Ambulatório de Atendimento Odontológico para Pacientes com Câncer e Irradiados na Região de Cabeça e Pescoço, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FOUFMG). Os pacientes com estomatite protética foram selecionados na Clínica de Prótese Removível e na Clínica de Patologia e Semiologia Odontológica da FOUFG. Após diagnóstico clínico sugestivo de candidíase, os pacientes foram submetidos a um



exame clínico inicial (basal) onde foram preenchidos formulários próprios do estudo com base nos prontuários das clínicas de Semiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG. Foram coletados dados de identificação e anamnese, realizados os exames objetivo geral e intraoral. Todas as informações do estudo foram confidenciais, e os nomes dos participantes, bem como fotos de seus rostos não foram divulgados.

## 2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo pacientes que apresentaram manifestações clínicas de candidíase, como presença de placas brancas removíveis, áreas eritematosas associadas ou não a próteses. Os pacientes irradiados de cabeça e pescoço incluídos na amostra estavam em tratamento radioterápico ou completado no prazo máximo de 6 meses (Critérios de inclusão). Pacientes que 1) não apresentaram candidose; 2) apresentaram manifestações clínicas de candidíase e não aceitaram a coleta intraoral ou não cumpriram o termo de consentimento; 3) não tinham condições físicas de realizar a coleta do material (raspagem de mucosa); 4) possuíam próteses e irradiação de cabeça e pescoço fizeram parte dos critérios de exclusão.

## 2.3 COLETA DE MICRORGANISMOS

O período de coleta da amostra foi de novembro de 2011 a abril de 2012. Foram coletadas amostras de todos os pacientes que aceitaram participar da pesquisa e apresentaram candidíase, qualquer que fosse o aspecto clínico da doença. As amostras foram do tipo "Conveniência" e não houve predileção por sexo, idade ou raça. A coleta do material foi feita por raspagem das mucosas/citologia esfoliativa com swab estéril e descartável, que foi colocado diretamente nas áreas onde havia presença de candidíase.

## 2.4 EXTRAÇÃO DE DNA DE LEVEDURA

Após a identificação presuntiva das leveduras usando CHROMagar® *Candida*, leveduras de diferentes morfotipos foram semeadas em ágar Sabouraud (cada morfotipo foi colocado em uma placa de Petri separada) para que colônias puras fossem obtidas. Assim, essas leveduras puras foram reavaliadas quanto ao morfotipo e levadas ao Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Departamento de Microbiologia - ICB/UFMG para extração do respectivo DNA. Após a extração do DNA das leveduras, as amostras foram levadas ao equipamento Nano Drop® para avaliação da qualidade das extrações.



## 2.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS: PCR-EI1

Para a diferenciação molecular de leveduras, foi utilizado o método de PCR conhecido como "fingerprint", utilizando o primer - "primer" EI1 (5'-CTGGCTTGTGTATGT-'), que tem complementaridade com os sítios de processamento do íntron. Cepas da mesma espécie apresentam perfis de amplificação semelhantes. Assim, após o agrupamento das espécies que se assemelhavam à PCR EI1, um representante de cada grupo foi enviado para sequenciamento de DNA através da PCR EI1. Quando o procedimento de PCR foi realizado para várias leveduras, uma mistura foi feita com reagentes de números 1 a 8 e após o preenchimento de cada eppendorf com a solução, o DNA foi adicionado por último e colocado na máquina de PCR para o início dos ciclos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X, diluído em tampão 6X e Gel Red por aproximadamente 1 hora a 120V. As bandas presentes no gel foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas em um sistema de fotodocumentação em gel (Vilber Lourmat, França). Os resultados da amplificação foram comparados com as amostras de referência (padrão 1 KB) que foram colocadas nos canais iniciais de cada gel do experimento [21,22].

## 2.6 SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO D1/D2 DA GRANDE SUBUNIDADE DO DNA RIBOSSOMAL

As cepas que apresentaram perfis de PCR diferentes das espécies mais comuns foram sequenciadas para confirmar a identificação molecular. O sequenciamento foi realizado na região D1/D2 da subunidade principal do DNA ribossomal utilizando os primers-"primer" NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-'). sequenciador automático MegaBacem 1000 (Amersham Biosciences, EUA) no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM-UFMG). As sequências foram editadas usando o programa DNAMAN (lynnon BioSoft, Vaudreuil, Québec). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas já depositadas no GenBank e analisadas utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) desenvolvido pelo National Center for Biotechnology. Os isolados que apresentaram as sequências analisadas com  $\geq 98\%$  de similaridade em relação às sequências já depositadas no GenBank foram considerados como pertencentes à mesma espécie ou gênero; Aqueles que apresentaram sequências com similaridade  $\leq 9\%$  foram considerados como pertencentes ao mesmo gênero [23].



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 INFORMAÇÕES DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES

A **Tabela 1** mostra as informações demográficas e a distribuição dos indivíduos. No Grupo 1, foram encontrados 13 pacientes do sexo masculino (86,7%) e 2 do sexo feminino (13,3%). Em relação ao Grupo 2, 9 pacientes eram do sexo feminino (75%) e 3 do sexo masculino (25%).

Tabela 1- Informações demográficas dos pacientes.

Grupo de Pacientes	Descrição do Grupo	Número	Gênero	Idade (Média/Anos)	Raça
Grupo 1	Irradiado em pacientes de cabeça e pescoço	15	M (13) 75% F (2) 25%	55-83 (63,2)	L: 30,7% F: 30,7% M: 38,5%
Grupo 2	Próteses Dentárias Removíveis	12	M (3) 33,3% F (9) 66,7%	54-73 (61,4)	L: 66,6% F: 22,2% M: 11,1%

Legenda: Gênero M= masculino, Gênero F= feminino; Raça: L= leucoderma/Branco, F= feoderma, M= melanoderma/Preto.

Nos pacientes do Grupo 2, o diagnóstico clínico seguiu padrões diferentes dos do Grupo 1. Neste grupo foram observadas apenas duas formas clínicas de candidíase: a estomatite protética esteve presente em 10 dos 12 pacientes analisados (83,3%) e a queilite angular foi identificada em 4 pacientes (33,3%). Em dois pacientes (16,6%), as duas formas foram encontradas simultaneamente. Do total de pacientes avaliados neste grupo, onze (91,6%) utilizavam prótese total removível e apenas um paciente (8,4%) utilizava prótese parcial removível. Esses dados estão descritos na Figura 1 e na Figura 2.

Considerando todos os locais, a língua foi o local mais acometido (7 pacientes, 46,6%), seguido pelo palato (40%), rebordo alveolar (26,6%), comissura bucal 26,6%, mucosa jugal (20%), assoalho bucal e orofaringe (ambos com 13,3%). Entretanto, em 4 pacientes (26,6%), houve acometimento simultâneo em vários locais ( $\geq 3$ ), ou seja, a candidíase ocorreu de forma generalizada. Em relação ao Grupo 2, os únicos locais com acometimento da lesão foram palato (83,3%) e comissura bucal (33,3%).

Figura 1: Aspectos clínicos da candidíase oral encontrados no Grupo 1 (n=15).

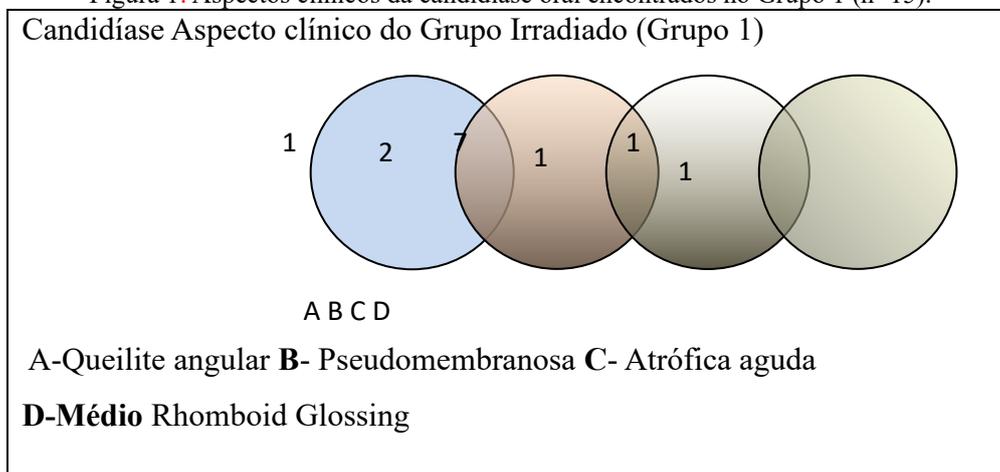
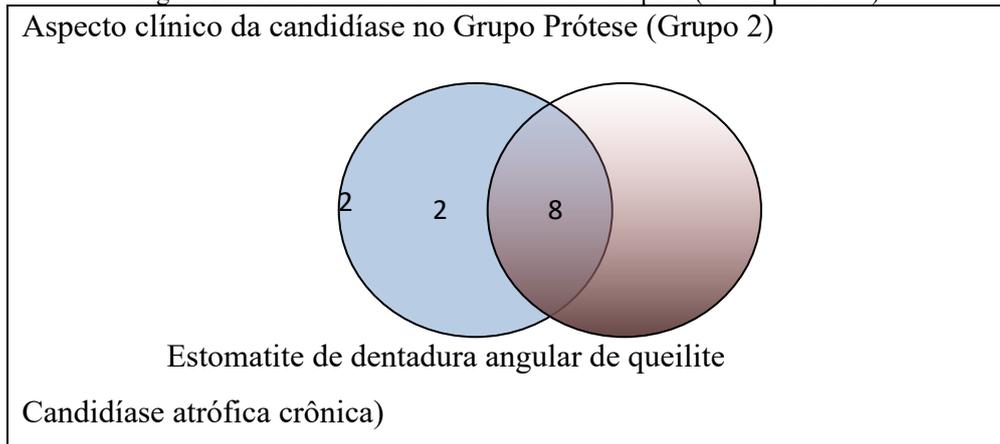




Figura 2: Formas clínicas de candidíase no Grupo 2 (n= 12 pacientes).



A identificação das amostras foi feita por três métodos: teste bioquímico (Candifast®), teste fisiológico com meio CHROMagar® *Candida* e PCR EI, para confirmar sua identificação através da biologia molecular.

### 3.2 TESTE DE IDENTIFICAÇÃO CANDIFAST®

No exame bioquímico, dos 15 pacientes do Grupo 1 (irradiados na região de cabeça e pescoço) foram obtidas 18 amostras inoculadas em ágar Sabouraud. Duas amostras foram obtidas em três pacientes (20%). As amostras I7 (língua) e I7.1 (palato) apresentaram diferentes formas clínicas de candidíase (Candidose Pseudomembranosa e Candidose Atrófica Aguda, respectivamente). As amostras I9 e I9A apresentaram a mesma forma clínica (Candidose Pseudomembranosa), porém a primeira acometeu a língua e a segunda a orofaringe. Em outro paciente avaliado (amostras I14 A e I14B), as colônias apresentaram morfotipos diferentes no ágar Sabouraud, sendo identificadas separadamente. Portanto, das 18 amostras identificadas, 7 (38,8%) foram identificadas como *C. albicans* e 7 (38,8%) como *C. tropicalis*. As outras quatro amostras foram identificadas como espécies distintas: uma como *C. krusei* (5,5%), uma como *C. lusitaniae* (5,5%), uma como *C. parapsilosis* (5,5%) e a última como *C. glabrata*.

Para o Grupo 2 (portadores de prótese), o exame bioquímico permitiu a identificação de um total de 14 amostras dos 12 pacientes avaliados. Em dois pacientes (16,6%) foi possível obter duas amostras, pois apresentavam dois tipos clínicos de candidose simultaneamente: estomatite protética no palato duro e queilite angular na comissura bucal. Nesses quatro isolados descritos (P2, P2.1, P3 e P3A), o kit Candifast® identificou *C. albicans*. As demais amostras também foram identificadas como *C. albicans* (100%).

### 3.3 TESTE DE IDENTIFICAÇÃO CHROMAGAR®

O meio CHROMagar® *Candida* permitiu a identificação presuntiva de três espécies de *Candida*: *C. albicans*, que apresenta coloração verde; *C. tropicalis* com coloração azul e *C. krusei* com



coloração rósea (Figuras 3A, 3B e 3C). Através do meio CHROMagar® *Candida*, foram isoladas 27 amostras do Grupo 1 (irradiadas) e 25 amostras do Grupo 2 (Suportes de Prótese). Das amostras testadas (n = 52), 25 (48%) foram identificadas como *C. albicans*, 18 (34,6%) como *C. tropicalis* e 4 (7,7%) como *C. krusei*. Entretanto, 5 amostras (9,7%) não puderam ser identificadas por esse método, pois as colônias não apresentavam as colorações descritas pelo fabricante - verde, azul ou rosa. Essas colônias apresentaram coloração rosa-branca, bege e arroxeadada, que não pôde ser identificada presuntivamente pelo meio CHROMagar® *Candida*.

Figura 3: Identificação presuntiva de *C. albicans* (A), *C. tropicalis* (B) e *C. krusei* (C). Método CHROMagar® *Candida*.



Considerando apenas o Grupo 1, 9 amostras (33,3%) foram identificadas como *C. albicans*, 14 (51,9%) como *C. tropicalis* e 2 (7,4%) como *C. krusei*. 2 amostras (7,4%) não foram identificadas por apresentarem outras colorações (branca e bege) não descritas pelo fabricante. Em relação ao Grupo 2, das 25 amostras isoladas por CHROMagar® *Candida*, 15 (60%) foram identificados como *C. albicans*, 4 (16%) como *C. tropicalis*, 2 (8%) como *C. krusei* e 3 (12%) não foram identificados.

Figura 4: Identificação presuntiva (Grupo 1=27 amostras) utilizando o Meio CHROMagar®.

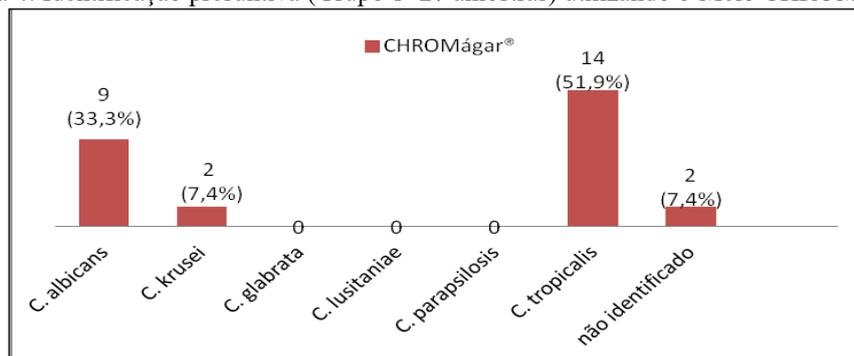
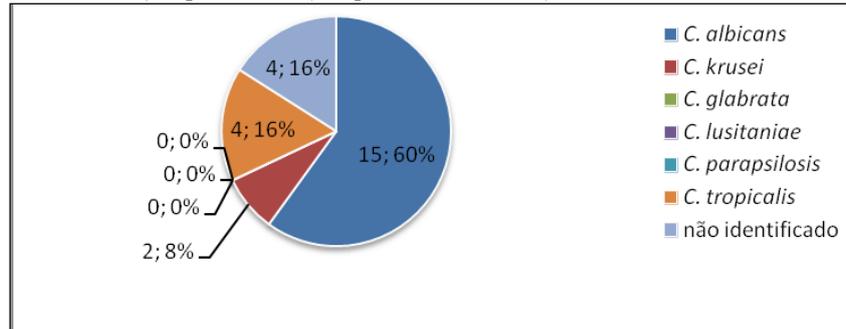




Figura 5: Identificação presuntiva (Grupo 2=25 amostras) utilizando o Meio CHROMagar®.

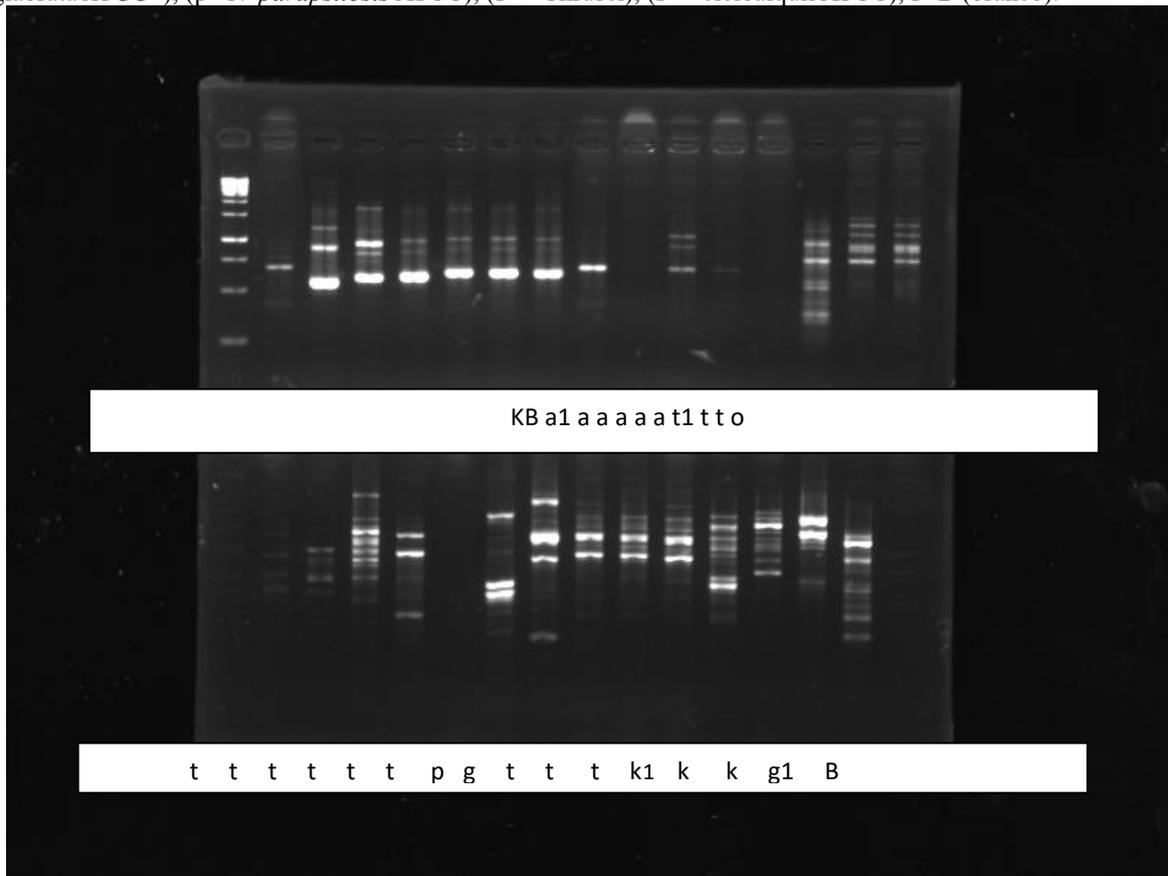


### 3.4 MÉTODO DE PCR POR IMPRESSÃO DIGITAL

Após a identificação das leveduras pelo método bioquímico e a identificação presuntiva do meio CHROMagar®, representantes de cada morfotipo foram selecionados para a confirmação da identificação, utilizando-se a técnica de DNA fingerprint com o primeiro EI1. Completados os ciclos de PCR, os produtos de cada amostra foram colocados em gel de agarose a 1,5% e analisados por eletroforese. Amostras que lembravam CHROMagar® foram colocadas lado a lado sobre os géis e as bandas foram coradas e fotografadas (Figura 6). Amostras idênticas em eletroforese foram consideradas da mesma espécie. Cada representante de cada grupo foi posteriormente sequenciado (região D1/D2 da subunidade principal do rDNA) para confirmar essa identidade comparando as sequências de nucleotídeos obtidas neste trabalho com outras sequências previamente depositadas no gene do banco. Foram utilizados dois softwares: Electropherogram Quality Analysis (Embrapa) e Blast (Basic Local Alignment Search Tool) que encontraram regiões de similaridade entre as sequências biológicas.

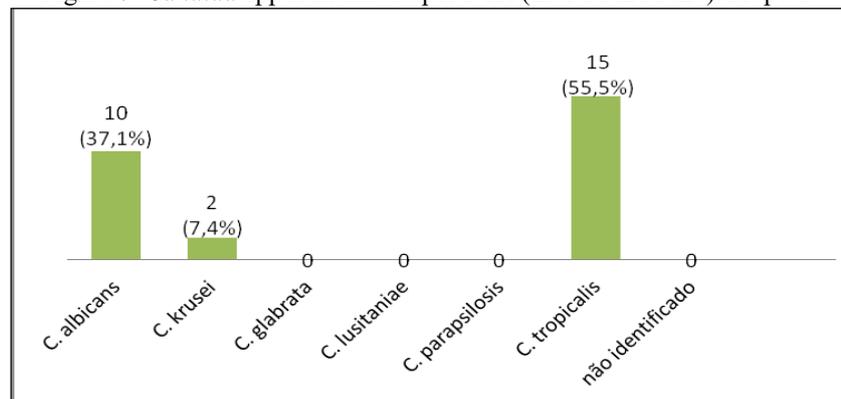


Figura 6: Amostras semelhantes em CHROMagar® *Candida* foram colocadas lado a lado para corrida em gel de agarose a 1,5%. (Padrão), (a- *C. albicans*), (a1- *C. albicans* ATCC), (t-*C. tropicalis*), (t1- *C. tropicalis* ATCC) (g- *C. glabrata*), (g1 - *C. glabrata* ATCC ), (p *C. parapsilosis* ATCC), (Î ± -Ckrusei), (Î ± -cicloalquil ATCC), Î²-B (branco).



Após identificação por PCR e confirmação por sequenciamento, o número de leveduras para o Grupo 1 (Irradiadas na região de cabeça e pescoço) foi: dos 27 isolados, 10 (37,1%) foram identificados como *C. albicans*, 15 (55,5%) como *C. tropicalis* e 2 (7,4%) como *C. krusei* (Figura 7). A PCR EI 1 não confirmou a identificação de *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* conforme determinado pelo Candifast® Kit e as 2 amostras que o meio CHROMagar® *Candida* não identificou eram, na verdade, *C. albicans* e *C. tropicalis*.

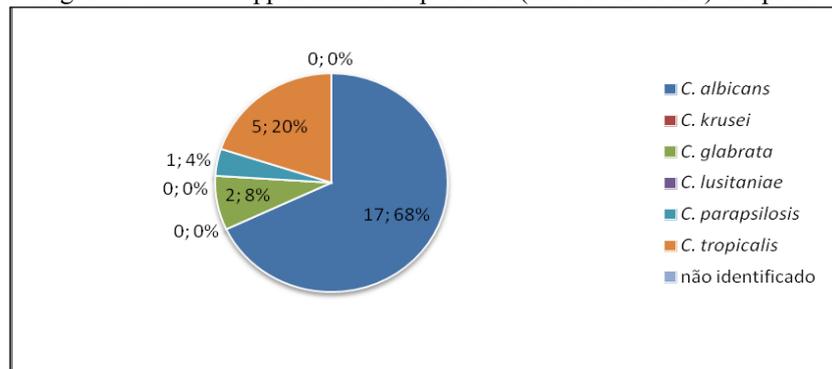
Figura 7: *Candida* spp identificada por PCR (EI 1 e NL1/NL4) Grupo 1.





No Grupo 2 (Portadores de Prótese), 25 leveduras foram isoladas e 17 (68%) das amostras foram identificadas como *C. albicans*, 5 (20%) como *C. tropicalis*, 2 (8%) como *C. glabrata* | e 1 (4%) como *C. parapsilosis*. A Figura 15 mostra os resultados descritos (Figura 8). Assim, o Kit Candifast® permitiu a identificação de 18 isolados de leveduras do Grupo 1 e 14 leveduras do Grupo 2. Pelos outros dois métodos de identificação, foi possível isolar um número maior de microrganismos, pois o CHROMagar® *Candida* permite uma melhor separação visual dos morfotipos, diferentemente do meio ágar Sabouraud, onde a distinção das leveduras é muito difícil.

Figura 8- *Candida* spp identificada por PCR (EI 1 e NL1/NL4) Grupo 2.



Portanto, ao comparar os três métodos de identificação utilizados neste estudo, observou-se que os resultados obtidos com o meio CHROMagar® *Candida* coincidiram em quase 100% com aqueles apresentados com a PCR EI1. No entanto, quando a PCR foi comparada com o kit Candifast®, houve divergências nos resultados nos 2 grupos. O kit identificou erroneamente algumas leveduras como *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* no Grupo 1, que não foram confirmadas pela PCR e em relação ao Grupo 2, Candifast® identificou apenas *C. albicans*, o que não foi confirmado pela PCR EI1, que identificou outras três espécies de leveduras: *C. tropicalis* (5 amostras), *C. glabrata* (2) e *C. parapsilosis* (1). Assim, no Grupo 1, 11 espécies (4 *C. albicans*, 6 *C. tropicalis* e 1 *C. krusei*) foram corretamente identificadas com Candifast® (61,8% de concordância com a PCR), enquanto no Grupo 2 foram encontrados 7 isolados de *C. albicans* (50% de concordância com a PCR).

#### 4 DISCUSSÃO

Este estudo permitiu a identificação das principais espécies de *Candida* que colonizam a boca por três métodos: os métodos bioquímicos Candifast® e meio CHROMagar® *Candida* e a identificação molecular por PCR EI 1 - NLI/NL4 PCR.

Vários estudos têm demonstrado que, durante a radioterapia, o número de espécies não-*albicans* aumenta significativamente, mas *C. albicans* ainda é a espécie mais prevalente [24,25,26]. O presente estudo não confirmou esses achados, demonstrando maior prevalência de *C. tropicalis* (55,5%) das amostras identificadas, seguida por *C. albicans* (37,1%) e *C. krusei* (7,4%). Esse aumento da



incidência pode ser atribuído à intensa radioterapia a que os pacientes são submetidos, à associação com quimioterapia ou aos métodos, por vezes variados, utilizados na identificação desses microrganismos por outros autores.

Em relação ao Grupo 2, 68% de *C. albicans* foram identificados, seguidos por 20% de *C. tropicalis*, 8% de *C. glabrata* e 4% de *C. parapsilosis*. Os resultados desta pesquisa estão de acordo com Oliveira e colaboradores [27] e Qiu e colaboradores [28], que encontraram maior prevalência de *C. albicans* em pacientes com prótese total, sendo o palato o local mais acometido pelas lesões. Em outro estudo [28,29], que teve como objetivo analisar a variabilidade genética de leveduras do gênero *Candida* na cavidade oral de usuários de prótese total e indivíduos controles, o autor também concluiu que *C. albicans* foi a mais encontrada. No entanto, ele cita que *C. glabrata* foi a segunda espécie mais prevalente, seguida por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Esses resultados diferem dos encontrados neste estudo. A Tabela 2 mostra os resultados comparativos da identificação das espécies pelos três métodos.

Tabela 2- Comparação de três métodos de identificação presuntiva para espécies de *Candida* clínicas orais nos pacientes do Grupo 1 e Grupo 2.

Microorganismos	Grupo 1			Grupo 2		
	Candifast (n=18)	Cromagar (n=27)	PcrEll (n=27)	Candifast (n=14)	Cromagar (n=25)	PcrEll (n=25)
	Número de casos diagnosticados			Número de casos diagnosticados		
<i>C. albicans</i>	7 (38.8%)	9 (33.3%)	10 (37.1%)	14 (100%)	15 (60%)	17 (68%)
<i>C. tropicalis</i>	7 (38.8%)	14 (51.9%)	15 (55.5%)		4 (16%)	5 (20%)
<i>C. krusei</i>	1 (5.5%)	2 (7.4%)	2 (7.4%)		2 (8%)	-
<i>C. lusitaniae</i>	1 (5.5%)	-	-		-	-
<i>C. parapsilosis</i>	1 (5.5%)	-	-		-	1 (4%)
<i>C. glabrata</i>	1 (5.5%)	-	-		-	1 (4%)
Não identificado		2 (7.4%)	-		3 (12%)	-

A identificação pelo meio CHROMagar® *Candida* coincidiu em quase 100% com o método de PCR. Isso mostra que a primeira pode ser usada para identificar três espécies de *Candida*: *C. albicans* (verde), *C. tropicalis* (azul) e *C. krusei* (rosa). É um método rápido e de fácil implementação, porém o custo deve ser considerado na escolha. Algumas colônias apresentaram pequenas alterações de coloração, que podem ter ocorrido devido a alterações metabólicas entre os isolados. A maioria dos autores concorda que outras espécies não puderam ser identificadas com este método, pois podem apresentar vários morfotipos e colorações não compatíveis com as descritas pelo fabricante [30,31,32].

Embora *C. dubliniensis* também possa apresentar coloração verde, MÄHNß e colaboradores [33] realizaram um estudo para diferenciação fenotípica entre as espécies de *C. albicans* e *C. dubliniensis* e não conseguiram criar uma maneira precisa de distingui-las usando CHOMagar® *Candida*, o que está de acordo com nossos resultados.

No presente estudo observou-se que as colônias de *Candida glabrata* apresentaram coloração rósea, com aspecto brilhante. Por ser uma colônia rosa, foi identificada por Candida® como *C. krusei*.



[18] estudaram a sensibilidade e especificidade do meio CHROMagar® *Candida* na identificação de leveduras orais e concluíram que *C. glabrata* também poderia ser identificada por este método e apresentava um morfotipo diferente de *C. krusei*: suas colônias eram convexas, mais puntiformes, com bordas regulares e coloração rósea mais escura. Eles não tinham o aspecto "seco" de um *C. krusei*. As espécies que não foram identificadas pelo CHROMagar® apresentaram coloração branca ou bege. Eles foram identificados por PCR como *C. albicans*, *C. tropicalis* ou *C. parapsilosis*. Estes últimos, segundo Madhvan et al [18] e Sampath et al [34] podem apresentar um grande número de cores e diferentes aspectos morfológicos.

O Kit Candifast® apresentou 50% de concordância com o método de PCR para o Grupo 2 e 61,8% de concordância para o Grupo 1. O fabricante citou um grau de concordância acima de 90% com outros métodos bioquímicos, porém não o compara com a PCR, que é o padrão-ouro na identificação de leveduras. Um aspecto negativo do teste que pode ser citado é a subjetividade na leitura dos resultados de Candifast®. O grau de turbidez do frasco de diluição é medido visualmente, bem como a leitura de cor nos poços. O fabricante elucida que as cores "amarelo-laranja", "amarelo" e "fúcsina" são "crescimento positivo" e "laranja avermelhado" é "crescimento negativo". O que pode ser apreciado é que essas cores muitas vezes se confundem. O meio ágar Sabouraud é a forma recomendada de utilização do Kit Candifast®. Devido ao fato de que este meio mais frequentemente não distinguiu os morfotipos de levedura, o número de isolados determinado pelo Kit Candifast® foi muito menor nos dois grupos em comparação com o meio CHROMagar® *Candida*. Utilizando o meio de ágar Sabouraud, foram identificadas 18 amostras no Grupo 1 e 14 amostras no Grupo 2. Para CHROMagar® *Candida*, 27 e 25 foram isolados, respectivamente. Assim, o método bioquímico permitiu a sub-identificação das leveduras e não foi eficiente na diferenciação das demais espécies testadas. Isso sugere a necessidade de reformulação da metodologia desse kit. Isso poderia ser feito substituindo o ágar Sabouraud na primeira etapa de identificação pelo meio CHROMagar® *Candida*. Assim, após a identificação dos diferentes morfotipos, essas amostras passariam a ser fortificadas em ágar Sabouraud e o processo de identificação seria continuado seguindo as etapas descritas pelo fabricante [19,35].

Vários autores citam a co-infecção em seus trabalhos e sua possível relação com o grau de virulência desses microrganismos [11,17,36]. Alguns pacientes testados neste estudo apresentaram coinfeção, onde foi possível detectar mais de uma espécie de *Candida* causadora da doença. No Grupo 1, a presença de duas espécies de *Candida* foi detectada em quatro pacientes, e a coinfeção *C. albicans*-*C. tropicalis* ocorreu em três pacientes e em um paciente *C. albicans*-*C. krusei*. No Grupo 2, a co-infecção ocorreu em cinco pacientes, sendo que em três pacientes as espécies *C. albicans* e *C. glabrata* estavam presentes simultaneamente, em um caso *C. albicans*-*C. parapsilosis* e *C. albicans*-*C. tropicalis*. Infecções por múltiplas espécies de *Candida* (co-infecções) podem ser consideradas uma



resposta à resistência de microrganismos aos diversos antifúngicos utilizados pelos pacientes. Em conclusão, *C. tropicalis* foi a espécie mais encontrada no Grupo 1 (Irradiada na região de cabeça e pescoço). A espécie *C. albicans* foi a mais comum no Grupo 2 (com próteses). O Kit Candifast® mostrou-se defeituoso na identificação de várias espécies de *Candida*, quando comparado ao método de identificação molecular utilizado (PCR EI1 e PCR NL1/NL4). O meio CHROMagar® *Candida* foi um bom método para a identificação presuntiva de espécies de *Candida*. Tem limitações quando as cores encontradas nas colônias diferem do verde, azul ou rosa.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Silvana Maria de Souza pelo suporte técnico no Laboratório de Microbiologia e Biomateriais.

### **DECLARAÇÃO CONCORRENTE**

Os autores declararam a inexistência de conflitos de interesse.

Comitê de Ética Aprovada número COEP/UFMG: CAAE- 0561.0.203.438-11.

### **DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO DO AUTOR**

Todos os autores contribuíram tanto na realização experimental quanto na assistência ao paciente, bem como na revisão do texto.

### **DECLARAÇÃO DE FINANCIAMENTO**

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

### **DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE DE DADOS**

As informações sobre os nomes e informações clínicas foram registradas e arquivadas na Faculdade de Odontologia da UFMG e não serão expostas para manter a privacidade de cada paciente. Todos os dados foram incluídos neste artigo.

### **DECLARAÇÃO DO AUTOR**

Os autores declaram sua concordância com a publicação desta obra como capítulo do livro SAÚDE e MEDICINA: Ciência, Cuidado e Descobertas, da Seven Publicações.



## REFERÊNCIAS

- Sav H, Altinbas R, Dursun ZB. Fungal profile and antifungal susceptibility pattern in patients with oral candidiasis. *Infez Med.* 2020; 28:392-396.
- Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *J Fungi (Basel).* 2020; 6:15. doi: 10.3390/jof6010015.
- Sholapurkar AA, Pai KM, Rao S. Comparison of efficacy of fluconazole mouthrinse and clotrimazole mouthpaint in the treatment of oral candidiasis. *Austral Dent J.* 2009; 54:341-346.
- Pereira IF, Firmino RT, Meira HC, Vasconcelos BCE, Noronha VRAS, Santos VR. Osteoradionecrosis prevalence and associated factors. A ten years retrospective study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2018; doi: 10.4317/medoral22310
- Hertel M, Schmidt-Westhausen AM, Strietzel FP. Local, systemic, demographic, and health-related factors influencing pathogenic yeast spectrum and antifungal drug administration frequency in oral candidiasis: a retrospective study. *Clin Oral Investig.* 2016; 20:1477-86. doi: 10.1007/s00784-015-1631-0.
- Freitas VAQ, Santos AS, Zara ALSA, Costa CR, Godoy CSM, Soares RBA, Ataídes FS, Silva MDRR. Distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida* species isolated from people living with HIV/AIDS in a public hospital in Goiânia, GO, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2023; 54:125-133. doi: 10.1007/s42770-022-00851-w.
- Monsen RE, Kristoffersen AK, Gay CL, Herlofson BB, Fjeld KG, Hove LH, Nordgarden H, Tollisen A, Lerdal A, Enersen M. Identification and susceptibility testing of oral candidiasis in advanced cancer patients. *BMC Oral Health.* 2023; 23:223. doi: 10.1186/s12903-023-02950-y.
- Khedri S, Santos ALS, Roudbary M, Hadighi R, Falahati M, Farahyar S, Khoshmirsafa M, Kalantari S. Iranian HIV/AIDS patients with oropharyngeal candidiasis: identification, prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* species. *Lett Appl Microbiol.* 2018; 67:392-399. doi: 10.1111/lam.13052.
- Tarapan S, Matangkasombut O, Trachootham D, Sattabanasuk V, Talungchit S, Paemuang W, Phonyiam T, Chokchaitam O, Mungkung OO, Lam-Ubol A. Oral *Candida* colonization in xerostomic postradiotherapy head and neck cancer patients. *Oral Dis.* 2019; 25:1798-1808. doi: 10.1111/odi.13151.
- Noronha VR, Araujo GS, Gomes RT, Iwanaga SH, Barbosa MC, Abdo EN, Ferreira e Ferreira E, Viana Campos AC, Souza AA, Abreu SR, Santos VR. Mucoadhesive propolis gel for prevention of radiation-induced oral mucositis. *Curr Clin Pharmacol.* 2014; 9:359-64. doi: 10.2174/1574884709666140205210051.
- Mäkinen AI, Mäkitie A, Meurman JH. *Candida* prevalence in saliva before and after oral cancer treatment. *Surgeon.* 2021;19:e446-e451. doi: 10.1016/j.surge.2021.01.006.
- Soysa SN, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Cytotoxic drugs, radiotherapy and oral candidiasis. *Oral Oncol.* 2004; 40:971-978.
- Gabler IG, Barbosa AC, Velela RR, Lyon S, Rosa CA. Incidence and anatomic localization of oral candidiasis in patients with AIDS hospitalized in a public hospital in Belo Horizonte, MG, Brazil. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16:247-50. doi: 10.1590/s1678-77572008000400004.



Hu L, He C, Zhao C, Chen X, Hua H, Yan Z. Characterization of oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases. *Microb Pathog.* 2019; 134:103575. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103575.

Qiu J, Roza MP, Colli KG, Dalben YR, Maifrede SB, Valiatti TB, Novo VM, Cayô R, Grão-Velloso TR, Gonçalves SS. *Candida*-associated denture stomatitis: clinical, epidemiological, and microbiological features. *Braz J Microbiol.* 2023; 54:841-848. doi: 10.1007/s42770-023-00952-0.

Martins RS, Péreira ES Jr, Lima SM, Senna MI, Mesquita RA, Santos VR. Effect of commercial ethanol propolis extract on the *in vitro* growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J Oral Sci.* 2002; 44:41-8. doi: 10.2334/josnusd.44.41.

Nagaral S, Desai RG, Kamble V, Patil AK. Isolation of *Candida* species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers. *J Contemp Dent Pract.* 2014; 15:712-6. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1604.

Madhavan P, Jamal F, Chong PP, Chong KP. Identification of local clinical *Candida* isolates using Micro-organism *Candida* TM as a primary identification method for various *Candida* species. *Trop Biomed.* 2011; 28:269-274.

Wohlmeister D, Vianna DRB, Helfer VE, Calil LN, Buffon A, Fuentefria AM, Corbellini VA, Pilger DA. Differentiation of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei* by FT-IR and chemometrics by CHROMagar™ *Candida*. *J Microbiol Methods.* 2017; 141:121-125. doi: 10.1016/j.mimet.2017.08.013.

Giri S, Kindo AJ. Evaluation of antifungal susceptibility testing in *Candida* isolates by Candifast and disk-diffusion method. *Indian J Pathol Microbiol.* 2014; 57:595-7. doi: 10.4103/0377-4929.142680.

Meyer W, Latouche GN, Daniel HM, Thanos M, Mitchell TG, Yarrow D, Schönian G, Sorrell TC. Identification of pathogenic yeasts of the imperfect genus *Candida* by polymerase chain reaction fingerprinting. *Electrophoresis.* 1997;18:1548-59.

Lasserre JP, Plissonneau J, Velours C, Bonneu M, Litvak S, Laquel P, Castroviejo M. Biochemical, cellular and molecular identification of DNA polymerase  $\alpha$  in yeast mitochondria. *Biochimie.* 2013; 95:759-71. doi: 10.1016/j.biochi.2012.11.003.

Rosa CA, Jindamorakot S, Limtong S, Nakase T, Pagnocca FC, Lachance MA. *Candida golubevii* sp. nov., an asexual yeast related to *Metschnikowia lunata*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010; 60:704-706. doi: 10.1099/ijs.0.014050-0.

Belazi M, Velegraki A, Koussidou-Eremonde T, Andreadis D, Hini S, Arsenis G. et al. Oral *Candida* isolates in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer: prevalence, azole susceptibility profiles and response to antifungal treatment. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19:347-351.

Jham BC, França EC, Oliveira RR, Santos VR, Kowalski MD, Freire ARS. *Candida* oral colonization and infection in Brazilian patients undergoing head and neck radiotherapy: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 ; 103: 355-358.

Chevalier M, Ranque S, Prêcheur I. Oral fungal-bacterial biofilm models *in vitro*: a review. *Med Mycol.* 2018; 56:653-667. doi: 10.1093/mmy/myx111.



Oliveira CE, Porto VC. *Candida albicans* and denture stomatitis: evaluation of its presence in the lesion, prosthesis, and blood. *Int J Prosthodont*. 2010; 23:158-159.

Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, Guida A, Petruzzi M, Serpico R. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16:e139-43. doi: 10.4317/medoral.16.e139.

Jahanshiri Z, Manifar S, Moosa H, Asghari-Paskiabi F, Mahmoodzadeh H, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients in Iran: Species identification, antifungal susceptibility and pathogenic characterization. *J Mycol Med*. 2018;28:361-366. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.01.001.

Pasligh J, Radecke C, Leischacker M, Ruhnke M. Comparison of Phenotypic Methods for the Identification of *Candida dubliniensis*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010; 43:147-154.

Aubertine C, Rivera M, Rohan SM, Larone DH. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification versus the older fluorometric card and of microorganism *Candida* as a source medium with the new card. *J. Clin. Microbiol*. 2006; 44:227-228.

Liguori G, Di Onofrio V, Lucariello A, Gallé F, Signoriello G, Colella G, D'Amora M, Rossano F. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24:76-8. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00447x.

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

Sampath A, Weerasekera M, Gunasekara C, Dilhari A, Bulugahapitiya U, Fernando N. A sensitive and a rapid multiplex polymerase chain reaction for the identification of *Candida* species in concentrated oral rinse specimens in patients with diabetes. *Acta Odontol Scand*. 2017; 75:113-122. doi: 10.1080/00016357.2016.1265146.

Hato H, Sakata KI, Sato J, Hasebe A, Yamazaki Y, Kitagawa Y. Factor associated with oral candidiasis caused by co-infection of *Candida albicans* and *Candida glabrata*: A retrospective study. *J Dent Sci*. 2022;17:1458-1461. doi: 10.1016/j.jds.2021.10.020.

Wise MG, Healy M, Reece K, Smith R, Walton D, Dutch W, Renwick A, Huong J, Young S, Tarrand J, Kontoyiannis DP. Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. *J Med Microbiol*. 2007; 56:778-87.