

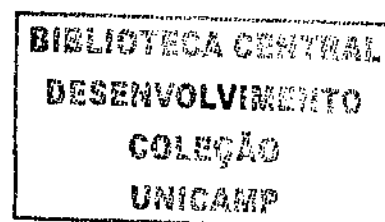
MÔNICA LEAL ALCURE

*CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE COLONIZAÇÃO ORAL POR  
Candida spp. EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE  
DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS NO  
HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNICAMP.*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do grau de Doutor em  
Estomatopatologia, Área de Patologia.

PIRACICABA

2006



MÔNICA LEAL ALCURE

*CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE COLONIZAÇÃO ORAL POR  
Candida spp. EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE  
DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS NO  
HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNICAMP.*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Doutor em Estomatopatologia, Área de Patologia.

*Orientador:* Prof. Dr. Oswaldo Di Hipólito Júnior  
*Co-orientador:* Prof. Dr. Plínio Trabasso

*Banca examinadora:*

Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber  
Prof. Dr. Afonso Celso Vigorito  
Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior  
Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes  
Prof. Dr. Oswaldo Di Hipólito Júnior

PIRACICABA

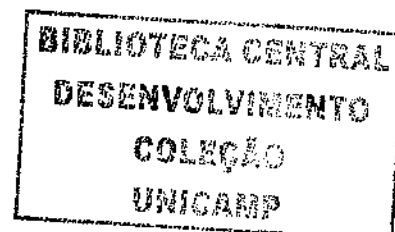
2006

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a resolução CCPG 036/83.

CPG, 13.09.06

Assinatura do Orientador

iii



UNIDADE BC  
Nº CHAMADA STUNICAMP  
AL19c  
V        EX         
TOMBO BC/ 70364  
PROC 16.12356  
C        D X  
PREÇO 11,00  
DATA 16/10/06  
Nº CPD       

Bib ID 389378

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

AL19c Alcure, Mônica Leal.  
Caracterização do perfil de colonização oral por *Candida spp.* em pacientes submetidos a transplante de células progenitoras hematopoiéticas no Hospital de Clínicas da UNICAMP. / Mônica Leal Alcure. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.

Orientadores: Oswaldo Di Hipólito Júnior, Plínio Trabasso.  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Antimicóticos. 2. Cariotipagem. 3. Saliva. I. Di Hipólito Júnior, Oswaldo. II. Trabasso, Plínio. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.  
(mg/fop)

Título em Inglês: Characterization of *Candida* oral colonization in Hematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT) patients of the UNICAMP

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Antifungal agents. 2. Karyotyping. 3. Saliva

Área de Concentração: Patologia Bucal

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Angélica Zaninelli Schreiber, Afonso Celso Vigorito, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oswaldo Di Hipólito Júnior

Data da Defesa: 29-06-2006

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 29 de Junho de 2006, considerou a candidata MÔNICA LEAL ALCURE aprovada.

PROF. DR. OSWALDO DI HIPOLITO JUNIOR

PROF. DR. AFONSO CELSO VIGORITO

PROFa. DRa. ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

PROF. DR. JACKS JORGE JUNIOR

PROF. DR. MARCIO AJUDARTE LOPES

2006 251 23

Dedico este trabalho à minha família, exemplo de fé, caridade, determinação, força e trabalho, que ao me dar raízes e asas me guia pela vida.

AMO VOCÊS!

*“O benefício da alma não está em muito pensar, e sim em muito amar.”*

Santa Teresa de Jesus

Agradeço à Santíssima Trindade pela luz e conforto no meu caminho.

*Tudo tem seu tempo.*

*Há um momento oportuno para cada coisa debaixo do céu:*

*tempo de nascer e tempo de morrer;*

*tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou;*

*tempo de matar e tempo de curar;*

*tempo de destruir e tempo de construir;*

*tempo de chorar e tempo de rir;*

*tempo de lamentar e tempo de dançar;*

*tempo de espalhar pedras e tempo de as ajuntar;*

*tempo de abraçar o tempo e de se afastar dos abraços;*

*tempo de procurar e tempo de perder;*

*tempo de guardar e tempo de jogar fora;*

*tempo de rasgar e tempo de costurar;*

*tempo de calar e tempo de falar;*

*tempo do amor e tempo do ódio;*

*tempo da guerra e tempo da paz.*

Eclesiastes 3, 1-8.

## **Agradeço de modo especial**

Aos pacientes que fizeram parte deste estudo.

Ao Prof. Dr. **Oswaldo Di Hipólito Júnior** e ao Prof. Dr. **Plínio Trabasso** pela orientação e confiança no meu trabalho.

À Profa. Dra. **Maria Elvira Pizzigatti Corrêa** pela amizade e orientação.

À Profa. Dra. **Maria Luiza Moretti** pelo indispensável apoio.

Ao Prof. Dr. **Márcio Ajudarte Lopes** pela orientação clínica e científica.

## **Agradeço**

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor, o Prof. Dr. **Thales Rocha de Mattos Filho**.

Ao Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**, coordenador dos programas de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Ao Prof. Dr. **Jacks Jorge Júnior**, coordenador do programa de pós-graduação em Estomatopatologia.

À Associação Educacional de Vitória, na pessoa do diretor geral das faculdades do sistema FAESA, Dr. **Alexandre Nunes Theodoro**, e na pessoa da vice-diretora, Profa. Dra. **Eliete Rabbi Bortilini**.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do curso de pós-graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, **Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Agustin Vargas e Ricardo Della Colleta**.

Aos funcionários das Áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia da UNICAMP, **Adriano Luis Martins, Ana Cristina do Amaral Godoy, Aparecida Conceição Campion, Débora Cristina Gazzola, Elisabete Mirian de Carvalho Correa, João Carlos Gomes da Silva Júnior, Rogério de Andrade Elias, Rosa Maria Fornasiari, Rosa Maria Scalco** e ao estagiário **Mateus Marchi**.



Aos amigos do curso de pós-graduação em Estomatologia, em especial **Patrícia Gemma Strappa Abrahão, Lília Alves Rocha, Ademar Takahama Júnior, Jorge Esquiche Leon, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, Fábio Ornellas Prado, Fábio Augusto Ito, Cláudio Maranhão Pereira, Paulo Rogério Ferreti Bonan e Danyel Elias da Cruz Perez.**

Às técnicas do Laboratório de Epidemiologia Molecular de Fungos e Bactérias da UNICAMP, **Márcia Maria Pedroso e Éri van Olinda Ribeiro** e aos alunos **Dulcinéia Blum Menezes, Ana Cecília Natrini Delgado, Rogério Kuboyama, Ana Beatriz Alckimin Teixeira, Orlando José Bratfich, Maria Sileuda Moreira de Oliveira e Fernanda Simas.**

Ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica da UNICAMP, em especial à Profa. Dra. **Angélica Zanineli Schreiber** e aos técnicos **Luzia Lyra e Edson Aparecido da Luz.**

Aos médicos do setor de Hematologia e de Transplante de Medula Óssea da UNICAMP, **Dr. Cármino Antônio de Souza, Dr. Afonso Celso Vigorito, Dra. Kátia Aparecido Brito Eid e Dra. Gislaine Borba Oliveira** e aos residentes **Ellen Mitter Carnevalli, Bruno Araújo de Lima França e Fabrício Bís caro Pereira.**

Aos funcionários do HEMOCENTRO-UNICAMP, em especial **Roberto Zulli e Nicete Romano.**

À equipe de Enfermagem da Unidade de Transplante de Medula Óssea da UNICAMP.

À equipe do Ambulatório de pós TMO e Transfusão do HEMOCENTRO-UNICAMP.

Aos estagiários do ambulatório de Odontologia do HEMOCENTRO-UNICAMP em especial **Fábio Luiz Coracin**.

Ao **Gabriel Coelho Gonçalves de Abreu** pela análise estatística.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

À Dona **Marlene de Oliveira Rasera** e família.

Às amigas de moradia, em especial **Márcia Mika Nakaoka** e **Luana Fischer**.

Aos amigos **Elenice Moreira Lemos**, **Karina Giuberti**, **Liliana Aparecida Pimenta de Barros**, **Fabiola Ribeiro**, **Patrícia Rocon Bianchi**, **Gabriel Rocon Bianchi**, **Cristiane Rosati**, **Ruth Nascimento Nobre**, **Rosannee Ramos** e **Ana Carla Robatto Nunes** pelo apoio durante a conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....                                      | 1  |
| LISTA DE TABELAS E FIGURAS .....                                          | 3  |
| RESUMO .....                                                              | 7  |
| ABSTRACT .....                                                            | 9  |
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                         | 11 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA.....                                              | 13 |
| 3 PROPOSIÇÃO .....                                                        | 25 |
| 4 PACIENTES E MÉTODOS.....                                                | 27 |
| 4.1 População e local do estudo.....                                      | 27 |
| 4.2 Exame físico oral .....                                               | 28 |
| 4.3 Coleta das amostras .....                                             | 28 |
| 4.4 Processamento das amostras.....                                       | 29 |
| 4.5 Quantificação de leveduras.....                                       | 30 |
| 4.6 Identificação de leveduras .....                                      | 30 |
| 4.6.1 Análise do crescimento em meio cromogênico.....                     | 30 |
| 4.6.2 Formação do tubo germinativo.....                                   | 31 |
| 4.6.3 Análise micromorfológica (microcultivo).....                        | 31 |
| 4.6.4 Identificação de leveduras utilizando cartões YBC do VITEK® .....   | 31 |
| 4.6.5 Análise do crescimento a 42°C.....                                  | 32 |
| 4.6.6 Prova de assimilação da xilose .....                                | 32 |
| 4.7 Teste de susceptibilidade a antifúngicos .....                        | 33 |
| 4.7.1 Antifúngicos.....                                                   | 33 |
| 4.7.2 Solução estoque .....                                               | 33 |
| 4.7.3 Meio de cultura.....                                                | 34 |
| 4.7.4 Preparo do inóculo.....                                             | 34 |
| 4.7.5 Preparo da placa de microdiluição.....                              | 34 |
| 4.7.6 Análise dos resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM)..... | 35 |

|       |                                                           |     |
|-------|-----------------------------------------------------------|-----|
| 4.8   | Cariotipagem eletroforética .....                         | 36  |
| 4.8.1 | Extração do DNA .....                                     | 36  |
| 4.8.2 | Eletroforese em campo pulsátil (PFGE).....                | 37  |
| 4.8.3 | Análise do cariótipo.....                                 | 37  |
| 4.9   | Análise estatística .....                                 | 38  |
| 5     | RESULTADOS .....                                          | 39  |
| 5.1   | Características demográficas e clínicas .....             | 39  |
| 5.2   | Condição oral.....                                        | 43  |
| 5.3   | Coletas .....                                             | 45  |
| 5.4   | Fluxo salivar .....                                       | 46  |
| 5.5   | Colonização da cavidade oral por <i>Candida</i> spp. .... | 48  |
| 5.5.1 | Espécies de <i>Candida</i> identificadas .....            | 51  |
| 5.6   | Susceptibilidade antifúngica.....                         | 54  |
| 5.6.1 | Pacientes submetidos a TCPH Alogênico .....               | 54  |
| 5.6.2 | Pacientes submetidos a TCPH Autólogo.....                 | 59  |
| 5.7   | Cariotipagem eletroforética .....                         | 62  |
| 5.8   | Presença de candidose oral .....                          | 67  |
| 6     | DISCUSSÃO .....                                           | 71  |
| 7     | CONCLUSÕES .....                                          | 85  |
|       | REFERÊNCIAS .....                                         | 87  |
|       | ANEXOS .....                                              | 99  |
|       | Anexo 1 .....                                             | 99  |
|       | Anexo 2 .....                                             | 100 |
|       | Anexo 3 .....                                             | 101 |
|       | Anexo 4 .....                                             | 102 |
|       | Anexo 5 .....                                             | 103 |
|       | Anexo 6 .....                                             | 104 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|           |                                                                                           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| ASD       | Ágar sabouraud dextrose                                                                   |
| ATCC      | <i>American Type Culture Collection</i>                                                   |
| CHEF      | <i>Contour-clamped homogeneous electric field</i>                                         |
| CIM       | Concentração inibitória mínima                                                            |
| CLSI      | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>                                        |
| CMV       | Citomegalovírus                                                                           |
| COLETA A  | Coleta realizada no período pré-condicionamento                                           |
| COLETA B  | Coleta realizada durante o quadro de neutropenia                                          |
| COLETA C  | Coleta realizada após a recuperação medular                                               |
| COLETA CO | Coleta realizada na ocorrência de quadro de candidose oral                                |
| COLETA D  | Coleta realizada no dia +50 após o TCPH                                                   |
| COLETA E  | Coleta realizada no dia +100 após o TCPH                                                  |
| CSD       | Coefficiente de Similaridade de Dice                                                      |
| DECH      | Doença do enxerto contra o hospedeiro                                                     |
| DMSO      | Dimetil sulfoxido                                                                         |
| DNA       | <i>Desoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucleico                                 |
| HC        | Hospital de Clínicas                                                                      |
| HEPA      | <i>High-efficiency particulate air</i> – Filtro de alta eficiência para partículas aéreas |
| HIV       | Human immunodeficiency vírus - Vírus da imunodeficiência humana                           |
| HLA       | <i>Human leukocyte antigen</i> – Antígeno leucocitário humano                             |
| HSV       | Herpes simples virus                                                                      |
| IgA       | Imunoglobulina A                                                                          |
| MOPS      | Ácido morfilenopropanosulfônico                                                           |
| NCCLS     | <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>                               |
| PFGE      | <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> – eletroforese em campo pulsátil                  |
| TCPH      | Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas                                       |
| TMO       | Transplante de medula óssea                                                               |

|         |                                                                 |
|---------|-----------------------------------------------------------------|
| UFC     | Unidade formadora de colônia                                    |
| UNICAMP | Universidade Estadual de Campinas                               |
| UPGMA   | <i>Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages</i> |
| YBC     | <i>Yeast Biochemical System</i>                                 |

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

|           |                                                                                                                                                                                                         | Página |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Quadro 1  | Diretrizes de interpretação da susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida</i> spp. frente ao fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B.                                                 | 35     |
| Tabela 1  | Distribuição dos pacientes estudados de acordo com as características demográficas                                                                                                                      | 40     |
| Tabela 2  | Distribuição dos pacientes estudados de acordo com características clínicas                                                                                                                             | 41     |
| Tabela 3  | Quadros infecciosos apresentados pelos pacientes estudados                                                                                                                                              | 42     |
| Tabela 4  | Condição bucal durante o período do estudo                                                                                                                                                              | 44     |
| Tabela 5  | Medianas dos valores do fluxo salivar dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico e Autólogo nos diferentes períodos de estudo                                                                            | 47     |
| Figura 1  | Representação das medianas do fluxo salivar (ml/min) por período de coleta no pacientes submetidos a TCPH Alogênico e Autólogo                                                                          | 47     |
| Figura 2. | Percentual de pacientes colonizados e não colonizados por <i>Candida</i> nos diferentes tempos de estudo                                                                                                | 48     |
| Figura 3  | Médias dos números de UFC/ml de saliva encontradas nos diferentes tempos de estudo nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico e a TCPH Autólogo                                                          | 50     |
| Figura 4  | Médias dos números de UFC/ml de saliva encontradas nos diferentes tempos de estudo nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico e a TCPH Autólogo, excluindo os pacientes que apresentaram candidose oral. | 50     |
| Tabela 6  | Espécies de <i>Candida</i> isoladas nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico e a TCPH Autólogo                                                                                                         | 52     |

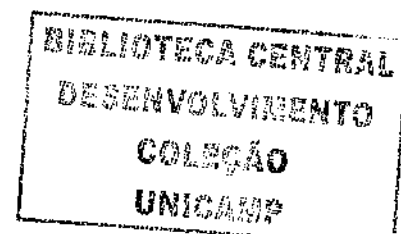
|           |                                                                                                                                                                                      |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 5  | Dinâmica de colonização oral por <i>Candida</i> nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico e a TCPH Autólogo                                                                          | 53 |
| Tabela 7  | Perfil de susceptibilidade frente ao fluconazol dos isolados de <i>Candida albicans</i> e de <i>Candida</i> não <i>albicans</i> obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico    | 55 |
| Tabela 8  | Perfil de susceptibilidade frente ao itraconazol dos isolados de <i>Candida albicans</i> e de <i>Candida</i> não <i>albicans</i> obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico   | 56 |
| Tabela 9  | Perfil de susceptibilidade frente ao cetoconazol dos isolados de <i>Candida albicans</i> e de <i>Candida</i> não <i>albicans</i> obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico   | 57 |
| Tabela 10 | Perfil de susceptibilidade frente à anfotericina B dos isolados de <i>Candida albicans</i> e de <i>Candida</i> não <i>albicans</i> obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico | 58 |
| Tabela 11 | Perfil de susceptibilidade frente ao fluconazol dos isolados de <i>Candida albicans</i> e de <i>Candida</i> não <i>albicans</i> obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Autólogo     | 60 |
| Tabela 12 | Perfil de susceptibilidade frente ao itraconazol dos isolados de <i>Candida albicans</i> e de <i>Candida</i> não <i>albicans</i> obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Autólogo    | 60 |
| Tabela 13 | Perfil de susceptibilidade frente ao cetoconazol dos isolados de <i>Candida albicans</i> e de <i>Candida</i> não <i>albicans</i> obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Autólogo    | 61 |
| Tabela 14 | Perfil de susceptibilidade frente à anfotericina B dos isolados de <i>Candida albicans</i> e de <i>Candida</i> não <i>albicans</i> obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Autólogo  | 61 |



|           |                                                                                                                                                                          |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 15 | Cariótipo eletroforético e perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados clínicos de <i>Candida albicans</i> encontrados nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico | 63 |
| Tabela 16 | Cariótipo eletroforético e perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados clínicos de <i>Candida albicans</i> encontrados nos pacientes submetidos a TCPH Autólogo  | 64 |
| Figura 6  | Dendrograma representando a similaridade do cariótipo eletroforético entre os isolados de <i>Candida albicans</i>                                                        | 65 |
| Figura 7  | Perfis eletroforéticos encontrados entre os isolados de <i>Candida albicans</i>                                                                                          | 66 |
| Tabela 17 | Isolados de <i>Candida albicans</i> obtidos de pacientes que apresentaram candidose oral no período de estudo                                                            | 68 |
| Figura 8  | Cariotipagem eletroforética de isolados orais sequenciais dos pacientes que desenvolveram candidose oral                                                                 | 69 |

## RESUMO

As infecções superficiais e sistêmicas provocadas por *Candida* são freqüentes causas de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos a transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH). Entre os fatores de risco destaca-se a colonização prévia a qual parece ser um pré-requisito para o desenvolvimento de infecção. Desta forma, a cavidade oral pode atuar como um reservatório para esses microorganismos. O presente estudo teve como objetivo avaliar, prospectivamente, o fluxo salivar e os efeitos da profilaxia antifúngica com fluconazol (200mg/dia) no número de pacientes colonizados por *Candida* spp. e no número de unidades formadoras de colônias (UFC) das espécies *Candida* encontradas na saliva dos pacientes submetidos a TCPH. Objetivou, ainda, realizar testes susceptibilidade antifúngica dos isolados, determinar o cariótipo eletroforético por meio de eletroforese em campo pulsátil (PFGE) nos isolados de *Candida albicans* e verificar a similaridade entre as cepas colonizadoras e as responsáveis pelos quadros de infecção. Foram incluídos no estudo 35 pacientes, 21 do TCPH Alogênico e 14 do TCPH Autólogo, com mediana de idade de 44 anos (21-71) sendo 22 (63%) do gênero masculino e 13 (37%) do gênero feminino. O fluxo salivar variou de modo estatisticamente significativo nos grupo Alogênico ( $p=0,0003$ ) e no grupo Autólogo ( $p=0,009$ ) no decorrer do estudo. Colonização por *Candida* ocorreu em 57% dos pacientes sendo que durante o transplante, estando o paciente sob profilaxia com fluconazol, houve redução de 60% no número de pacientes colonizados. Nesse período também ocorreu uma redução da média do número de UFC/ml seguida de expressivo aumento nas coletas subseqüentes, alcançando valores maiores que os obtidos na coleta inicial. O número de UFC/ml apresentou uma relação inversamente proporcional com o fluxo salivar ( $p=0,005$ ). Não foi possível estabelecer relação entre o número de UFC/ml de saliva e a presença de candidose oral. *Candida albicans* foi a espécie mais freqüentemente encontrada representando 63% de todos os isolados seguida da *Candida parapsilosis*. Resistência aos antifúngicos foi encontrada em 6 isolados de *Candida* não *albicans* sendo 2 *Candida parapsilosis*, 2 *Candida guilliermondii*, 1 *Candida krusei* e 1 *Candida* sp. Foram encontrados 9 diferentes perfis de



cariótipo eletroforético de *Candida albicans*. Em 6 pacientes a mesma cepa encontrada na coleta inicial foi identificada ao longo do estudo. Quatro (11,4%) pacientes desenvolveram candidose oral no período pós-enxertia. Em todos os casos somente isolados de *Candida albicans* foram identificados. Todos esses pacientes foram colonizados inicialmente pela mesma espécie sendo que em 3 pacientes, a mesma cepa colonizadora foi a responsável pela infecção. A maior ocorrência de candidose oral no período pós-enxertia pode estar relacionada com fatores inerentes ao hospedeiro. A persistência da mesma cepa sugere que a profilaxia com fluconazol durante o transplante não erradica a cepa colonizadora e que a colonização prévia parece ser um pré-requisito para o desenvolvimento de infecção.

## ABSTRACT

Superficial and systemic *Candida* infections are usually responsible for morbidity and mortality in hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. Previous colonization is an important risk factor and seems to be a pre-requisite for infection and the oral cavity may be a reservoir for these microorganisms. The aim of this study was to analyze, prospectively, the unstimulated salivary flow rate and the fluconazole prophylactic regimen effects (200mg/day) in the number of *Candida* colonized patients and in the colony-forming unit (CFU) count of the *Candida* species identified in the saliva of HSCT recipients. The objective was also performed antifungal susceptibility tests in clinical isolates, determine the electrophoretic karyotype by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in the *Candida albicans* isolates and verify the similarity between colonization and infection strains. Thirty-five patients were enrolled, 21 Allogeneic and 14 Autologous HSCT recipients. The median age was 44 years old (range 21-71). Twenty-two (63%) were male and 13 (37%) were female. The salivary flow rate varied in the Allogeneic ( $p=0,0003$ ) and in the Autologous groups ( $p=0,009$ ). *Candida* colonization was found in 57% of the patients. There was a 60% reduction of the number of colonized in patients under prophylactic fluconazole regimen. In this same time, there also was a reduction of the median CFU/ml count followed by an important increase of the sequential samples, reaching values higher than the count found in the initial collection. There was a significant inverse relationship between salivary flow and *Candida* CFU/ml count ( $p=0,005$ ). It was not possible to correlate the CFU/ml count and oral candidosis. *Candida albicans* was the most frequent specie identified (63%) followed by *Candida parapsilosis*. Antifungal resistance was found in 6 clinical isolates of non-*albicans* species of *Candida*, 2 *Candida parapsilosis*, 2 *Candida guilliermondii*, 1 *Candida krusei* and 1 *Candida* sp. We found 9 patterns of *Candida albicans* electrophoretic karyotyping. In 6 patients the initial colonization strain was found during the following study. Four patients (11,4%) developed oral candidosis by *Candida albicans* in the post engraftment period. All patients were initially colonized by the same specie. In 3 of these patients the same colonization strain

was identified in the infection period. The major occurrence of oral candidosis in the post engraftment period may be related with inherent host factors. The persistence of the same strain suggests that the fluconazole prophylaxis does not eradicate the colonization strain. The previous colonization appears to be a pre-requisite for de infection development.

# 1 INTRODUÇÃO

Os pacientes submetidos a transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH) apresentam neutropenia grave induzida pelo condicionamento quimioterápico ficando susceptíveis a infecções oportunistas de origem viral, bacteriana e fúngica. Outros fatores de risco podem ser listados como a quebra da barreira mucosa pelo desenvolvimento de mucosite, o uso de antibióticos de largo espectro que favorece a proliferação fúngica, o uso prolongado de antifúngicos que propicia a seleção de espécies menos susceptíveis, o atraso na maturação dos linfócitos e o uso de catéteres endovenosos. Os pacientes que são submetidos a TCPH Alogênico também têm como fatores de risco o uso de imunossupressores para profilaxia ou tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) assim como a quebra da barreira mucosa quando do desenvolvimento da doença. Outro importante fator de risco para o desenvolvimento de infecção fúngica superficial e/ou sistêmica é a presença de colonização prévia (Sonis, 1998; Vincent *et al.*, 1998; Trabasso, 2001; De La Rosa *et al.*, 2002; Nucci *et al.*, 2003).

As infecções fúngicas ocorrem com frequência nos pacientes submetidos ao TCPH, sendo que as espécies do gênero *Aspergillus* e *Candida* são as mais frequentemente associadas a esses quadros. Devido à elevada taxa de mortalidade associada e à constatação da importância da colonização prévia para o desenvolvimento de infecção por *Candida*, a terapia profilática do fluconazol foi instituída em doses que variam de 200 a 400mg ao dia desde o início do condicionamento quimioterápico até a enxertia medular ou até o término da imunossupressão para os pacientes submetidos ao TCPH Alogênico (Goodman *et al.*, 1992; Chandrasekar *et al.*, 1994; Slavin *et al.*, 1995; Marr *et al.*, 2000a; Safdar *et al.*, 2001a; MacMillan *et al.*, 2002).

A partir da instituição do uso profilático do fluconazol houve uma redução no número de casos de infecção superficial e de infecção sistêmica provocadas por *Candida*, assim como uma redução no número de óbitos decorrentes (Goodrich *et al.*, 1991; Goodman *et al.*, 1992; Chandrasekar *et al.*, 1994; Slavin *et al.*, 1995; Marr *et al.*, 2000a;

Safdar *et al.*, 2001a). Outra consequência atribuída ao uso do fluconazol foi uma mudança no perfil de espécies de *Candida* encontradas como colonizadoras e como infectantes. A mudança descrita é caracterizada pela ascensão de espécies de *Candida* não *albicans* menos susceptíveis ou resistentes ao fluconazol, exemplificadas respectivamente por *Candida glabrata* e por *Candida krusei*, além de um aparente desenvolvimento de resistência observado em algumas cepas de *Candida albicans* as quais são naturalmente sensíveis ao fluconazol (Chandrasekar *et al.*, 1994; Marr *et al.*, 1997 e 2000a; Safdar *et al.*, 2001a).

Na cavidade oral, além de diversos fatores sistêmicos, fatores locais como a redução do fluxo e do pH salivar, alterações na composição da saliva, presença de próteses dentárias e de aparelhos ortodônticos podem favorecer a proliferação de *Candida* e o conseqüente desenvolvimento de infecção superficial ou sistêmica na dependência do estado imune do indivíduo (Jorge *et al.*, 1993a; Al-Karaawi *et al.*, 2002; Totti *et al.*, 2004). A cavidade oral pode ainda atuar como um reservatório para espécies menos susceptíveis aos azólicos (Marr *et al.* 2000a; Manfredi *et al.*, 2002).

Tendo em vista a alta taxa de mortalidade relacionada aos quadros de infecção por *Candida* e a dificuldade no diagnóstico precoce, a identificação prévia de isolados orais potencialmente patogênicos e a determinação da susceptibilidade aos antifúngicos mais comumente usados pode ser útil para o estabelecimento de estratégias adequadas de prevenção para os pacientes submetidos a TCPH.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Algumas espécies do gênero *Candida* compõem a microbiota normal da pele e das mucosas dos tratos gastrintestinal e genital. A espécie encontrada em maior número é a *Candida albicans*. Fatores locais ou sistêmicos podem influenciar a proliferação e a disseminação de *Candida* causando, na dependência do estado imune do indivíduo, doença limitada às mucosas ou doença disseminada (Repentigny *et al.*, 1992; Sable & Donowitz, 1994; Marr & Bowden, 1999; Mellado *et al.*, 2000; Wingard, 2002; Eggiman *et al.*, 2003; Nucci *et al.*, 2003).

As defesas do hospedeiro podem ser classificadas em específicas e não-específicas. Entre as formas de proteção não específica ou de imunidade inata contra os fungos pode-se incluir a atividade antifúngica das excreções naturais como o suor e a saliva, o efeito protetor na microbiota endógena natural da pele e das mucosas por meio da competição por espaço e nutrientes, a integridade da pele e das mucosas a qual previne a entrada dos fungos e a ação de células fagocitárias como os neutrófilos e as células do sistema fagocitário mononuclear. A resposta imune específica ou adquirida contra os fungos consiste basicamente na imunidade celular regulada por linfócitos T (Wanke *et al.*, 2000; Wingard, 2002).

Os pacientes mais acometidos por candidemia são os que fazem uso de antibióticos, terapia imunossupressora, nutrição parenteral, assim como os pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos tais como inserção de catéteres intravasculares, hemodiálise e cirurgia abdominal. Além destes, pacientes queimados, prematuros também fazem parte do grupo de risco (Wey 1989; Beck-Sagué *et al.*, 1993; Pfaller, 1995; Wenzel, 1995; Wingard, 1995, Colombo *et al.*, 1999; Kanellopoulou *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004).

A candidíase hematógena é a quarta causa mais comum de infecções hospitalares nos EUA (Pfaller, 1995). A taxa de mortalidade é de 57% sendo que a mortalidade atribuída a essas infecções é de 38% (Wey *et al.*, 1988; Wenzel, 1995;



Colombo & Guimarães, 2003). Na população brasileira, a taxa de mortalidade descrita em pacientes com candidemia atendidos em hospitais universitários de atenção terciária é de 50% (Colombo *et al.*, 1999).

Nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico e Autólogo, Goodrich *et al.* (1991) descreveram uma incidência de infecção por *Candida* em 11,4% dos pacientes estudados (Sable & Donowitz, 1994). Para esses pacientes, a taxa de mortalidade descrita foi de 79%, sendo a mortalidade atribuída à candidemia em 30% dos casos (Goodrich *et al.*, 1991; Verfaillie *et al.*, 1991).

Objetivando diminuir a colonização fúngica e conseqüentemente reduzir o risco de desenvolvimento de infecção superficial e de infecção sistêmica, a profilaxia com fluconazol em doses diárias de 200 a 400mg foi instituída (Goodman *et al.*, 1992; Chandrasekar *et al.*, 1994; Slavin *et al.*, 1995; Marr *et al.*, 2000a; Safdar *et al.*, 2001a; MacMillan *et al.*, 2002)

A resposta dos pacientes à administração profilática de fluconazol durante o período de granulocitopenia ou até o dia +75 pós-TCPH foi estudada por Goodman *et al.* (1992) e por Slavin *et al.* (1995), respectivamente. Os autores verificaram que 15,8% e 18% dos pacientes do grupo placebo apresentaram infecção fúngica sistêmica, contrastando com 2,8% e 7% dos pacientes para quais fluconazol foi administrado, respectivamente. A redução na incidência de candidemia após a instituição de fluconazol como profilático também foi descrita por Safdar *et al.* (2001a), os quais constataram desenvolvimento de candidemia em 6,8% dos pacientes submetidos a TCPH e sob uso de profilaxia com fluconazol e por Marr *et al.* (2000a) que constataram candidemia em somente 4,6% desses pacientes com mortalidade atribuível de 20%.

O uso profilático de fluconazol também promoveu a redução do número de casos de infecção superficial. Goodman *et al.* (1992) descreveram uma incidência de 8,4% de infecção superficial em pacientes do grupo de estudo para os quais o fluconazol foi administrado, contrastando com 33,3% nos pacientes do grupo placebo. A redução da incidência de infecção superficial nos pacientes que fazem uso profilático de fluconazol

também foi descrita por outros autores (Samonis *et al.*, 1990; Chandrasekar *et al.*, 1994; Slavin *et al.*, 1995, Epstein *et al.*, 1996).

A ação do fluconazol na redução do número de pacientes colonizados por *Candida* durante o TCPH foi descrita por Goodman *et al.* (1992) a partir de um estudo longitudinal. Os autores verificaram que no grupo de estudo o número de pacientes colonizados por *Candida* diminuiu de 43,6% para 29,6% e que aumentou de 37,8% para 67,2% nos pacientes do grupo placebo. Os autores mostraram também que, dos pacientes que fizeram uso de fluconazol e que estavam colonizados no início do tratamento, 58% tiveram culturas subseqüentes negativas, contrastando com 6% dos pacientes do grupo placebo. De outra forma, foi verificado que 19,8% dos pacientes do grupo de estudo que não eram colonizados na primeira coleta mostraram-se colonizados nas coletas subseqüentes. O mesmo ocorreu em 51% dos pacientes do grupo placebo.

Os pacientes submetidos a TCPH apresentam vários fatores que propiciam a infecção fúngica superficial e a infecção fúngica sistêmica (Sable & Donowitz, 1994). O uso de drogas de ação citotóxica pode causar mucosite e a conseqüente quebra da barreira mucosa pode propiciar a infecção fúngica sistêmica por permitir a disseminação de espécies de *Candida* presentes no trato gastrointestinal, em especial *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Além disso, a quebra da barreira mucosa também pode provocar uma diminuição na produção de imunoglobulina A (IgA) secretora (Degregorio *et al.*, 1982; Goodrich *et al.*, 1991; Sonis, 1998; Marr & Bowden, 1999; Trabasso, 2001; De La Rosa *et al.*, 2002; Wingard, 2002). Nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico, o rompimento da barreira mucosa também pode ser decorrente do desenvolvimento de DECH (Degregorio *et al.*, 1982; Goodrich *et al.*, 1991; Marr & Bowden, 1999; Trabasso, 2001; De La Rosa *et al.*, 2002; Wingard, 2002). A perda de integridade também ocorre na pele devido ao uso de catéteres endovenosos. Nestes casos, a formação de biofilme por espécies colonizadoras da pele como a *Candida parapsilosis* parece estar relacionada com os quadros de infecção (Wey *et al.*, 1989; Branchini *et al.*, 1994).

As ações das células de defesa estão alteradas nos pacientes submetidos a TCPH, seja por redução do número, seja por falha na sua função. O condicionamento quimioterápico prévio ao TCPH induz uma importante redução do número de granulócitos neutrófilos, células que participam da resposta imune inespecífica por meio da fagocitose. A duração da neutropenia depende principalmente da origem e da quantidade das células presentes no enxerto e dos fatores de crescimento hematopoiéticos usados (Wingard, 2002). De forma geral, o risco de desenvolvimento de infecção fúngica sistêmica é maior quanto maior for o período de neutropenia (Goodrich *et al.*, 1991; Verfaillie *et al.*, 1991; Trabasso, 2001; Epstein *et al.*, 2003). Após a enxertia medular, os fatores de risco são influenciados pela supressão da resposta imune celular através da supressão dos linfócitos T. Essas células podem ser afetadas pelo desenvolvimento da DECH, pelo uso de imunossupressores como profilaxia ou tratamento da DECH, ou ainda, pelo atraso na recuperação e maturação das células do enxerto (Goodrich *et al.*, 1991; Sable & Donowitz, 1994; Marr & Bowden, 1999; Andruits *et al.*, 2000; Trabasso, 2001; De La Rosa *et al.*, 2002; Wingard, 2002).

O uso de algumas drogas também propicia o desenvolvimento de infecção fúngica nos pacientes submetidos a TCPH. O uso sistemático prolongado de antibióticos de largo espectro os quais promovem a supressão da microbiota natural favorecem o crescimento fúngico. Além dos antibióticos, o uso de antifúngicos também pode influenciar a infecção por promover a seleção de espécies ou cepas menos susceptíveis a essas drogas, seja através do crescimento de organismos colonizadores naturais não susceptíveis, seja pela promoção do desenvolvimento de resistência de espécies naturalmente sensíveis (Degregorio *et al.*, 1982; Wey *et al.*, 1989; Wingard, 1995; Marr *et al.*, 1997; Marr & Bowden, 1999; Pagano *et al.*, 1999; Wingard, 2002; Epstein *et al.*, 2003).

Outros fatores de risco para o desenvolvimento de infecção fúngica sistêmica são gravidade da doença de base, idade, colonização e infecção prévias (Goodrich *et al.*, 1991; Marr & Bowden, 1999; Trabasso 2001; De La Rosa *et al.*, 2002; Wingard, 2002). Entre esses fatores, a colonização prévia do trato gastrointestinal destaca-se como um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de infecção por *Candida*. A colonização parece ser um pré-requisito para a infecção fúngica sistêmica e o risco é maior

quanto maior for o número de sítios colonizados (Krause *et al.*, 1969; Wey *et al.*, 1989; Verfaillie *et al.*, 1991; Goodman *et al.*, 1992; Pittet *et al.*, 1994; Pagano *et al.*, 1999; Marr *et al.*, 2000a; Trabasso, 2001; Safdar & Armstrong, 2002; Epstein *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004).

Marr *et al.* (2000a) estudaram a colonização por *Candida* na saliva de pacientes submetidos a TCPH Alogênico e observaram colonização oral em 256 dos 585 pacientes incluídos no estudo. Destes, 132 (84%) pacientes eram colonizados por *Candida albicans* antes do início do condicionamento quimioterápico pré-TCPH e um total de 136 (53%) pacientes foram colonizados por espécies de *Candida* não *albicans* durante o curso do tratamento. Os autores mostraram, ainda, que 9 dos 15 pacientes que desenvolveram candidemia por *Candida glabrata* e 4 dos 6 que apresentavam *Candida krusei* possuíam evidência prévia de colonização oral com as mesmas espécies, o que poderia indicar a origem endógena da infecção.

A importância da colonização prévia por *Candida* para o desenvolvimento de infecção também tem sido descrita em trabalhos utilizando tipagem molecular. Esses trabalhos mostram que a cepa colonizadora é quase sempre a cepa isolada durante o quadro de infecção suportando a premissa de aquisição endógena da infecção através da invasão pelo trato gastrointestinal (Pittet *et al.*, 1994; Voss *et al.*, 1994; Pfaller, 1995; Colombo *et al.*, 1996; Reagan *et al.*, 1990; Redding *et al.*, 2004).

Pittet *et al.* (1994) realizaram coletas sequenciais em orofaringe, traquéia e estômago de 650 pacientes neonatos e cirúrgicos. Destes, onze pacientes apresentaram infecção sistêmica por *Candida* no período do estudo. Por meio da cariotipagem eletroforética os autores demonstraram que as cepas infectantes eram idênticas às cepas colonizadoras previamente identificadas. A similaridade entre a cepa colonizadora e a cepa infectante também foi demonstrada por Colombo *et al.* (1996). Estes autores descreveram um caso de candidemia por *Candida albicans* em um paciente portador do vírus da imunodeficiência humana (HIV) o qual apresentou a mesma cepa, identificada por meio de eletroforese em campo pulsátil (PFGE- *Pulsed-field gel electrophoresis*), nas regiões oral e anal e na urina.

Reagan *et al.* (1990) realizaram um estudo prospectivo com culturas semanais de pacientes com doenças hematológicas e/ou submetidos a TCPH. As amostras foram obtidas da faringe, da urina e das fezes. Através da tipagem molecular os autores mostraram que em 94% dos 16 pacientes previamente colonizados e que desenvolveram candidemia a cepa isolada durante o quadro infeccioso foi a mesma cepa identificada anteriormente como colonizadora. Voss *et al.* (1994) estudaram retrospectivamente isolados de diferentes espécies de *Candida* obtidas de pacientes não imunocomprometidos e que posteriormente desenvolveram candidemia. Dos 19 pacientes selecionados para o estudo, 84% apresentaram similaridade entre a cepa colonizadora e a cepa responsável pela infecção.

A infecção pela *Candida parapsilosis* comumente é descrita como decorrente de contaminação exógena. O principal sítio de colonização desta espécie é a pele e a contaminação pode ocorrer através da formação de biofilme nas pontas do catéter, os quais promovem solução de continuidade do meio externo com o meio interno. Além disso, os quadros de infecção também podem decorrer de contaminação cruzada (Branchini *et al.*, 1994; Pfaller, 1995; Pfaller *et al.*, 2000; Marr, 2000a; Marr, 2000b). Mas para Nucci & Anaissie (2001) não existem pesquisas com avaliação genotípica que confirme esse pressuposto. Os autores analisaram artigos publicados que discutiam a origem das espécies responsáveis pelos quadros de candidemia e sugeriram, com base em trabalhos clínicos e em trabalhos com tipagem molecular, que as espécies responsáveis pelos quadros de candidemia têm origem no trato gastrointestinal. A presença de extensivo envolvimento do intestino nos casos de infecção disseminada, a identificação da colonização gastrointestinal como um fator de risco para candidemia e a eficácia da profilaxia antifúngica na prevenção das infecções por eliminar ou reduzir a colonização por espécies de *Candida* suportam a origem gastrointestinal das espécies causadoras de candidemia.

Na população geral, com câncer e nos pacientes submetidos a TCPH a *Candida albicans* é o principal agente causador de candidemia (Wey *et al.*, 1988; Goodrich *et al.*, 1991; Wingard *et al.*, 1991; Beck-Sagué *et al.*, 1993; Sable & Donowitz, 1994; Wingard, 1995; Abi-Said *et al.*, 1997; Marr & Bowden, 1999; Marr, 2000b; Kanellopoulou *et al.*, 2001). Na Europa, no Canadá e na América Latina a *Candida parapsilosis* é o segundo

agente, diferente dos EUA onde o segundo agente mais freqüentemente associado aos quadros de candidemia é a *Candida glabrata* (Pfaller *et al.*, 2000).

Wingard (1995) analisou a literatura médica em um período de 40 anos (1952-1992) e verificou a descrição de 1.645 casos de candidemia em pacientes com câncer. O autor relata que a freqüência de diferentes espécies de *Candida* como causadora de candidemia variou em cada relato, o que provavelmente deveu-se a diferenças entre a população atendida em cada hospital. *Candida albicans* foi responsável por 54% dos casos. Entre as espécies de *Candida* não *albicans* destacou-se a *Candida tropicalis* responsável por 25% dos casos, seguida da *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e da *Candida krusei*, responsáveis por 8%, 7% e 4% dos casos, respectivamente. O autor relata ainda, que nos pacientes submetidos a TCPH as infecções por *Candida* foram provocadas principalmente por *Candida krusei* e por *Candida glabrata*.

Após a instituição do uso sistemático do fluconazol profilático, além da diminuição no número de pacientes colonizados e da redução no número de casos tanto de infecção sistêmica quanto de infecção superficial, houve também uma mudança no perfil de espécies de *Candida* encontradas como colonizadoras e também como infectantes (Wingard *et al.*, 1991; Chandrasekar *et al.*, 1994; Wingard, 1995; Pfaller, 1995; Slavin *et al.*, 1995; Abi-Said *et al.*, 1997; Hoppe *et al.*, 1997; Marr *et al.*, 2000a; Marr, 2000b). A redução do número de casos de candidemia provocados por *Candida albicans* e o aumento da presença de *Candida krusei* e de *Candida glabrata* foi descrita por alguns autores que sugeriram que essa mudança no espectro de agentes causadores de infecção pode ter sido devido à resistência natural dessas espécies aos azólicos (Wingard *et al.*, 1991; Goodman *et al.*, 1992; Slavin *et al.*, 1995; Abi-Said *et al.*, 1997; Marr & Bowden, 1999; Marr *et al.*, 2000a; Marr, 2000b; Safdar *et al.*, 2001b). O aumento do número de casos de candidemia provocadas por *Candida krusei* e por *Candida glabrata* também foi descrito em pacientes submetidos a TCPH nos EUA e na Europa (Abi-Said *et al.*, 1997; Marr, 2000b; Safdar *et al.*, 2001a). Segundo Safdar *et al.* (2001a) essa alteração no espectro de infecção é provavelmente multifatorial, mas a pressão positiva exercida pelo fluconazol parece ter uma importante função.

Embora o aumento do número de casos de infecção por espécies de *Candida* não *albicans* venha sendo atribuído à seleção decorrente do uso do fluconazol, a presença de algumas espécies como *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* parece ter uma variação geográfica, podendo corresponder ao próprio perfil de colonização do grupo estudado (Marr, 2000b; Pfaller *et al.*, 2000). Colombo *et al.* (1999) realizaram um estudo prospectivo na população brasileira atendida em hospitais universitários de atenção terciária e verificaram a ocorrência de 145 casos de candidemia em um período de 22 meses de estudo. Os autores descreveram que 63% dos casos de candidemia foram provocados por espécies de *Candida* não *albicans*. *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* foram as espécies mais comumente identificadas como causadoras de infecção e corresponderam a 37%, 25% e 24% dos casos, respectivamente. Os autores também relataram que somente 6 pacientes haviam feito uso prévio de azólicos e que, portanto, a predominância de *Candida* não *albicans* não pôde ser atribuída ao uso dessas drogas. Dos episódios de candidemia apresentados por esses autores, um terço ocorreu em pacientes com câncer.

Ainda na população brasileira, Silva (2001) analisou, retrospectivamente, os isolados clínicos de *Candida* obtidos de pacientes com distúrbios hematológicos submetidos ou não a TCPH no Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) no período de 1996 a 2000. Dentre os 549 pacientes avaliados, 171 (31,2%) mostraram-se colonizados, sendo 18,5% dos pacientes com doenças hematológicas e 53% dos pacientes submetidos a TCPH. Do total de 393 isolados clínicos obtidos, o percentual de *Candida albicans* foi de 33,6%. Entre as espécies de *Candida* não *albicans* as mais encontradas foram *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*, as quais representaram 20,4%, 10,9% e 6,9% dos isolados, respectivamente. A autora descreve, ainda, a presença de 22,4% dos isolados identificados como *Candida* sp. No mesmo ano de 2001, Trabasso descreveu 5 casos de candidemia em pacientes submetidos ao TCPH no mesmo hospital nos anos de 1997 a 1999. Destes, 3 (60%) casos foram provocados por *Candida parapsilosis*, 1 (20%) por *Candida lusitanae* e 1 (20%) por *Candida albicans*.

Habitualmente, *Candida albicans* e *Candida tropicalis* são susceptíveis ao fluconazol, o que pode justificar a redução na incidência de infecção sistêmica provocada por essas duas espécies após o uso profilático desse fármaco ter sido instituído para os pacientes submetidos a TCPH. Inversamente, a resistência natural da *Candida krusei* e da *Candida glabrata* aos azólicos pode explicar o aumento do número de quadros infecciosos por essas duas espécies no mesmo período (Wingard, 1995; Marr *et al.*, 2000a; Marr, 2000b; Safdar *et al.*, 2001a). Em estudo realizado nos pacientes submetidos a TCPH, Marr *et al.* (2000a) constataram que todos os isolados de *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lipolytica* mostraram-se resistentes ao fluconazol, além de 99% dos isolados de *Candida glabrata*, 30% dos isolados de *Candida lusitanae* e *Candida tropicalis* e 7% dos isolados de *Candida albicans*.

O uso prolongado de azólicos vem sendo responsabilizado pelo aumento do número de processos infecciosos provocados por cepas resistentes (Marr *et al.*, 1997; Pfaller *et al.*, 1994; Nucci & Colombo, 2002). Essas drogas parecem alterar a colonização do hospedeiro propiciando a proliferação de cepas menos susceptíveis presentes em pacientes multicolonizados, mas a emergência de resistência *de novo* em isolados de *Candida albicans* colonizadoras anteriormente susceptíveis é preocupante e tem sido descrita principalmente em pacientes portadores do HIV (Marr *et al.*, 1997). Estes pacientes freqüentemente apresentam candidose oral recorrente e em alguns casos, a terapia com fluconazol é instituída por longos períodos. Estudos longitudinais realizados a partir da obtenção de isolados orais sequenciais de *Candida albicans* nesses pacientes mostraram que em alguns casos ocorreu um aumento da concentração inibitória mínima (CIM) sendo o isolado genotipicamente idêntico ao isolado inicial e em outros casos, ocorreu a infecção por outra cepa mais resistente (Powderly *et al.*, 1992; Pfaller, *et al.* 1994; Pfaller, 1995; Lasker *et al.*, 2001). Outros trabalhos mostraram a ocorrência de infecção por *Candida dubliniensis* durante o curso do tratamento, espécie freqüentemente identificada como *Candida albicans* e que normalmente apresenta um valor maior de CIM para os azólicos (Kirkpatrick *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2002).



A determinação da CIM das cepas isoladas de pacientes que fazem uso sistemático de antifúngicos é importante para acompanhar mudanças no perfil de susceptibilidade e o possível desenvolvimento de resistência. A técnica padronizada pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), hoje CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), é a mais usada, embora algumas variáveis como tamanho da amostra, modo de preparo do inóculo, meio de cultura, temperatura, tempo de incubação e critério de leitura ainda possam ser questionadas (Pfaller *et al.*, 1997). Além disso, a correlação dos resultados do teste *in vitro* com a evolução clínica somente pode ser feita considerando as limitações do método. O CLSI estabelece valores de CIM que indicam susceptibilidade, sensibilidade dependente da dose e resistência frente ao fluconazol e ao itraconazol. Já os valores para cetoconazol e anfotericina B foram sugeridos por outros textos (Klepser *et al.*, 1998; Milan *et al.*, 1998).

A cavidade oral pode atuar como reservatório para microorganismos que, dependendo das condições do indivíduo, podem proliferar e provocar infecção sistêmica e/ou superficial (Degregorio *et al.* 1982; Sonis, 1998; Redding *et al.*, 2004). Os microorganismos podem viver na forma planctônica ou formar biofilmes sobre as superfícies dentárias e protéticas e assim, a cavidade oral pode atuar como uma fonte de infecção (Costerton *et al.*, 1999; Ramage *et al.*, 2001; Kunh *et al.*, 2002; Hossain *et al.*, 2003; Soysa *et al.*, 2004). A cavidade oral pode ainda ser colonizada por espécies com menor susceptibilidade ao fluconazol como a *Candida glabrata* ou por espécies naturalmente resistentes aos azólicos como a *Candida krusei* (Marr *et al.*, 2000a; Safdar & Armstrong, 2002; Redding *et al.*, 2004). A importância dos cuidados orais previamente ao tratamento citotóxico recai na necessidade de remover focos infecciosos dentários e periodontais para reduzir o número de microorganismos que poderiam proliferar e disseminar através da solução de continuidade provocada pela mucosite.

A importância da cavidade oral como fonte de infecção foi evidenciada em trabalhos onde a análise genotípica mostrou a similaridade entre isolados orais e isolados causadores de pneumonia fúngica e de infecção fúngica sistêmica (Redding *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2005). Yamamoto *et al.* (2005) mostraram a similaridade genotípica entre

o isolado oral de *Candida albicans* e a mesma espécie isolada em um quadro de pneumonia fúngica em um paciente sob tratamento quimioterápico. Os autores sugerem que a causa pode ter sido a aspiração do microorganismo anteriormente identificado como colonizador da cavidade oral. Redding *et al.* (2004) mostraram um quadro de infecção fúngica sistêmica provocada por *Candida glabrata* em um paciente submetido a TCPH Alogênico no qual a mesma cepa foi previamente identificada na cavidade oral.

Além da importância da colonização oral, Degregorio *et al.* (1982) relataram que o risco para o desenvolvimento de infecção fúngica sistêmica aumenta quando o paciente apresenta candidose em orofaringe. Isso ocorre pela presença de invasão local aumentando o risco de acesso à corrente sanguínea ou mesmo pelo fato de a infecção oral provavelmente refletir a proliferação fúngica nas demais áreas do trato gastrointestinal.

Vários fatores influenciam a proliferação dos microorganismos na cavidade oral. Entre eles destaca-se a ação defensiva da saliva propiciada pelos seus constituintes que apresentam ação antimicrobiana, pela sua capacidade tampão e pelo fluxo salivar (Jorge *et al.*, 1993a; Sreebny, 2000; Tanida *et al.*, 2003; Totti *et al.*, 2004; Kamagata-Kiyoura *et al.*, 2004). Nos pacientes submetidos a TCPH, o efeito combinado da doença de base, dos medicamentos utilizados, do condicionamento quimioterápico e radioterápico, das infecções orais e do desenvolvimento de DECH pode provocar alterações salivares favorecendo o crescimento fúngico (Kolbinson *et al.*, 1988; Scully, 2003; Porter *et al.*, 2004; Alborguetti *et al.*, 2005). Esse efeito deletério na saliva é mais acentuado nos pacientes que desenvolvem DECH crônica onde linfócitos T autoreativos podem provocar danos celulares nas glândulas salivares levando a uma diminuição de 55 a 90% do fluxo salivar, além de alterações na composição da saliva (Levy *et al.*, 2000; Nagler & Nagler, 2001 e 2004).

Tendo em vista a importância da colonização prévia para o desenvolvimento de infecção superficial e/ou sistêmica por *Candida*, a atuação da cavidade oral como um reservatório de espécies menos susceptíveis aos antifúngicos e a redução da capacidade protetora da saliva em decorrência da doença de base e/ou do TCPH, torna-se importante a vigilância epidemiológica objetivando identificar o perfil de colonização oral por *Candida*

dos pacientes submetidos a TCPH, e ainda, estabelecer o perfil de susceptibilidade dos isolados às drogas antifúngicas.

### 3 PROPOSIÇÃO

Com base nos dados apresentados nos propusemos a realizar coletas de saliva total não estimulada nos pacientes submetidos a transplante de células progenitoras hematopoiéticas no Hospital de Clínicas da UNICAMP no período imediado pré-transplante, durante granulocitopenia, após enxertia medular e nos dias +50 e +100, com objetivo de:

- 1) Analisar a variação do fluxo salivar;
- 2) Determinar o número de pacientes colonizados por *Candida* spp. e a sua relação com a administração de profilaxia antifúngica durante o transplante;
- 3) Quantificar o número de UFC/ml de saliva;
- 4) Verificar a relação entre o número de UFC/ml de saliva e o fluxo salivar;
- 5) Verificar a relação entre o número de UFC/ml de saliva e a presença de candidose oral;
- 6) Identificar as espécies de *Candida*;
- 7) Determinar a concentração inibitória mínima de todos os isolados de *Candida* frente ao fluconazol, itraconazol, cetoconazol e à anfotericina B.
- 8) Determinar o cariótipo eletroforético, por meio de eletroforese em campo pulsátil, dos isolados de *Candida albicans*.
- 9) Verificar a ocorrência de eventos de infecção sistêmica e infecção oral por *Candida* spp. no período do estudo além da similaridade do cariótipo eletroforético entre a cepa colonizadora e a cepa responsável por infecção.



## 4 PACIENTES E MÉTODOS

### 4.1 População e local do estudo

Foram avaliados 35 pacientes submetidos a TCPH no Serviço de Transplante de Medula Óssea (TMO) do HC da UNICAMP entre maio de 2004 a maio de 2005. Todos os pacientes foram submetidos ao condicionamento mieloablativo convencional. A fonte de células foi a medula óssea por punção da crista ilíaca do doador, ou células progenitoras periféricas obtidas por método de aférese.

Todos os doadores dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico foram irmãos com HLA (Antígeno leucocitário humano) idêntico. A profilaxia da DECH foi feita com ciclosporina e metotrexate, de acordo com os protocolos da Instituição.

Os pacientes foram mantidos em quartos simples com filtros HEPA (*high-efficiency particulate air*). A antibioticoterapia foi introduzida na presença de febre e modificada de acordo com o antibiograma e curso clínico. Ganciclovir foi administrado para pacientes com identificação prévia de citomegalovírus (CMV). Durante o TCPH, todos os pacientes receberam fluconazol em dose de 200mg/dia como profilaxia antifúngica até a enxertia medular. Posteriormente, esse medicamento foi reintroduzido para os pacientes que desenvolveram DECH.

Neste trabalho foram incluídos somente pacientes maiores de 18 anos, sem restrição de gênero, raça, condição bucal e estágio da doença de base. Foram excluídos os pacientes submetidos a TCPH não mieloablativo, e os que se recusaram a participar da pesquisa e a assinar o Termo de Consentimento Informado.

Os pacientes foram abordados após a internação na enfermaria do TMO, antes do início do condicionamento pré-TCPH. Após informação sobre a pesquisa a ser realizada, leitura, esclarecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram realizados exame físico oral e coleta de saliva total não estimulada.

As coletas de saliva foram realizadas no período pré-condicionamento (Coleta A), durante o quadro de neutropenia induzida pelo condicionamento (Coleta B), após a

recuperação medular (Coleta C), nos dias +50 e +100 após o TCPH (Coletas D e E respectivamente).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UNICAMP, sob o número 332/2003, em 19 de agosto de 2003.

#### **4.2 Exame físico oral**

O exame físico consistiu na avaliação da mucosa oral para verificação de sua integridade, identificação de lesões infecciosas, e o uso de próteses dentárias. O exame foi realizado em leito hospitalar ou no consultório odontológico, sob luz artificial, utilizando-se espátula de madeira ou espelho clínico bucal.

Os pacientes haviam sido previamente tratados no Ambulatório de Odontologia do Hemocentro/UNICAMP para a remoção de focos infecciosos (dentários e/ou periodontais) antes do condicionamento pré-TCPH, segundo protocolo da instituição.

A avaliação da mucosite oral foi feita diariamente pela equipe médica do serviço de TMO e seguiu o protocolo da Organização Mundial de Saúde sendo graduada em: Grau I: presença de eritema e de discreto desconforto; Grau II: presença de eritema e de ulceração; Grau III: presença de ulceração e intolerância à ingestão de alimentos sólidos; Grau IV: Impossibilidade de alimentação por via oral (Sonis *et al.*, 2004).

#### **4.3 Coleta das amostras**

Foram realizadas coletas de saliva total não estimulada segundo Navazesh *et al.*, 1992, em técnica descrita a seguir. As coletas foram realizadas no mínimo uma hora após qualquer refeição ou higiene bucal. Foi solicitada ao paciente a retirada de próteses dentárias removíveis imediatamente antes do procedimento.

Para as coletas foram utilizados frascos estéreis previamente pesados. No instante inicial, os pacientes foram orientados a deglutir a saliva já formada, e em seguida, a reterem na cavidade bucal a saliva produzida, depositando-a nos frascos em intervalos de

1min, no total de 5min. As amostras foram armazenadas a 4°C por no máximo 24 horas até seu processamento.

A mensuração do fluxo salivar foi realizada após verificação do peso de cada frasco contendo a amostra de saliva. O ajuste para fluxo salivar em miligramas (mg/min) foi realizado considerando-se 1g equivalente a 1ml (Navazesh *et al.*, 1992).

Nos casos em que o paciente encontrava-se entubado ou com dificuldades para realizar a coleta de saliva não estimulada, as coletas foram realizadas com zaragatoa. A zaragatoa foi friccionada sobre toda a superfície da cavidade oral e, a seguir, imersa em água destilada estéril até o processamento da amostra.

A coleta A foi realizada após internação hospitalar, antes do início da profilaxia antifúngica, antiviral ou antimicrobiana e antes do tratamento quimioterápico. A coleta B foi realizada estando o paciente em quadro de neutropenia grave, sendo a contagem de neutrófilos  $<500\text{cél/mm}^3$ . A coleta C foi realizada após a recuperação medular, caracterizada pelo número de neutrófilos  $\geq 500\text{cél/mm}^3$  por 48 horas consecutivas. As coletas D e E foram realizadas 50 e 100 dias após o TCPH, respectivamente, por serem períodos de avaliações de rotina. As duas últimas coletas foram realizadas em visita ambulatorial ou em enfermaria, dependendo da situação de cada paciente.

Uma outra coleta foi realizada na ocorrência de quadro de candidose oral (Coleta CO). O diagnóstico foi dado pela equipe médica, baseado no critério clínico, ou associado a métodos complementares como citologia exfoliativa e cultura.

#### **4.4 Processamento das amostras**

As amostras de saliva foram homogeneizadas em agitador, diluídas a 1:10 ou 1:100 em solução fisiológica estéril. Em seguida 100µl foram dispensados em duplicata em placas de Petri de cultura contendo ágar sabouraud dextrose (ASD) (Merck; Darmstadt, Alemanha), preparado segundo as instruções do fabricante, ao qual foi adicionado 50µg/ml cloranfenicol (Sigma; St Louis, MO, EUA). As amostras foram plaqueadas e incubadas em estufa de cultura a 35°C.



Quando a zaragatoa foi usada para coleta, a mesma foi friccionada sobre o meio de cultura de forma a realizar estrias de esgotamento.

#### **4.5 Quantificação de leveduras**

O número de unidades formadoras de colônias (UFC) por ml de saliva foi dado pela multiplicação da média do número de colônias das duas placas semeadas pelo fator de diluição e pela alíquota utilizada. Para a análise estatística, os valores de UFC/ml de saliva foram categorizados em 0 (UFC/ml=0), 1 (UFC/ml  $\geq 1$  e  $\leq 399$ ) e 2 (UFC/ml  $\geq 400$ ) (Epstein *et al.*, 1980; Pereira *et al.*, 2004).

#### **4.6 Identificação de leveduras**

As colônias de cada tipo morfológico foram isoladas após novo repique em ASD e armazenadas em frascos contendo água destilada estéril e mantidas à temperatura ambiente. A identificação das leveduras foi realizada por meio da análise do crescimento em meio cromogênico, formação de tubo germinativo, análise micromorfológica e perfil de assimilação de carboidratos (Sidrin & Moreira, 1999). Os isolados foram ainda submetidos a testes de crescimento a 42°C e de assimilação da xilose para descartar presença de *Candida dubliniensis* entre os isolados previamente identificados como *Candida albicans* (Kirkpatrick *et al.*, 1998; Campanha *et al.*, 2005).

##### **4.6.1 Análise do crescimento em meio cromogênico**

O meio cromogênico (CHROMagar® *Candida*; CHROMagar, Paris, França) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, distribuído em placas de Petri descartáveis estocadas a 4°C e protegidas de luz (Odds & Bernaerts, 1994). As amostras foram semeadas e mantidas a 35°C por 48 horas. As colônias de coloração verde foram previamente identificadas como *Candida albicans*. As colônias que apresentaram as demais cores foram consideradas como *Candida* não *albicans* (Willinger & Manafi, 1999).

#### **4.6.2 Formação do tubo germinativo**

Uma alça de cada amostra foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 2 ml de soro fetal bovino, criando uma suspensão ligeiramente turva. A solução foi incubada em estufa de cultura a 37°C por 3 horas, e a cada 1 hora, uma gota da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula e examinada sob microscopia óptica. Foi considerado tubo germinativo a presença de um filamento fino paralelo ao blastoconídeo, e sem contricções seja na sua base ou na sua extensão (Kern, 1985). A positividade neste teste foi indicativa de *Candida albicans* ou *Candida dubliniensis*.

#### **4.6.3 Análise micromorfológica (microcultivo)**

O meio ágar-fubá (Difco; Detroit, MI, EUA) foi preparado segundo as instruções do fabricante e armazenado em alíquotas de 3ml em tubos de ensaio. Para o uso, o meio foi aquecido e dispensado em lâminas histológicas. O isolado a ser analisado foi semeado na forma de 2 estrias sobre o meio e coberto com lamínula. O conjunto foi depositado em placas de Petri estéreis, juntamente com algodão embebido em água destilada para manter a umidade do meio. O material foi mantido em temperatura ambiente por 72h e analisado sob microscopia de luz. A presença de clamidósporo foi confirmatória de *Candida albicans* ou *Candida dubliniensis* (Kern, 1985). Isolados com análise micromorfológica sugestiva de espécies não *albicans* foram submetidos à análise do perfil de assimilação de carboidratos.

#### **4.6.4 Identificação de leveduras utilizando cartões YBC do VITEK®**

O inóculo foi preparado utilizando amostras com 48h de crescimento em ASD. Em seguida a solução foi inserida nos cartões YBC (*Yeast Biochemical System*) e incubadas a 35°C. A leitura foi realizada no sistema VITEK® (BioMérieux; Marcy-l'Etoile, França) após 24h estendendo por 48h quando necessário. Os casos onde a identificação final não pôde ser realizada, testes adicionais sugeridos pelo próprio programa foram realizados como microfilamentação em ágar-fubá e crescimento em meio contendo ciclohexamida.

#### 4.6.5 Análise do crescimento a 42°C

Os isolados foram semeados em meio ASD na forma de 3 estrias descontínuas. A leitura foi realizada após 48h e foi considerado positivo o isolado que teve crescimento. Os isolados que não exibiram crescimento ou tiveram crescimento parcial caracterizado por discreto crescimento somente na primeira estria foram consideradas sugestivas de *Candida dubliniensis* (Kirkpatrick *et al.* 1998; Campanha *et al.*, 2005). Durante esse experimento, amostras padrão de *Candida albicans* (ATCC 90028) e de *Candida dubliniensis* (CBS 7987) foram usadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

#### 4.6.6 Prova de assimilação da xilose

Para esta prova foi preparado meio basal contendo 5g de sulfato de amônia (Nuclear; Diadema, SP, Brasil), 1g de fosfato de potássio monobásico (Nuclear; Diadema, SP, Brasil), 0,5g de sulfato de magnésio (Synth; Diadema, SP, Brasil), e 20g de Agar (Merck; Darmstadt, Alemanha) para 1L de água destilada.

Para a prova foi preparado um inóculo da levedura equivalente ao padrão 5 na escala MacFarland em 2ml de água destilada estéril. Em seguida, alíquotas de 1ml do inóculo foram vertidas em placas de Petri estéreis juntamente com 20ml do meio basal previamente esterilizado e liquefeito. Após solidificação, pequenas alíquotas de xilose (Vetec; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram colocados na superfície do meio com auxílio de espátula de madeira estéril. Para testar a viabilidade do inóculo, foi utilizada a dextrose (Synth; Diadema, SP, Brasil). Após incubação a 35°C por 48 horas a leitura foi realizada pela observação ou não de halo de crescimento ao redor dos açúcares (Sidrim & Moreira, 1999). A não assimilação da xilose foi considerada sugestiva para *Candida dubliniensis*. Durante esse experimento, amostras padrão de *Candida albicans* (ATCC 90228) e de *Candida dubliniensis* (CBS 7987) foram usadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

#### 4.7 Teste de susceptibilidade a antifúngicos

O teste de susceptibilidade frente aos antifúngicos foi realizado em todos os isolados por meio do método de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações do protocolo M27-A2 (CLSI (NCCLS), 2002). Para o controle de qualidade, os testes foram realizados em duplicata e *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Investigação em Fungos do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina da UNICAMP, foram testadas em cada ensaio.

##### 4.7.1 Antifúngicos

Foram testados fluconazol (Gerbras; São Paulo, SP, Brasil), itraconazol (Galena; Campinas, SP, Brasil), cetoconazol (Galena; Campinas, SP, Brasil) e anfotericina B (Fungizon®; Bristol-Myers Squibb; São Paulo, SP, Brasil).

Para cada espécie de *Candida* foram testadas as seguintes diluições: *Candida albicans*: fluconazol 0,06 a 32µg/ml, itraconazol 0,015 a 8µg/ml, cetoconazol 0,007 a 4µg/ml e anfotericina B 0,03 a 16µg/ml; *Candida krusei*: fluconazol 0,25 a 128µg/ml, itraconazol 0,015 a 8µg/ml, cetoconazol 0,03 a 16µg/ml e anfotericina B 0,03 a 16µg/ml; demais espécies: fluconazol 0,125 a 64µg/ml, itraconazol 0,015 a 8µg/ml, cetoconazol 0,007 a 4µg/ml e anfotericina B 0,03 a 16µg/ml.

##### 4.7.2 Solução estoque

Para preparo da solução estoque, 12,8mg de cada droga foram dissolvidos em 1ml de dimetil sulfoxido (DMSO) (Wako; Japão), com exceção da anfotericina B, que por ter sido utilizada na forma injetável, foi dissolvida em água destilada estéril.

A concentração estoque de 12800µg/ml foi diluída para 1280µg/ml para o fluconazol, 160µg/ml para cetoconazol e anfotericina B, e 80µg/ml para o itraconazol. Em seguida, diluições seriadas na razão 1:2 foram realizadas com objetivo de se obter 10

concentrações diferentes para cada antifúngico testado. Ao serem adicionados na placa teste, as drogas sofreram nova diluição de 1:10 (Alves, 2004).

#### **4.7.3 Meio de cultura**

O meio de cultura foi preparado utilizando 10,40g de RPMI-1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (Gibco; Grand Island, NY, EUA), suplementado com 2% de dextrose e 34,53g de ácido morfilenopropanosulfônico (MOPS) (USB; Cleveland, Ohio, EUA) para 800ml de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 7,0 com uso de solução de 1M NaOH (Merck; Darmstadt, Alemanha) e a solução foi filtrada a vácuo (Corning, NY, EUA) (NCCLS, 2002).

#### **4.7.4 Preparo do inóculo**

Uma alça do microorganismo foi dissolvida em 5 ml de água destilada estéril. Após homogeneização, 100µl da solução foram transferidos para um tubo contendo 4,9ml de água destilada estéril, representando uma diluição de 1:50. Em seguida, a contagem do número de células foi realizada em câmara de Newbauer. A partir do número de células contadas foi realizada uma nova diluição, para que fosse obtida a concentração final de  $1 \times 10^4$  UFC/ml. Essa concentração final pôde ser obtida pela aplicação da seguinte fórmula:  $n \times 10^4 \times 1/n = 1 \times 10^4$  UFC/ml. Ao ser adicionado na placa de teste, o inóculo sofreu diluição de 1:10, restando um inóculo final de  $1 \times 10^3$  UFC/ml (Alves, 2004).

#### **4.7.5 Preparo da placa de microdiluição**

Foram utilizadas placas de microtitulação estéreis de 96 poços com fundo em “U” (Labcenter; Campinas, SP, Brasil). Nos poços numerados de 1 a 10 foram adicionados 20µl da drogas em 10 concentrações diferentes em ordem decrescente, previamente diluídas. Em seguida, foram adicionados 160µl de RPMI em todos os poços. Por último,

20µl do inóculo foram adicionados em todos os poços, exceto no poço de número 11 que serviu como controle negativo.

#### 4.7.6 Análise dos resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As leituras foram realizadas após 48h de incubação a 35°C com auxílio de um espelho de leitura. Para a anfotericina B, a CIM foi identificada como a menor concentração de antifúngico livre de crescimento da levedura (CLSI, 2002).

Para os azóis fluconazol, itraconazol e cetoconazol, que apresentam o fenômeno de crescimento residual, foi determinada a menor concentração capaz de induzir inibição em torno de 80%. Para isto, 40µl da solução do controle positivo (crescimento sem presença da droga) foram transferidos para o controle negativo (somente o meio de cultura), obtendo-se uma diluição de 1:5. Após homogeneização com micropipeta, a turvação encontrada nos poços foi comparada com a turvação do novo controle de crescimento. A menor concentração da droga em que a turvação foi menor do que a do novo controle foi considerada a CIM (Espinel-Ingroff *et al.*, 1994; CLSI, 2002).

Os critérios utilizados com diretrizes para interpretação do perfil de susceptibilidade estão descritos no Quadro 1 (Rex *et al.*, 1997; Milan *et al.*, 1998; CLSI 2002).

Quadro 1. Diretrizes de interpretação da susceptibilidade *in vitro* de *Candida* spp. frente ao fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B.

| Susceptibilidade | Antifúngicos – CIMs (µg/mL) |             |             |                |
|------------------|-----------------------------|-------------|-------------|----------------|
|                  | fluconazol                  | itraconazol | cetoconazol | anfotericina B |
| Sensível         | ≤ 8                         | ≤ 0,125     | ≤ 0,125     | ≤ 1            |
| S-DD             | 16 - 32                     | 0,25 - 0,5  | 0,25 e 0,5  |                |
| Resistente       | ≥ 64                        | ≥ 1         | ≥ 1         | ≥ 2            |

CIM= Concentração inibitória mínima; S-DD= Susceptibilidade dependente da dose

#### 4.8 Cariotipagem eletroforética

A cariotipagem dos isolados de *Candida albicans* foi realizada por meio do PFGE utilizando o sistema CHEF-DR® III (*contour-clamped homogeneous electric field*; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) (Branchini *et al.*, 1994).

##### 4.8.1 Extração do DNA

O ácido desoxirribonucléico (DNA) foi extraído de amostras de *Candida albicans* com 48 horas de crescimento a 35°C em ASD.

Cinco a 10 colônias foram inoculadas em 10 mL de caldo YEPD preparado com 1% de extrato de levedura (Difco; Detroit, Michigan, USA), 1% de dextrose, e 2% de peptona bacteriológica (Oxoid; Basingsyoe, Hampshire, Inglaterra) em água destilada, e mantidas por 12 horas a 30°C sob agitação. Após centrifugação a 4°C por 15min (3000rpm) o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado. Desta solução, 150µl foram retirados e centrifugados a 10000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado com 200µl de EDTA 50mM (pH 8,0) (Invitrogen; Carlsbad, EUA). Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 150µl de EDTA 50mM (pH 8,0) foi adicionado e o sedimento ressuspensionado. A essa solução foram adicionados 80µl de solução de Lyticase (1.250U/ml em 50% de glicerol [vol/vol] e NaHPO<sub>4</sub> 0,01M pH 7,5 [Sigma; St. Louis, Mo, EUA]) e incubados a 37 °C durante 20 min.

Em seguida, 560µl de agarose de baixo ponto de fusão a 1% (*Agarose low melt*; BioAgency; Florida, EUA) foram adicionados aos tubos contendo o lisado de células. Este preparado foi dispensado em moldes de acrílico para o preparo de blocos de gel de agarose e mantidos sob refrigeração a 4°C por 15 minutos para solidificação.

Em seguida, os blocos foram colocados em poços de placas de cultura de células contendo 50µl de Proteinase K a 1mg/ml (Invitrogen; Carlsbad, EUA) diluída em 950µL de tampão NET (1ml de Tris 1M pH 7,5 [Gibco, Grand Island, NY, EUA], 90ml de EDTA 0,5M pH8,0, e 10mL de solução de N-Lauroylsarcosine a 1% [Sigma, St Louis, MO, EUA]). As placas foram mantidas em estufa a 50°C por no mínimo 12 horas.

Após remoção da solução, os blocos foram lavados três vezes com solução de EDTA 50mM pH 8,0 com intervalos de 1 hora. Posteriormente, foram mantidos a temperatura ambiente por 24 horas e lavados duas vezes com a mesma solução com intervalo de 1 hora entre cada lavagem. Até o momento do uso, os blocos de agarose foram mantidos em EDTA 50mM pH 8,0 a 4°C por no máximo 6 meses.

#### **4.8.2 Eletroforese em campo pulsátil (PFGE)**

Após lavagem com EDTA 0,05M pH8,0, os blocos de agarose contendo o DNA foram dispostos sequencialmente no pente. A seguir, uma solução contendo 0,8% de agarose para cariotipagem (*Agarose grau pulsed field cromossomal*; BioAgency, Florida, EUA), foi adicionado no suporte. Em cada corrida, um marcador de peso molecular de *Saccharomyces cerevisiae* (*Yeast Chromosome PFG Marker*; BioLabs) foi utilizado.

A corrida eletroforética foi realizada em duas etapas, sendo que na primeira etapa o tempo de inversão inicial e final foi de 120s com duração de 18h, e na segunda etapa, o tempo de inversão inicial e final foi de 240s com duração de 22h. Durante a corrida, foi utilizada a voltagem de 4,0volts/cm, e o ângulo de incidência da corrente elétrica foi de 120°. O tampão usado foi TBE 0,5X preparado com 54g de Tris ultra puro, 27,5g de ácido bórico (Synth; Diadema, SP, Brasil), e 10ml de EDTA 0,5M pH8,0 para volume final de 10L de água destilada, e foi mantido a 14°C durante a corrida.

Após o término da corrida o gel foi corado com solução de brometo de etídio na concentração de 0,5µg/ml durante 1 hora e fotografado no transiluminador sob luz ultravioleta (Vilbert-Loumart, Marle-la-Valle, França).

#### **4.8.3 Análise do cariótipo**

A análise do cariótipo foi realizada através da análise visual comparativa e do programa computacional Biogene (Vilbert-Loumart, Marle-la-Valle, França). A similaridade do perfil de bandas foi estimada pelo Coeficiente de Similaridade de Dice (CSD), e os grupamentos foram determinados por UPGMA (*Unweighted Paired Group*



*Method using Arithmetic Averages*). O CSD segue a seguinte fórmula:  $CSD = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$ , onde  $n_x$ =número de bandas da coluna “x”;  $n_y$ =número de bandas na coluna “y”; e  $n_{xy}$ =número de bandas compartilhadas entre as colunas “x” e “y”. Neste estudo foi considerando a percentagem de similaridade de 95%.

#### **4.9 Análise estatística**

Os dados obtidos foram digitados em planilha eletrônica (Excel® 2000, Microsoft, EUA) e analisados com auxílio dos programas SAS (SAS, EUA) e Minitab (Minitab, EUA). A influência da idade, da doença de base e do condicionamento no fluxo salivar foi avaliada por meio da análise de modelos lineares generalizados com uso de "stepwise". Para as demais análises foi utilizado o teste Kruskal-Wallis para variáveis contínuas e o teste Qui-quadrado de Pearson para variáveis categóricas. Para determinação da relação entre o fluxo salivar e o número de UFC/ml foi realizada regressão logística. Neste trabalho, o valor de corte para o p-valor foi de 0,05, sendo considerados estatisticamente significativos valores iguais ou menores que esse.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Características demográficas e clínicas**

No período do estudo 44 pacientes foram admitidos na Unidade de TMO. Destes, 4 foram excluídos por terem sido submetidos a TCPH não mieloablativo, 1 por ter menos que 18 anos, 2 por não concordarem em participar da pesquisa e 2 por terem iniciado a profilaxia antifúngica antes da abordagem inicial.

Todos os pacientes submetidos a TCPH Alogênico receberam profilaxia de DECH com metotrexate e ciclosporina. Destes pacientes, 3 (14,3%) desenvolveram DECH aguda.

As demais características demográficas e clínicas dos 35 pacientes que foram incluídos neste estudo estão descritas nas Tabelas 1, 2 e 3.

**Tabela 1**  
**Distribuição dos pacientes estudados de acordo com as características demográficas**

|                                                | TCPH<br>Alogênico<br>n=21 | TCPH<br>Autólogo<br>n=14 | Total<br>n=35 | Valor de p |
|------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------|------------|
| Número (%)                                     | 21 (60,0)                 | 14 (40,0)                | 35 (100,0)    |            |
| Idade (anos)                                   |                           |                          |               |            |
| Mediana (min-máx)                              | 38 (21-60)                | 48,5 (28-71)             | 44 (21-71)    | 0,008      |
| Gênero, pacientes (%)                          |                           |                          |               |            |
| Masculino                                      | 13 (61,9)                 | 9 (64,3)                 | 22 (62,9)     | 0,886      |
| Feminino                                       | 8 (38,1)                  | 5 (35,7)                 | 13 (37,1)     |            |
| Doença de base, pacientes (%)                  |                           |                          |               |            |
| Anemia Aplásica                                | 1 (4,8)                   | 0 (0,0)                  | 1 (2,9)       |            |
| Leucemia Mielóide Aguda                        | 5 (23,8)                  | 0 (0,0)                  | 5 (14,3)      |            |
| Leucemia Mielóide Crônica                      | 7 (33,3)                  | 0 (0,0)                  | 7 (20,0)      |            |
| Leucemia Linfocítica Aguda                     | 8 (38,1)                  | 0 (0,0)                  | 8 (22,9)      |            |
| Leucemia Linfocítica Crônica                   | 0 (0,0)                   | 1 (7,2)                  | 1 (2,9)       |            |
| Linfoma de Hodgkin                             | 0 (0,0)                   | 3 (21,5)                 | 3 (8,5)       |            |
| Linfoma não Hodgkin                            | 0 (0,0)                   | 6 (42,8)                 | 6 (17,1)      |            |
| Mieloma Múltiplo                               | 0 (0,0)                   | 4 (28,5)                 | 4 (11,4)      |            |
| Tipo de transplante, pacientes (%)             |                           |                          |               |            |
| Medula óssea                                   | 7 (33,5)                  | 0 (0,0)                  | 7 (20,0)      | 0,027      |
| Sangue periférico                              | 14 (66,5)                 | 14 (100,0)               | 28 (80,0)     |            |
| Condicionamento, pacientes (%)                 |                           |                          |               |            |
| Bussulfano+ciclofosfamida                      | 13 (61,9)                 | 0 (0,0)                  | 13 (37,1)     |            |
| Irradiação corporal total+bussulfano+VP-16     | 8 (38,1)                  | 0 (0,0)                  | 8 (22,8)      |            |
| Melfalano                                      | 0 (0,0)                   | 4 (28,4)                 | 4 (11,4)      |            |
| Melfalano+VP-16+BCNU+Ara-C                     | 0 (0,0)                   | 7 (50,0)                 | 7 (20,0)      |            |
| Melfalano+VP-16+BCNU+Ara-C+ <u>alemtuzumab</u> | 0 (0,0)                   | 1 (7,2)                  | 1 (2,9)       |            |
| Melfalano+VP-16+BCNU+Ara-C+rituximab           | 0 (0,0)                   | 1 (7,2)                  | 1 (2,9)       |            |
| Melfalano+alemtuzumab+mitoxantrona             | 0 (0,0)                   | 1 (7,2)                  | 1 (2,9)       |            |

TCPH=transplante de células progenitoras hematopoiéticas; BCNU=1,3-bis-(2-chloroetil)-1-nitrosourea; VP-16=Etoposida; Ara-C=citarabina.

**Tabela 2**  
Distribuição dos pacientes estudados de acordo com características clínicas

|                                     | TCPH<br>Alogênico<br>n=21 | TCPH<br>Autólogo<br>n=14 | Total<br>n=35 | Valor de p |
|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------|------------|
| Duração da neutropenia (dias)       |                           |                          |               |            |
| Mediana (mín-máx)                   | 17 (4-27)                 | 9 (5-26)                 | 15 (4-27)     | 0,008      |
| Presença de mucosite, pacientes (%) | 19 (90,5)                 | 7 (50,0)                 | 26 (74,3)     | 0,015      |
| Grau I                              | 1 (5,3)                   | 2 (28,6)                 | 3 (11,5)      | 0,001      |
| Grau II                             | 4 (21,0)                  | 2 (28,6)                 | 6 (23,1)      |            |
| Grau III                            | 0 (0,0)                   | 2 (28,6)                 | 2 (7,7)       |            |
| Grau IV                             | 14 (73,7)                 | 1 (14,2)                 | 15 (57,7)     |            |
| Duração da mucosite (dias)          |                           |                          |               |            |
| Mediana (mín-máx)                   | 16 (8-29)                 | 11 (6-23)                | 16 (6-29)     | 0,056      |
| Uso de NP, pacientes (%)            | 16 (76,2)                 | 4 (28,5)                 | 20 (57,1)     | 0,013      |
| Duração da NP (dias)                |                           |                          |               |            |
| Mediana (mín-máx)                   | 12,5 (4-24)               | 14,5 (10-19)             | 14 (4-24)     | 0,538      |
| Antibioticoterapia, pacientes (%)   | 20 (95,3)                 | 13 (92,9)                | 33 (94,3)     | 0,660      |
| Antibioticoterapia (dias)           |                           |                          |               |            |
| Mediana (mín-máx)                   | 21 (2-54)                 | 13 (4-25)                | 19 (2-54)     | 0,013      |
| Anfotericina B, pacientes (%)       | 9 (42,9)                  | 5 (35,7)                 | 14 (40,0)     | 0,944      |
| Uso empírico                        | 8 (88,9)                  | 3 (60,0)                 | 11 (78,6)     | 0,574      |
| Uso profilático                     | 1 (11,1)                  | 2 (40,0)                 | 3 (21,4)      |            |
| Óbito, pacientes (%)                | 11 (52,4)                 | 4 (28,5)                 | 15 (42,8)     | 0,302      |
| Causa de óbito                      |                           |                          |               |            |
| Infecção bacteriana                 | 8 (72,7)                  | 1 (25,0)                 | 9 (60,0)      |            |
| Pneumonia fúngica                   | 0 (0,0)                   | 1 (25,0)                 | 1 (6,6)       |            |
| Hemorragia em SNC                   | 1 (9,1)                   | 0 (0,0)                  | 1 (6,6)       |            |
| Síndrome da obstrução sinusoidal    | 1 (9,1)                   | 0 (0,0)                  | 1 (6,6)       |            |
| Recidiva                            | 0 (0,0)                   | 1 (25,0)                 | 1 (6,6)       |            |
| Encefalite herpética                | 0 (0,0)                   | 1 (25,0)                 | 1 (6,6)       |            |
| Insuficiência cardíaca              | 1 (9,1)                   | 0 (0,0)                  | 1 (6,6)       |            |
| Dias entre TCPH e óbito             |                           |                          |               |            |
| Mediana (mín-máx)                   | 15 (3-86)                 | 24,5 (12-27)             | 23 (3-86)     | 0,647      |

TCPH=transplante de células progenitoras hematopoiéticas; NP=nutrição parenteral; SNC=sistema nervoso central

Tabela 3  
Quadros infecciosos apresentados pelos pacientes estudados

|                                     | TCPH<br>Alogênico<br>n=21 | TCPH<br>Autólogo<br>n=14 | Total<br>n=35 | Valor de p |
|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------|------------|
| Infecções bacterianas               |                           |                          |               |            |
| ICS, eventos (%)                    | 16 (69,5)                 | 7 (30,5)                 | 23 (100,0)    | 0,031      |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>     | 0 (0,0)                   | 1 (14,3)                 | 1 (4,3)       |            |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>   | 3 (18,75)                 | 1 (14,3)                 | 4 (17,4)      |            |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | 3 (18,75)                 | 1 (14,3)                 | 4 (17,4)      |            |
| <i>Corynebacterium jeikeium</i>     | 2 (12,5)                  | 1 (14,3)                 | 3 (13,1)      |            |
| <i>Enterococcus faecalis</i>        | 1 (6,25)                  | 0 (0,0)                  | 1 (4,3)       |            |
| <i>Escherichia coli</i>             | 3 (18,75)                 | 0 (0,0)                  | 3 (13,1)      |            |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 1 (6,25)                  | 0 (0,0)                  | 1 (4,3)       |            |
| <i>Enterobacter coaccae</i>         | 1 (6,25)                  | 0 (0,0)                  | 1 (4,3)       |            |
| <i>Acinetobacter lwoufi</i>         | 1 (6,25)                  | 1 (14,3)                 | 2 (8,7)       |            |
| <i>Burkholderia cepacia</i>         | 1 (6,25)                  | 1 (14,3)                 | 2 (8,7)       |            |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>        | 0 (0,0)                   | 1 (14,3)                 | 1 (4,3)       |            |
| Infecções em cateter, eventos (%)   | 2 (100,0)                 | 0 (0,0)                  | 2 (100,0)     |            |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i>  | 1 (50,0)                  | 0 (0,0)                  | 1 (50,0)      |            |
| <i>Acinetobacter lwoufi</i>         | 1 (50,0)                  | 0 (0,0)                  | 1 (50,0)      |            |
| Sinusite, eventos (%)               | 1 (100,0)                 | 0 (0,0)                  | 1 (100,0)     |            |
| <i>Burkholderia cepacia</i>         | 1 (100,0)                 | 0 (0,0)                  | 1 (100,0)     |            |
| Infecção urinária, eventos (%)      | 1 (50,0)                  | 1 (50,0)                 | 2 (100,0)     |            |
| <i>Escherichia coli</i>             | 1 (50,0)                  | 1 (50,0)                 | 2 (100,0)     |            |
| Outros, eventos (%)                 | 7 (50,0)                  | 7 (50,0)                 | 14 (100,0)    |            |
| Febre de origem indeterminada       | 6 (85,7)                  | 4 (57,1)                 | 10 (71,4)     |            |
| Sepsis                              | 0 (0,0)                   | 1 (14,3)                 | 1 (7,1)       |            |
| Pneumonia                           | 1 (14,3)                  | 2 (28,6)                 | 3 (21,5)      |            |
| Infecções fúngicas, eventos (%)     | 5 (83,5)                  | 1 (16,5)                 | 6 (100,0)     |            |
| Candidose oral                      | 3 (60,0)                  | 1 (100,0)                | 4 (66,7)      |            |
| Candidemia                          | 1 (20,0)                  | 0 (0,0)                  | 1 (16,7)      |            |
| Microabscessos hepáticos            | 1 (20,0)                  | 0 (0,0)                  | 1 (16,7)      |            |
| Infecções virais, eventos (%)       | 17 (89,5)                 | 2 (10,5)                 | 19 (100,0)    |            |
| Citomegalovírus                     | 11 (64,7)                 | 0 (0,0)                  | 11 (57,9)     |            |
| Adenovírus                          | 1 (5,9)                   | 0 (0,0)                  | 1 (5,3)       |            |
| Herpes simples                      | 5 (29,4)                  | 0 (0,0)                  | 5 (26,3)      |            |
| Herpes zoster                       | 0 (0,0)                   | 2 (100,0)                | 2 (10,5)      |            |

TCPH=transplante de células progenitoras hematopoiéticas; ICS= Infecção de corrente sanguínea.

## 5.2 Condição oral

Dos 35 pacientes avaliados, 6 faziam uso de próteses dentárias, sendo 4 deles pertencentes ao grupo TCPH Alogênico e 2 do TCPH Autólogo. Dois pacientes eram desdentados totais e não usavam prótese (1 do TCPH Alogênico e 1 do TCPH Autólogo). Um paciente do TCPH Autólogo fazia uso de prótese removível com função obturadora devido à presença de comunicação buco-nasal em consequência do desenvolvimento de Linfoma T/NK (Tabela 4).

Vinte e um (60,0%) dos 35 pacientes incluídos neste estudo apresentaram alguma queixa em relação à cavidade bucal em pelo menos um dos períodos de coleta, sendo a xerostomia (45,5%) a queixa mais freqüente, seguida de sialorréia (27,3%). Desses pacientes, 14 eram do TCPH Alogênico e 7 do TCPH Autólogo (Tabela 4).

Dentre os processos infecciosos, infecção pelo herpes simples vírus (HSV) foi encontrada em 5 pacientes. Destes, 3 apresentaram herpes intra-oral associada com quadro de mucosite grave durante o TCPH e 2 apresentaram herpes labial no período pós-enxertia. A presença de infecção por HSV associada à mucosite foi confirmada pela realização de citologia exfoliativa. Manifestação oral de candidose foi encontrada em 4 pacientes, sendo todos os casos no período pós-enxertia (Tabela 4). Dos pacientes que apresentaram infecção oral apenas um, submetido a TCPH Alogênico, apresentou infecção por HSV e *Candida*. Entretanto, a infecção por HSV foi observada no período pré-enxertia e a infecção por *Candida* foi observada no período pós-enxertia.

Tabela 4  
Condição bucal durante o período do estudo

|                                                     | TCPH<br>Alogênico<br>n=21 | TCPH<br>Autólogo<br>n=14 | Total<br>n=35 | Valor de p |
|-----------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------|------------|
| Desdentado total sem uso de próteses, pacientes (%) | 1 (4,7)                   | 1 (7,1)                  | 2 (5,7)       | 0,660      |
| Uso de próteses removíveis, pacientes (%)           | 4 (19,0)                  | 2 (14,3)                 | 6 (17,1)      | 0,928      |
| Prótese total                                       | 1 (25,0)                  | 2 (100,0)                | 3 (50,0)      |            |
| Prótese parcial removível                           | 2 (50,0)                  | 0 (0,0)                  | 2 (33,3)      |            |
| Prótese total e prótese parcial removível           | 1 (25,0)                  | 0 (0,0)                  | 1 (16,7)      |            |
| Aparelho removível obturador, pacientes (%)         | 0 (0,0)                   | 1 (7,1)                  | 1 (2,8)       | 0,838      |
| Queixas, pacientes (%)                              | 14 (66,7)                 | 7 (50,0)                 | 21 (60,0)     | 0,532      |
| Queixas, eventos (%)                                | 25 (75,7)                 | 8 (24,3)                 | 33 (100,0)    |            |
| Xerostomia                                          | 12 (48,0)                 | 3 (37,5)                 | 15 (45,5)     |            |
| Sialorréia                                          | 8 (32,0)                  | 1 (12,5)                 | 9 (27,3)      |            |
| Aumento da viscosidade da saliva                    | 3 (12,0)                  | 3 (37,5)                 | 6 (18,2)      |            |
| Diminuição da função gustativa                      | 1 (4,0)                   | 1 (12,5)                 | 2 (6,0)       |            |
| Ardência bucal                                      | 1 (4,0)                   | 0 (0,0)                  | 1 (3,0)       |            |
| Herpes simples, pacientes (%)                       | 5 (23,8)                  | 0 (0,0)                  | 5 (14,3)      |            |
| Período pré-enxertia                                | 3 (60,0)                  | 0 (0,0)                  | 3 (8,5)       |            |
| Período pós-enxertia (herpes labial)                | 2 (40,0)                  | 0 (0,0)                  | 2 (5,7)       |            |
| Candidose oral, pacientes (%)                       | 3 (14,3)                  | 1 (7,1)                  | 4 (11,4)      | 0,914      |
| Período pré-enxertia                                | 0 (0,0)                   | 0 (0,0)                  | 0 (0,0)       |            |
| Período pós-enxertia                                | 3 (100,0)                 | 1 (100,0)                | 4 (100,0)     |            |

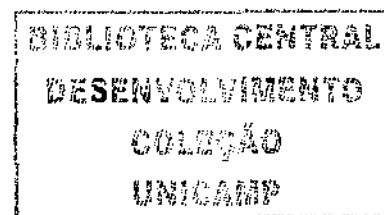
TCPH=transplante de células progenitoras hematopoiéticas.

### 5.3 Coletas

Foram realizadas 135 coletas, sendo 125 (92,6%) coletas de saliva total não estimulada e 10 (7,4%) esfregaços com zaragatoa. Uma coleta extra foi realizada no paciente 21 do TCPH Alogênico entre as coletas D e E (dia +68) devido à evidência clínica de candidose oral (Coleta 21CO). Os valores referentes a esta coleta não foram usados para determinação do fluxo salivar e do número de UFC/ml de saliva.

Dos 21 pacientes submetidos a TCPH Alogênico foram coletadas 75 amostras, sendo 68 coletas de saliva total não estimulada e 7 com zaragatoa. Das coletas programadas, 29 não foram realizadas por motivo de óbito de 11 pacientes e 1 coleta não foi realizada devido à ausência do paciente no dia da coleta. Dos 21 pacientes analisados, somente de 9 (42,8%) foram realizadas as 5 coletas previstas (Anexo 1).

Dos 14 pacientes submetidos a TCPH Autólogo foram coletadas 59 amostras, sendo 56 coletas de saliva total não estimulada e 3 com zaragatoa. Das coletas programadas, 10 não foram realizadas em decorrência da morte de 4 pacientes e 1 coleta não foi realizada devido à ausência do paciente. Dos 14 pacientes analisados, somente de 9 (64,3%) pacientes foram realizadas as 5 coletas previstas (Anexo 2).





#### 5.4 Fluxo salivar

O fluxo salivar obtido nos diferentes períodos de coleta exibiu uma variação estatisticamente significativa tanto nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico ( $p=0,0003$ ), quanto nos pacientes submetidos a TCPH Autólogo ( $p=0,0058$ ). Comparando os grupos em cada período de coleta, diferença estatisticamente significativa foi observada na coleta E ( $p=0,009$ ) (Tabela 5). Os valores obtidos em cada período de coleta estão descritos nos Anexos 1 e 2.

Na análise dos fatores que poderiam influenciar o fluxo salivar, a idade foi o único fator que mostrou estar associado com a variação do fluxo ( $p=0,0055$ ) nos pacientes do grupo Alogênico. Diferente do que foi observado no grupo anterior, o fator doença foi o único associado com a variação do fluxo salivar ( $p<0,0001$ ) nos pacientes submetidos a TCPH Autólogo.

No grupo TCPH Alogênico, a curva das medianas do fluxo salivar foi caracterizada por um aumento durante as coletas B e C, seguida de diminuição nas coletas subsequentes, sendo que o valor da coleta E foi menor do que o obtido na coleta inicial (Figura 1). No grupo TCPH Autólogo, foi verificada uma diminuição do valor da mediana do fluxo salivar na coleta B, seguida de aumento nas coletas subsequentes, retornando ao valor da coleta inicial (Figura 1). A presença e o grau de mucosite foram testados quanto à sua relação com o fluxo salivar obtido durante as B e C de ambos os grupos mas não houve relação estatisticamente significativa ( $p=0,308$ ).

Em 5 (14,3%) pacientes foram verificados valores de fluxo salivar  $\leq 0,1\text{ml/min}$ , indicativos de hipossalivação. Esses valores foram verificados somente em 1 coleta de cada paciente, com exceção de 1 paciente que apresentou hipossalivação em 2 coletas. Três pacientes pertenciam ao grupo TCPH Alogênico e 2 ao grupo TCPH Autólogo (Anexos 1 e 2). Destes pacientes, 3 (60%) apresentaram queixa de xerostomia e 1 (20%) apresentou queixa de aumento da viscosidade da saliva.

Tabela 5  
Medianas dos valores do fluxo salivar dos pacientes submetidos a TCPH  
Alogênico e Autólogo nos diferentes períodos de estudo

| Períodos de coleta | TCPH Alogênico<br>Mediana (mín-máx)<br>ml/min | TCPH Autólogo<br>Mediana (mín-máx)<br>ml/min | Valor de p |
|--------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|------------|
| Coleta A           | 0,260 (0,106-0,844)<br>n= 21                  | 0,480 (0,048-1,176)<br>n= 14                 | 0,077      |
| Coleta B           | 0,448 (0,192-1,330)<br>n= 14                  | 0,222 (0,110-0,742)<br>n=13                  | 0,062      |
| Coleta C           | 0,543 (0,160-1,192)<br>n= 12                  | 0,311 (0,078-0,638)<br>n=10                  | 0,086      |
| Coleta D           | 0,290 (0,090-1,416)<br>n= 12                  | 0,495 (0,096-0,912)<br>n=10                  | 0,056      |
| Coleta E           | 0,158 (0,070-0,580)<br>n= 9                   | 0,478 (0,216-1,242)<br>n=9                   | 0,009*     |

TCPH= Transplante de células progenitoras hematopoiéticas; (\*) valores estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ).

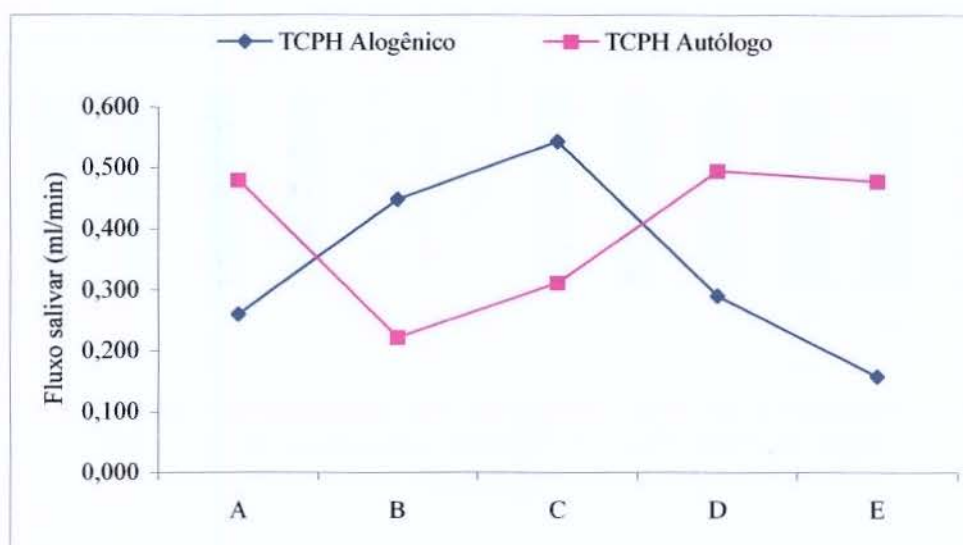


Figura 1 – Representação das medianas do fluxo salivar (ml/min) por período de coleta no pacientes submetidos a TCPH Alogênico e Autólogo

### 5.5 Colonização da cavidade oral por *Candida* spp.

Do total de 135 coletas realizadas, 134 foram utilizadas para essa análise. A exceção foi a coleta 21CO descrita no item 5.3. Os valores de UFC/ml de saliva foram calculados independentemente da evidência clínica de infecção.

Colonização por *Candida* foi observada em 20 (57,1%) dos 35 pacientes estudados, sendo 11 (52,4%) dos 21 dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico e 9 (64,3%) dos 14 pacientes submetidos a TCPH Autólogo.

Das 75 amostras obtidas dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico, 27 (36%) foram positivas para *Candida* (Anexo 3). Neste grupo houve variação no percentual de pacientes colonizados/infectados em cada período de estudo, a qual foi caracterizada por uma diminuição na coleta B seguida de aumento nas coletas subsequentes (Figura 2).

Nos pacientes submetidos a TCPH Autólogo, das 59 amostras obtidas, 19 (32,2%) foram positivas para *Candida* (Anexo 4). Nesse grupo nenhuma evidência de colonização foi observada durante as coletas B e C. Nas coletas subsequentes, o percentual de pacientes colonizados foi similar ao percentual encontrado na coleta A (Figura 2).

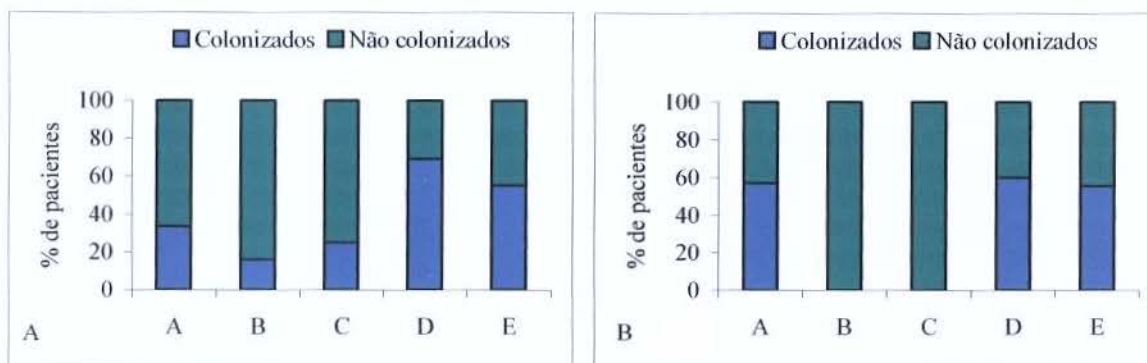


Figura 2 - Percentual de pacientes colonizados e não colonizados por *Candida* nos diferentes tempos de estudo. Painel A: Pacientes submetidos a TCPH Alogênico; Painel B: Pacientes submetidos a TCPH Autólogo

Considerando o número de UFC/ml de saliva ocorreu uma diminuição da média durante as coletas B e C, seguida de expressivo aumento nas coletas subsequentes nos pacientes do grupo TCPH Alogênico. Nenhum dos pacientes do TCPH Autólogo mostrou-se colonizado durante as coletas B e C. Neste grupo, as médias encontradas nas coletas D e E foram, aproximadamente, 6 vezes maiores que a média obtida na coleta inicial (Figura 3). Os números de UFC/ml de saliva obtidos em cada período de coleta e em ambos os grupos estão descritos nos Anexos 3 e 4.

Dentre as 46 amostras positivas para *Candida* sp., 18 (39%) exibiram valores maiores que 400 UFC/ml de saliva. Destas 18 amostras, em somente 3 (17,6%), todas obtidas no dia +50, havia evidência clínica de candidose oral. As médias do número de UFC/ml de saliva encontradas nas coletas D e E foram maiores que as encontradas na coleta inicial, mesmo excluindo-se os pacientes que apresentaram candidose em ambos os grupos (Figura 4).

A regressão logística com os dados categorizados mostrou que houve uma relação inversamente proporcional entre o número de UFC/ml de saliva e o fluxo salivar obtido ( $p=0,005$ ). A idade ( $p=0,264$ ) e o tipo de transplante ( $p=0,831$ ) não mostraram relação estatisticamente significativa com o número de UFC/ml de saliva.



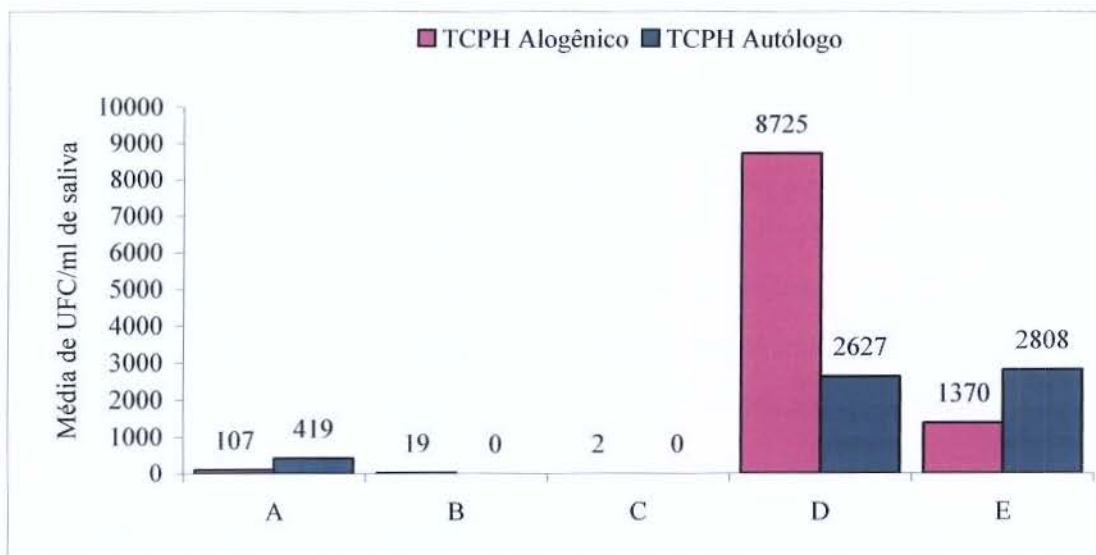


Figura 3 - Médias dos números de UFC/ml de saliva encontradas nos diferentes tempos de estudo nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico e a TCPH Autólogo

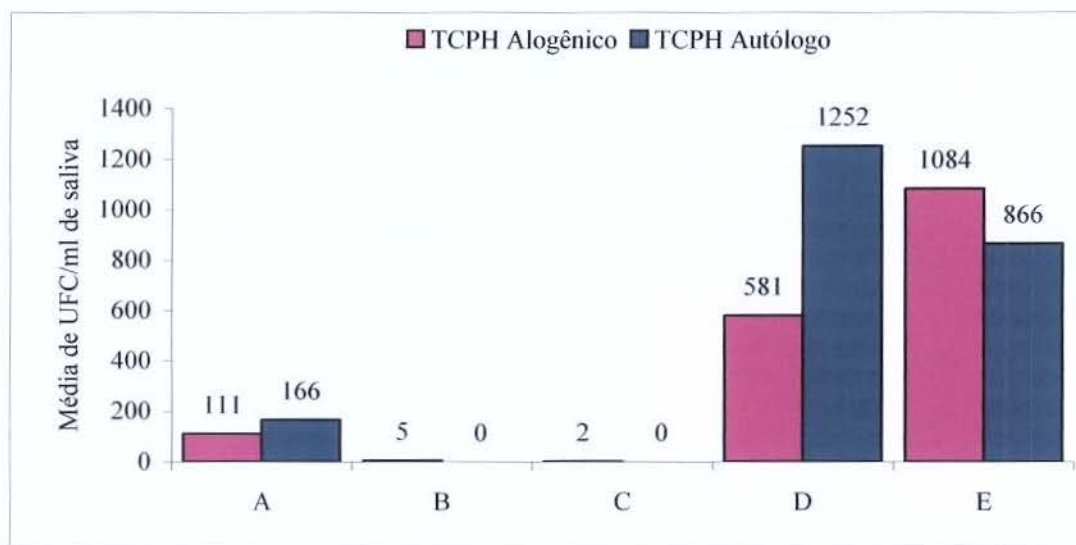


Figura 4 - Médias dos números de UFC/ml de saliva encontradas nos diferentes tempos de estudo nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico e a TCPH Autólogo, excluindo os pacientes que apresentaram candidose oral.

### 5.5.1 Espécies de *Candida* identificadas

Do total de 46 amostras positivas para *Candida* foram obtidos 54 isolados clínicos, sendo 34 (63%) de *Candida albicans* e 20 (37%) de *Candida* não *albicans*. Somente um dos isolados identificados como *Candida albicans* ou *Candida dubliniensis* através da análise do crescimento em meio cromogênico, formação do tubo germinativo e análise micromorfológica, mostrou-se negativo nos testes de assimilação da xilose e do crescimento a 42°C sendo, portanto, sugestivo de *Candida dubliniensis*. Este isolado foi adicionalmente testado quanto à assimilação de carboidratos no sistema automatizado VITEK<sup>®</sup>, onde exibiu assimilação da xilose. Tendo em vista o resultado contraditório e a não realização de outra técnica mais específica, esse isolado foi considerado *Candida albicans* para a análise.

Além das espécies do gênero *Candida* descritas, foram encontrados 2 isolados de *Saccharomyces cerevisiae* e 1 de *Trichosporon beigelii*.

Para 12 isolados de *Candida* não *albicans*, além do teste de assimilação de carboidratos, a análise micromorfológica foi necessária para a identificação final. Entre as espécies de *Candida* não *albicans* foram identificados 11 (55%) isolados de *Candida parapsilosis*, 4 (20%) de *Candida guilliermondii*, 2 (10%) de *Candida tropicalis*, e 1 (5%) isolado de *Candida lusitanae*, *Candida krusei* e *Candida* sp. cada. O isolado 21CO não foi computado nessa análise (ver item 5.3).

Dos 21 pacientes submetidos a TCPH Alogênico, 11 (52,4%) mostraram-se colonizados em pelo menos um período de coleta. Destes pacientes foram obtidos 33 isolados clínicos, sendo 19 (57,5%) de *Candida albicans* e 14 (42,5%) de *Candida* não *albicans*. A espécie não *albicans* mais frequentemente encontrada foi a *Candida parapsilosis* (42,8%) seguida da *Candida guilliermondii* (28,4%) (Tabela 6). Dos 11 pacientes colonizados, 4 não estavam colonizados na coleta inicial mas foram colonizados posteriormente por espécies de *Candida* não *albicans*. A colonização mista, caracterizada pela presença de *Candida albicans* e de *Candida* não *albicans* na mesma coleta, foi encontrada em 4 pacientes (Figura 5).

Dos 14 pacientes submetidos a TCPH Autólogo, 9 (64,3%) estavam colonizados em pelo menos uma das coletas realizadas. Destes pacientes foram obtidos 21 isolados clínicos, sendo 15 (71,4%) de *Candida albicans* e 6 (28,6%) de *Candida* não *albicans*. Entre as espécies de *Candida* não *albicans*, a espécie mais frequentemente identificada foi a *Candida parapsilosis* (83,5%) (Tabela 6). Um dos pacientes deste grupo não estava colonizado na coleta inicial mas mostrou-se colonizado posteriormente por *Candida albicans*. Dos pacientes deste grupo, somente um apresentou colonização mista (Figura 5).

Tabela 6  
Espécies de *Candida* isoladas nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico e a TCPH Autólogo

| TX                                        | Espécie                             | Coletas |      |   |     |   |     |    |      |   |     |       |      |
|-------------------------------------------|-------------------------------------|---------|------|---|-----|---|-----|----|------|---|-----|-------|------|
|                                           |                                     | A       |      | B |     | C |     | D  |      | E |     | Total |      |
|                                           |                                     | n       | %    | n | %   | n | %   | n  | %    | n | %   | n     | %    |
| A<br>L<br>O<br>G<br>Ê<br>N<br>I<br>C<br>O | <i>C. albicans</i>                  | 7       | 70   | 2 | 50  | 3 | 100 | 4  | 36,5 | 3 | 60  | 19    | 57,5 |
|                                           | <i>Candida</i> não <i>albicans</i>  | 3       | 30   | 2 | 50  | 0 | 0   | 7  | 63,5 | 2 | 40  | 14    | 42,5 |
|                                           | <i>C. parapsilosis</i>              | 1       | 33,5 | 1 | 50  | 0 | 0   | 3  | 42,8 | 1 | 50  | 6     | 42,8 |
|                                           | <i>C. guilliermondii</i>            | 2       | 66,5 | 1 | 50  | 0 | 0   | 1  | 14,3 | 0 | 0   | 4     | 28,4 |
|                                           | <i>C. tropicalis</i>                | 0       | 0    | 0 | 0   | 0 | 0   | 0  | 0    | 1 | 50  | 1     | 7,2  |
|                                           | <i>C. lusitaniae</i>                | 0       | 0    | 0 | 0   | 0 | 0   | 1  | 14,3 | 0 | 0   | 1     | 7,2  |
|                                           | <i>C. krusei</i>                    | 0       | 0    | 0 | 0   | 0 | 0   | 1  | 14,3 | 0 | 0   | 1     | 7,2  |
| C                                         | <i>Candida</i> sp.                  | 0       | 0    | 0 | 0   | 0 | 0   | 1  | 14,3 | 0 | 0   | 1     | 7,2  |
| O                                         | Total Alogênico                     | 10      | 100  | 4 | 100 | 3 | 100 | 11 | 100  | 5 | 100 | 33    | 100  |
| A<br>U<br>T<br>Ó<br>L<br>O<br>G<br>O      | <i>C. albicans</i>                  | 6       | 66,5 | 0 | 0   | 0 | 0   | 5  | 71,4 | 4 | 80  | 15    | 71,4 |
|                                           | <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> | 3       | 33,5 | 0 | 0   | 0 | 0   | 2  | 28,6 | 1 | 20  | 6     | 28,6 |
|                                           | <i>C. parapsilosis</i>              | 2       | 66,5 | 0 | 0   | 0 | 0   | 2  | 100  | 1 | 100 | 5     | 83,5 |
|                                           | <i>C. tropicalis</i>                | 1       | 33,5 | 0 | 0   | 0 | 0   | 0  | 0    | 0 | 0   | 1     | 16,5 |
|                                           | Total Autólogo                      | 9       | 100  | 0 | 0   | 0 | 0   | 7  | 100  | 5 | 100 | 21    | 100  |

TCPH=transplante de células progenitoras hematopoiéticas; TX=Transplante.





## 5.6 Susceptibilidade antifúngica

Os valores de CIM frente aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B foram obtidas para todos os isolados clínicos. Os valores para cada isolado clínico estão descritos nos Anexos 5 e 6.

### 5.6.1. Pacientes submetidos a TCPH Alogênico

Todos os isolados clínicos de *Candida albicans* e de *Candida parapsilosis* obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico exibiram sensibilidade ao fluconazol. Sensibilidade a essa droga também foi observada nos isolados de *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae* e de *Candida sp.* Entre os 4 isolados de *Candida guilliermondii* estudados encontramos 1 isolado sensível, 2 com susceptibilidade dependente da dose e 1 resistente. Resistência ao fluconazol também foi encontrada no isolado de *Candida krusei* estudado (Tabela 7).

Os isolados clínicos obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico exibiram predominantemente susceptibilidade dependente da dose ao itraconazol, sendo 89,5% dos isolados de *Candida albicans*, 83,3% dos isolados de *Candida parapsilosis* e os isolados de *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae* e *Candida sp.* estudados. Resistência ao itraconazol foi encontrada em 1 isolado de *Candida parapsilosis*, 2 de *Candida guilliermondii* e no isolado de *Candida krusei* (Tabela 8).

Quanto ao cetoconazol, 84,8% dos isolados clínicos obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico mostraram-se sensíveis, sendo todos os isolados de *Candida albicans*, 83,5% dos isolados de *Candida parapsilosis* bem como os isolados clínicos de *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae* e *Candida sp.* Susceptibilidade dependente da dose foi encontrada em 75% dos isolados de *Candida guilliermondii*. Resistência ao cetoconazol foi encontrada em 1 isolado de *Candida parapsilosis* e no isolado de *Candida krusei* estudado (Tabela 9).

Dos 33 isolados clínicos avaliados neste grupo, 93,9% foram sensíveis à anfotericina B. Resistência foi encontrada somente no isolado de *Candida krusei* e no isolado clínico de *Candida* sp. estudados (Tabela 10).

Tabela 7  
Perfil de susceptibilidade frente ao fluconazol dos isolados de *Candida albicans* e de *Candida* não *albicans* obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico<sup>§</sup>

| Espécie                  | C | N  | Variação<br>(CIM µg/ml) | Número |      |   | Porcentagem |      |     |
|--------------------------|---|----|-------------------------|--------|------|---|-------------|------|-----|
|                          |   |    |                         | S      | S-DD | R | S           | S-DD | R   |
| <i>C. albicans</i>       | A | 7  | 0,125-0,5               | 7      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
|                          | B | 2  | 0,125-0,5               | 2      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
|                          | C | 3  | 0,25                    | 3      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
|                          | D | 4  | 0,125-0,5               | 4      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
|                          | E | 3  | 0,125-0,25              | 3      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
| Subtotal                 |   | 19 | 0,125-0,5               | 19     | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
| <i>C. parapsilosis</i>   | A | 1  | 2                       | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
|                          | B | 1  | 2                       | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
|                          | D | 3  | 1-4                     | 3      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
|                          | E | 1  | 2                       | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
| Subtotal                 |   | 6  | 1-4                     | 6      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
| <i>C. guilliermondii</i> | A | 2  | 8-16                    | 1      | 1    | 0 | 50          | 50   | 0   |
|                          | B | 1  | 64                      | 0      | 0    | 1 | 0           | 0    | 100 |
|                          | D | 1  | 16                      | 0      | 1    | 0 | 0           | 100  | 0   |
| Subtotal                 |   | 4  | 8-64                    | 1      | 2    | 1 | 25          | 50   | 25  |
| <i>C. tropicalis</i>     | E | 1  | 0,5                     | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
| <i>C. lusitaniae</i>     | D | 1  | 0,5                     | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
| <i>C. krusei</i>         | D | 1  | 64                      | 0      | 0    | 1 | 0           | 0    | 100 |
| <i>Candida</i> sp.       | D | 1  | 2                       | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0   |
| TOTAL                    |   | 33 | 0,125-64                | 29     | 2    | 2 | 87,8        | 6,1  | 6,1 |

TCPH=Transplante de células progenitoras hematopoiéticas; C=Coleta; N=número de isolados; S=Susceptível; S-DD=Susceptibilidade dependente da dose; R=Resistente. <sup>§</sup>O isolado 21CO não foi incluído nesta análise.

**Tabela 8**  
**Perfil de susceptibilidade frente ao itraconazol dos isolados de *Candida albicans* e de *Candida* não *albicans* obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico<sup>§</sup>**

| Espécie                  | C | N  | Variação<br>(CIM µg/ml) | Número |      |   | Porcentagem |      |      |
|--------------------------|---|----|-------------------------|--------|------|---|-------------|------|------|
|                          |   |    |                         | S      | S-DD | R | S           | S-DD | R    |
| <i>C. albicans</i>       | A | 7  | 0,125-0,5               | 1      | 6    | 0 | 14,3        | 85,7 | 0    |
|                          | B | 2  | 0,25                    | 0      | 2    | 0 | 0           | 100  | 0    |
|                          | C | 3  | 0,25                    | 0      | 3    | 0 | 0           | 100  | 0    |
|                          | D | 4  | 0,125-0,5               | 1      | 3    | 0 | 25          | 75   | 0    |
|                          | E | 3  | 0,25                    | 0      | 3    | 0 | 0           | 100  | 0    |
| Subtotal                 |   | 19 | 0,125-0,5               | 2      | 17   | 0 | 10,5        | 89,5 | 0    |
| <i>C. parapsilosis</i>   | A | 1  | 0,25                    | 0      | 1    | 0 | 0           | 100  | 0    |
|                          | B | 1  | 0,25                    | 0      | 1    | 0 | 0           | 100  | 0    |
|                          | D | 3  | 0,25-1                  | 0      | 2    | 1 | 0           | 67,5 | 33,5 |
|                          | E | 1  | 0,25                    | 0      | 1    | 0 | 0           | 100  | 0    |
| Subtotal                 |   | 6  | 0,25-1                  | 0      | 5    | 1 | 0           | 83,3 | 16,5 |
| <i>C. guilliermondii</i> | A | 2  | 0,5-1                   | 0      | 1    | 1 | 0           | 50   | 50   |
|                          | B | 1  | 1                       | 0      | 0    | 1 | 0           | 0    | 100  |
|                          | D | 1  | 0,5                     | 0      | 1    | 0 | 0           | 100  | 0    |
| Subtotal                 |   | 4  | 0,5-1                   | 0      | 2    | 2 | 0           | 50   | 50   |
| <i>C. tropicalis</i>     | E | 1  | 0,5                     | 0      | 1    | 0 | 0           | 100  | 0    |
| <i>C. lusitaniae</i>     | D | 1  | 0,5                     | 0      | 1    | 0 | 0           | 100  | 0    |
| <i>C. krusei</i>         | D | 1  | 1                       | 0      | 0    | 1 | 0           | 0    | 100  |
| <i>Candida</i> sp.       | D | 1  | 0,5                     | 0      | 1    | 0 | 0           | 100  | 0    |
| TOTAL                    |   | 33 | 0,125-1                 | 2      | 27   | 4 | 6,1         | 81,8 | 12,1 |

TCPH=Transplante de células progenitoras hematopoiéticas; C=Coleta; N=número de isolados; S=Susceptível; S-DD=Susceptibilidade dependente da dose; R=Resistente. <sup>§</sup>O isolado 21CO não foi incluído nesta análise.

Tabela 9  
 Perfil de susceptibilidade frente ao cetoconazol dos isolados de *Candida albicans* e de *Candida* não *albicans* obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico<sup>§</sup>

| Espécie                  | C | N  | Variação<br>(CIM µg/ml) | Número |      |   | Porcentagem |      |      |
|--------------------------|---|----|-------------------------|--------|------|---|-------------|------|------|
|                          |   |    |                         | S      | S-DD | R | S           | S-DD | R    |
| <i>C. albicans</i>       | A | 7  | 0,03-0,06               | 13     | 0    | 0 | 100         | 0    | 0    |
|                          | B | 2  | 0,03-0,06               | 2      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0    |
|                          | C | 3  | 0,06                    | 3      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0    |
|                          | D | 4  | 0,03-0,125              | 4      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0    |
|                          | E | 3  | 0,03-0,06               | 3      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0    |
| Subtotal                 |   | 19 | 0,03-0,125              | 19     | 0    | 0 | 100         | 0    | 0    |
| <i>C. parapsilosis</i>   | A | 1  | 0,125                   | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0    |
|                          | B | 1  | 0,125                   | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0    |
|                          | D | 3  | 0,06-1                  | 2      | 0    | 1 | 66,5        | 0    | 33,5 |
|                          | E | 1  | 0,125                   | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0    |
| Subtotal                 |   | 6  |                         | 5      | 0    | 1 | 83,5        | 0    | 16,5 |
| <i>C. guilliermondii</i> | A | 2  | 0,125-0,5               | 1      | 1    | 0 | 50          | 50   | 0    |
|                          | B | 1  | 0,25                    | 0      | 1    | 0 | 0           | 100  | 0    |
|                          | D | 1  | 0,5                     | 0      | 1    | 0 | 0           | 100  | 0    |
| Subtotal                 |   | 4  | 0,125-0,5               | 1      | 3    | 0 | 25          | 75   | 0    |
| <i>C. tropicalis</i>     | E | 1  | 0,06                    | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0    |
| <i>C. lusitaniae</i>     | D | 1  | 0,06                    | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0    |
| <i>C. krusei</i>         | D | 1  | 2                       | 0      | 0    | 1 | 0           | 0    | 100  |
| <i>Candida</i> sp.       | D | 1  | 0,06                    | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0    |
| TOTAL                    |   | 33 | 0,03-2                  | 28     | 3    | 2 | 84,8        | 9,1  | 6,1  |

TCPH=Transplante de células progenitoras hematopoiéticas; C=Coleta; N=número de isolados; S=Susceptível; S-DD=Susceptibilidade dependente da dose; R=Resistente. <sup>§</sup>O isolado 21CO não foi incluído nesta análise.

Tabela 10  
 Perfil de susceptibilidade frente à anfotericina B dos isolados de *Candida albicans* e de *Candida*  
 não *albicans* obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico<sup>§</sup>

| Espécie                  | C | N  | Variação<br>(CIM µg/ml) | Número |   | Porcentagem |     |
|--------------------------|---|----|-------------------------|--------|---|-------------|-----|
|                          |   |    |                         | S      | R | S           | R   |
| <i>C. albicans</i>       | A | 7  | 0,5-1                   | 7      | 0 | 100         | 0   |
|                          | B | 2  | 0,5                     | 2      | 0 | 100         | 0   |
|                          | C | 3  | 0,5-1                   | 3      | 0 | 100         | 0   |
|                          | D | 4  | 0,5-1                   | 4      | 0 | 100         | 0   |
|                          | E | 3  | 0,5                     | 3      | 0 | 100         | 0   |
| Subtotal                 |   | 19 | 0,5-1                   | 19     | 0 | 100         | 0   |
| <i>C. parapsilosis</i>   | A | 1  | 1                       | 1      | 0 | 100         | 0   |
|                          | B | 1  | 1                       | 1      | 0 | 100         | 0   |
|                          | D | 3  | 0,5-1                   | 3      | 0 | 100         | 0   |
|                          | E | 1  | 1                       | 1      | 0 | 100         | 0   |
| Subtotal                 |   | 6  | 0,5-1                   | 6      | 0 | 100         | 0   |
| <i>C. guilliermondii</i> | A | 2  | 0,5-1                   | 2      | 0 | 100         | 0   |
|                          | B | 1  | 1                       | 1      | 0 | 100         | 0   |
|                          | D | 1  | 1                       | 1      | 0 | 100         | 0   |
| Subtotal                 |   | 4  | 0,5-1                   | 4      | 0 | 100         | 0   |
| <i>C. tropicalis</i>     | E | 1  | 1                       | 1      | 0 | 100         | 0   |
| <i>C. lusitaniae</i>     | D | 1  | 1                       | 1      | 0 | 100         | 0   |
| <i>C. krusei</i>         | D | 1  | 2                       | 0      | 1 | 0           | 100 |
| <i>Candida</i> sp.       | D | 1  | 2                       | 0      | 1 | 0           | 100 |
| TOTAL                    |   | 33 | 0,5-2                   | 31     | 2 | 93,9        | 6,1 |

TCPH=Transplante de células progenitoras hematopoiéticas; C=Coleta; N=número de isolados; S=Susceptível; S-DD=Susceptibilidade dependente da dose; R=Resistente. <sup>§</sup>O isolado 21CO não foi incluído nesta análise.

### **5.6.2 Pacientes submetidos a TCPH Autólogo**

Todos os 21 isolados clínicos obtidos dos pacientes a TCPH Autólogo mostraram-se sensíveis ao fluconazol (Tabela 11).

Quanto ao itraconazol, 95,2% dos isolados apresentaram sensibilidade dependente da dose. Resistência a essa droga foi encontrada em 1 isolado de *Candida parapsilosis* (Tabela 12).

Sensibilidade ao cetoconazol foi encontrada em 90,5% dos isolados clínicos obtidos dos pacientes deste grupo. Sensibilidade dependente da dose foi encontrada em 2 isolados de *Candida parapsilosis* (Tabela 13).

Todos os isolados clínicos obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Autólogo foram sensíveis à anfotericina B (Tabela 14).

Tabela 11

Perfil de susceptibilidade frente ao fluconazol dos isolados de *Candida albicans* e de *Candida* não *albicans* obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Autólogo

| Espécie                | C | N  | Variação<br>(CIM µg/ml) | Número |      |   | Porcentagem |      |   |
|------------------------|---|----|-------------------------|--------|------|---|-------------|------|---|
|                        |   |    |                         | S      | S-DD | R | S           | S-DD | R |
| <i>C. albicans</i>     | A | 6  | 0,125-0,5               | 6      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
|                        | D | 5  | 0,125-0,5               | 5      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
|                        | E | 4  | 0,25-0,5                | 4      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
| Subtotal               |   | 15 | 0,125-0,5               | 15     | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
| <i>C. parapsilosis</i> | A | 2  | 1-2                     | 2      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
|                        | D | 2  | 2                       | 2      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
|                        | E | 1  | 1                       | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
| Subtotal               |   | 5  | 1-4                     | 5      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
| <i>C. tropicalis</i>   | A | 1  | 1                       | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
| TOTAL                  |   | 21 | 0,125-4                 | 21     | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |

TCPH=Transplante de células progenitoras hematopoiéticas; C=Coleta; N=número de isolados; S=Susceptível; S-DD=Susceptibilidade dependente da dose; R=Resistente.

Tabela 12

Perfil de susceptibilidade frente ao itraconazol dos isolados de *Candida albicans* e de *Candida* não *albicans* obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Autólogo

| Espécie                | C | N  | Variação<br>(CIM µg/ml) | Número |      |   | Porcentagem |      |     |
|------------------------|---|----|-------------------------|--------|------|---|-------------|------|-----|
|                        |   |    |                         | S      | S-DD | R | S           | S-DD | R   |
| <i>C. albicans</i>     | A | 6  | 0,25-0,5                | 0      | 6    | 0 | 0           | 100  | 0   |
|                        | D | 5  | 0,25-0,5                | 0      | 5    | 0 | 0           | 100  | 0   |
|                        | E | 4  | 0,25                    | 0      | 4    | 0 | 0           | 100  | 0   |
| Subtotal               |   | 15 | 0,125-0,5               | 0      | 15   | 0 | 0           | 100  | 0   |
| <i>C. parapsilosis</i> | A | 2  | 0,25-1                  | 0      | 1    | 1 | 0           | 50   | 50  |
|                        | D | 2  | 0,25-0,5                | 0      | 2    | 0 | 0           | 100  | 0   |
|                        | E | 1  | 0,5                     | 0      | 1    | 0 | 0           | 100  | 0   |
| Subtotal               |   | 5  | 0,25-1                  | 0      | 4    | 1 | 0           | 80   | 20  |
| <i>C. tropicalis</i>   | A | 1  | 0,5                     | 0      | 1    | 0 | 0           | 100  | 0   |
| TOTAL                  |   | 21 | 0,125-1                 | 0      | 20   | 1 | 0           | 95,2 | 4,8 |

TCPH=Transplante de células progenitoras hematopoiéticas; C=Coleta; N=número de isolados; S=Susceptível; S-DD=Susceptibilidade dependente da dose; R=Resistente.

Tabela 13  
 Perfil de susceptibilidade frente ao cetoconazol dos isolados de *Candida albicans* e de *Candida*  
*não albicans* obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Autólogo

| Espécie                | C | N  | Variação<br>(CIM µg/ml) | Número |      |   | Porcentagem |      |   |
|------------------------|---|----|-------------------------|--------|------|---|-------------|------|---|
|                        |   |    |                         | S      | S-DD | R | S           | S-DD | R |
| <i>C. albicans</i>     | A | 6  | 0,03-0,125              | 6      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
|                        | D | 5  | 0,03                    | 5      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
|                        | E | 4  | 0,06                    | 4      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
| Subtotal               |   | 15 | 0,03-0,125              | 15     | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
| <i>C. parapsilosis</i> | A | 2  | 0,06-0,5                | 1      | 1    | 0 | 50          | 50   | 0 |
|                        | D | 2  | 0,06-0,5                | 2      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
|                        | E | 1  | 0,25                    | 0      | 1    | 0 | 0           | 100  | 0 |
| Subtotal               |   | 5  | 0,06-0,5                | 3      | 2    | 0 | 60          | 40   | 0 |
| <i>C. tropicalis</i>   | A | 1  | 0,06                    | 1      | 0    | 0 | 100         | 0    | 0 |
| TOTAL                  |   | 21 | 0,03-0,5                | 19     | 2    | 0 | 90,5        | 9,5  | 0 |

TCPH=Transplante de células progenitoras hematopoiéticas; C=Coleta; N=número de isolados; S=Susceptível; S-DD=Susceptibilidade dependente da dose; R=Resistente.

Tabela 14  
 Perfil de susceptibilidade frente à anfotericina B dos isolados de *Candida albicans* e de  
*Candida não albicans* obtidos dos pacientes submetidos a TCPH Autólogo

| Espécie                | C | N  | Variação<br>(CIM µg/ml) | Número |   | Porcentagem |   |
|------------------------|---|----|-------------------------|--------|---|-------------|---|
|                        |   |    |                         | S      | R | S           | R |
| <i>C. albicans</i>     | A | 6  | 0,5-1                   | 6      | 0 | 100         | 0 |
|                        | D | 5  | 0,5-1                   | 5      | 0 | 100         | 0 |
|                        | E | 4  | 0,5-1                   | 4      | 0 | 100         | 0 |
| Subtotal               |   | 15 | 0,5-1                   | 15     | 0 | 100         | 0 |
| <i>C. parapsilosis</i> | A | 2  |                         | 1      | 2 | 100         | 0 |
|                        | D | 2  |                         | 1      | 2 | 100         | 0 |
|                        | E | 1  |                         | 1      | 1 | 100         | 0 |
| Subtotal               |   | 5  |                         | 1      | 5 | 100         | 0 |
| <i>C. tropicalis</i>   | A | 1  |                         | 1      | 1 | 100         | 0 |
| TOTAL                  |   | 21 | 0,5-1                   | 21     | 0 | 100         | 0 |

TCPH=Transplante de células progenitoras hematopoiéticas; C=Coleta; N=número de isolados; S=Susceptível; S-DD=Susceptibilidade dependente da dose; R=Resistente.



## 5.7 Cariotipagem eletroforética

A cariotipagem eletroforética foi realizada nos 35 isolados de *Candida albicans* identificados em ambos os grupos no presente estudo, sendo 20 isolados clínicos obtidos de pacientes submetidos a TCPH Alogênico incluindo o isolado 21CO, e 15 dos pacientes do grupo Autólogo.

Todos os 7 pacientes submetidos ao TCPH Alogênico que foram colonizados por *Candida albicans* estavam colonizados na coleta inicial. Destes pacientes, 5 estavam colonizados por *Candida albicans* em pelo menos uma coleta posterior. A análise do cariótipo eletroforético dos isolados seqüenciais de *Candida albicans* mostrou que em 3 pacientes a mesma cepa estava presente nas coletas posteriores. Em 2 outros pacientes foram encontradas cepas diferentes da cepa colonizadora inicial (Tabela 15; Figura 5).

Dos 7 pacientes submetidos a TCPH Autólogo colonizados por *Candida albicans*, 6 estavam colonizados na coleta inicial. Quatro destes pacientes também estavam colonizados por *Candida albicans* em coletas posteriores. A análise dos isolados de *Candida albicans* seqüenciais de cada paciente mostrou que 3 pacientes estavam colonizados posteriormente com a mesma cepa identificada na coleta inicial. Em outro paciente um cariótipo eletroforético diferente, indicativo de outra cepa, foi encontrado em duas coletas posteriores (Tabela 16; Figura 5).

No geral, foram encontrados 9 diferentes perfis eletroforéticos, sendo o perfil 6 o mais freqüentemente identificado em ambos os grupos (Tabelas 15 e 16; Figuras 5 e 6). A similaridade entre as cepas identificadas no presente estudo está representada no dendrograma da Figura 6. A Figura 7 exhibe os diferentes perfis encontrados.

Tabela 15  
Cariótipo eletroforético e perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados clínicos de *Candida albicans* encontrados nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico

| Paciente | Coleta | CE | CIM (µg/ml) |             |             |                |
|----------|--------|----|-------------|-------------|-------------|----------------|
|          |        |    | fluconazol  | itraconazol | cetoconazol | anfotericina B |
| 4        | A      | 6  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
|          | E      | 3  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
| 6        | A      | 6  | 0,5         | 0,25        | 0,06        | 1              |
| 10       | A      | 6  | 0,25        | 0,25        | 0,03        | 1              |
|          | C      | 6  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 1              |
|          | D      | 6  | 0,25        | 0,25        | 0,125       | 1              |
|          | E      | 6  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
| 18       | A      | 1  | 0,125       | 0,125       | 0,03        | 0,5            |
|          | B      | 1  | 0,125       | 0,25        | 0,03        | 0,5            |
|          | C      | 1  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
|          | D      | 1  | 0,25        | 0,5         | 0,03        | 0,5            |
|          | E      | 1  | 0,125       | 0,25        | 0,03        | 0,5            |
| 21       | A      | 4  | 0,5         | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
|          | B      | 4  | 0,5         | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
|          | D      | 4  | 0,5         | 0,125       | 0,06        | 1              |
|          | CO     | 4  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 1              |
| 24       | A      | 6  | 0,125       | 0,25        | 0,03        | 0,5            |
| 29       | A      | 5  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
|          | C      | 5  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
|          | D      | 2  | 0,125       | 0,25        | 0,03        | 0,5            |

TCPH=Transplante de células progenitoras hematopoiéticas; CE=Cariótipo eletroforético; CIM=Concentração inibitória mínima.

**Tabela 16**  
**Cariótipo eletroforético e perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados clínicos de**  
*Candida albicans* encontrados nos pacientes submetidos a TCPH Autólogo

| Paciente | Coleta | CE | CIM (µg/ml) |             |             |                |
|----------|--------|----|-------------|-------------|-------------|----------------|
|          |        |    | fluconazol  | itraconazol | cetoconazol | anfotericina B |
| 7        | A      | 6  | 0,5         | 0,25        | 0,03        | 0,5            |
|          | D      | 6  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 1              |
|          | E      | 6  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
| 8        | A      | 6  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
|          | D      | 8  | 0,5         | 0,5         | 0,06        | 0,5            |
|          | E      | 8  | 0,5         | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
| 9        | D      | 6  | 0,25        | 0,5         | 0,06        | 0,5            |
|          | E      | 6  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 1              |
| 20       | A      | 6  | 0,25        | 0,25        | 0,03        | 0,5            |
|          | D      | 6  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
|          | E      | 6  | 0,25        | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
| 30       | A      | 9  | 0,25        | 0,25        | 0,125       | 0,5            |
| 33       | A      | 6  | 0,25        | 0,5         | 0,06        | 1              |
|          | D      | 6  | 0,125       | 0,25        | 0,06        | 0,5            |
| 34       | A      | 7  | 0,125       | 0,25        | 0,03        | 0,5            |

TCPH=Transplante de células progenitoras hematopoiéticas; CE=Cariótipo eletroforético;  
 CIM=Concentração inibitória mínima.

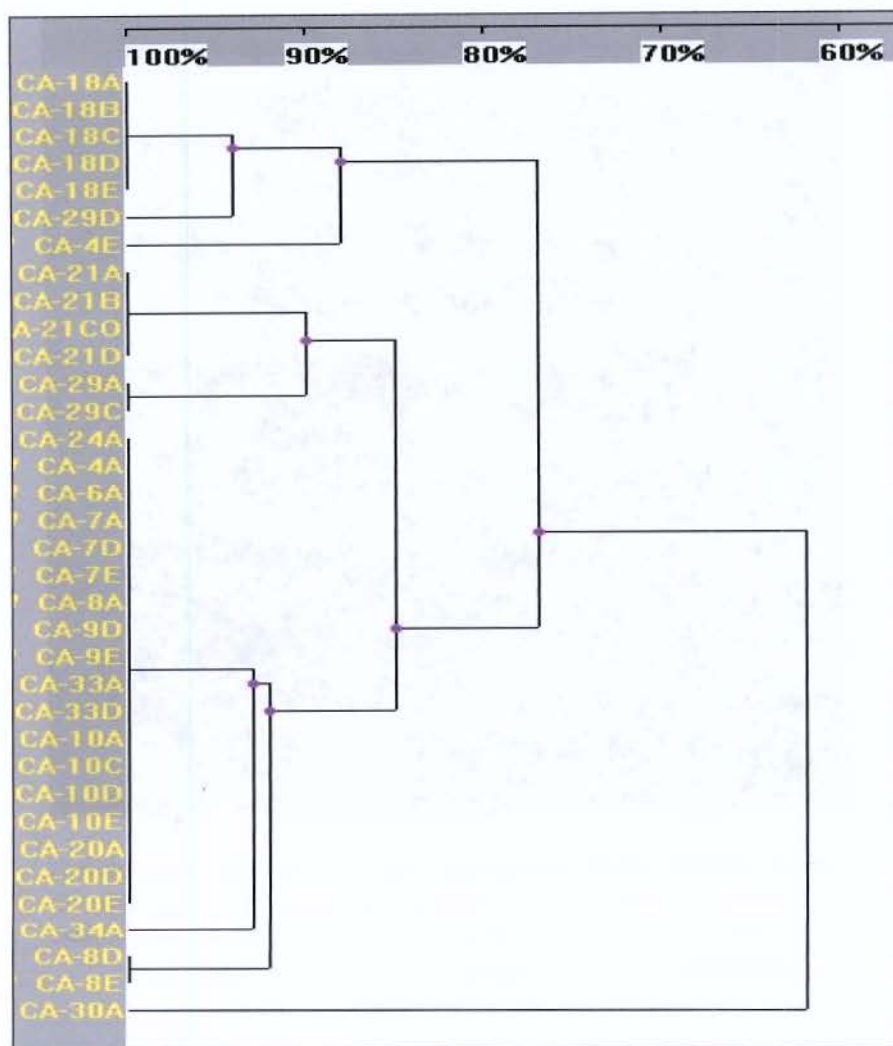


Figura 6- Dendrograma representando a similaridade do cariótipo eletroforético entre os isolados de *Candida albicans*

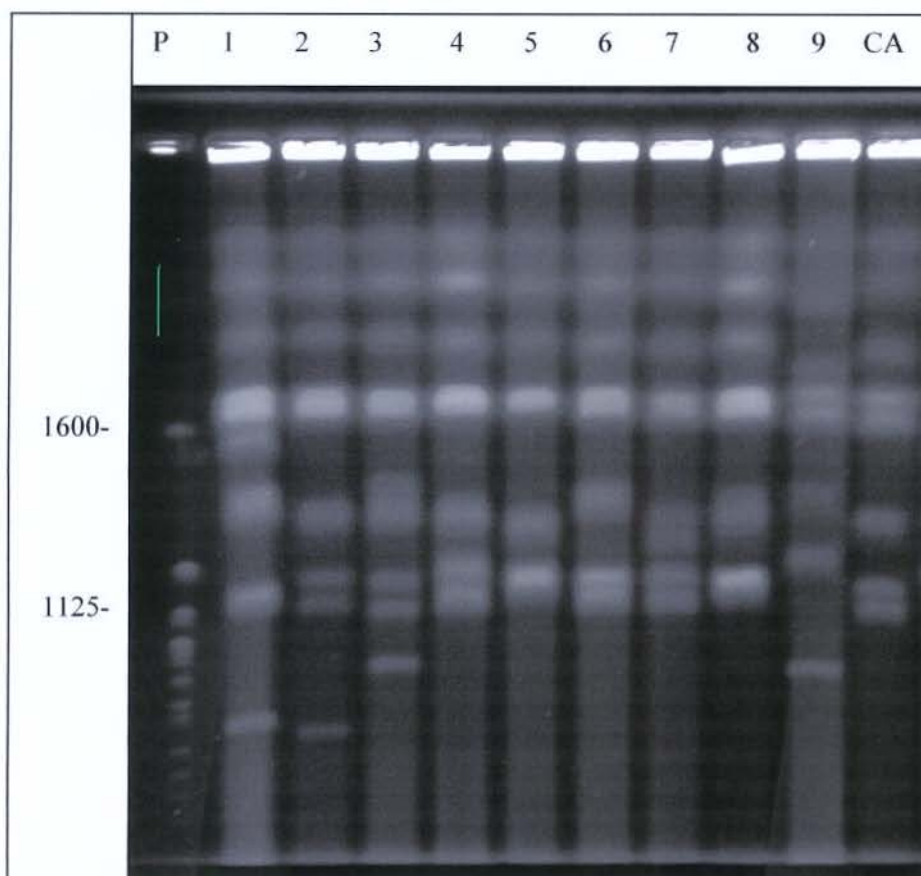


Figura 7 – Perfis eletroforéticos encontrados entre os isolados de *Candida albicans*. Canaletas: (P) Padrão de peso molecular de *S. cerevisiae*; (1-9) Diferentes perfis de *Candida albicans* encontrados; (CA) *Candida albicans* ATCC 90028

### 5.8 Presença de candidose oral

Dentre os 35 pacientes acompanhados no presente estudo, 4 apresentaram infecção oral por *Candida*. Destes, 3 pacientes eram do grupo do TCPH Alogênico e 1 era do TCPH Autólogo. Todos os pacientes desenvolveram candidose oral pseudomembranosa no período pós-enxertia. O paciente 29, do TCPH Alogênico, estava internado devido a complicações pós-transplante e os demais pacientes que apresentaram candidose oral estavam em acompanhamento ambulatorial. Os pacientes 18, 21 e 29 do TCPH Alogênico estavam fazendo uso de ciclosporina e haviam feito uso recente de antibioticoterapia devido a infecção em catéter. Nenhum desses pacientes desenvolveu DECH no período do estudo. Todos os pacientes foram tratados com fluconazol na dose de 200mg/dia por 14 dias.

A única espécie isolada durante os eventos de candidose oral foi *Candida albicans*. Essa espécie também foi identificada nas coletas iniciais de todos os pacientes que apresentaram infecção oral posteriormente. A análise do cariótipo eletroforético dos isolados sequenciais de *Candida albicans* mostrou que a cepa identificada durante o quadro infeccioso foi a mesma encontrada na coleta inicial em 3 pacientes. Em um outro paciente, submetido a TCPH Alogênico, a cepa responsável pela infecção apresentou perfil eletroforético diferente da cepa identificada inicialmente (Tabela 17; Figura 8).

Tabela 17  
Isolados de *Candida albicans* obtidos de pacientes que apresentaram candidose oral no período de estudo

| Paciente | TCPH      | Coleta | CO       | CE                   | UFC/ml de saliva | fluconazol CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|----------|-----------|--------|----------|----------------------|------------------|-------------------------------------|
| 18       | Alogênico | A      | -        | 1                    | 20               | 0,125                               |
|          |           | B      | -        | 1                    | 200              | 0,125                               |
|          |           | C      | -        | 1                    | 4                | 0,25                                |
|          |           | D      | Presente | 1                    | 25.300           | 0,25                                |
|          |           | E      | -        | 1                    | 3.660            | 0,125                               |
| 20       | Autólogo  | A      | -        | 6                    | 3.700            | 0,25                                |
|          |           | B      | -        | -                    | 0                |                                     |
|          |           | C      | -        | -                    | 0                |                                     |
|          |           | D      | Presente | 6                    | 15.000           | 0,25                                |
|          |           | E      | -        | 6                    | 18.340           | 0,25                                |
| 21       | Alogênico | A      | -        | 4                    | 4                | 0,5                                 |
|          |           | B      | -        | 4                    | 12               | 0,5                                 |
|          |           | C      | -        | -                    | 0                |                                     |
|          |           | D      | -        | 4                    | 340              | 0,5                                 |
|          |           | CO     | Presente | 4                    | 51.392           | 0,25                                |
|          |           | E      | -        | <i>C. tropicalis</i> | 180              |                                     |
| 29       | Alogênico | A      | -        | 5                    | 120              | 0,25                                |
|          |           | B      | -        | -                    | 0                |                                     |
|          |           | C      | -        | 5                    | 2                | 0,25                                |
|          |           | D      | Presente | 2                    | 73.600           | 0,125                               |

TCPH=Transplante de células progenitoras hematopoiéticas; CO=Candidose oral; CE= Cariótipo eletroforético; CIM<sub>80</sub>=Concentração inibitória mínima de 80%.



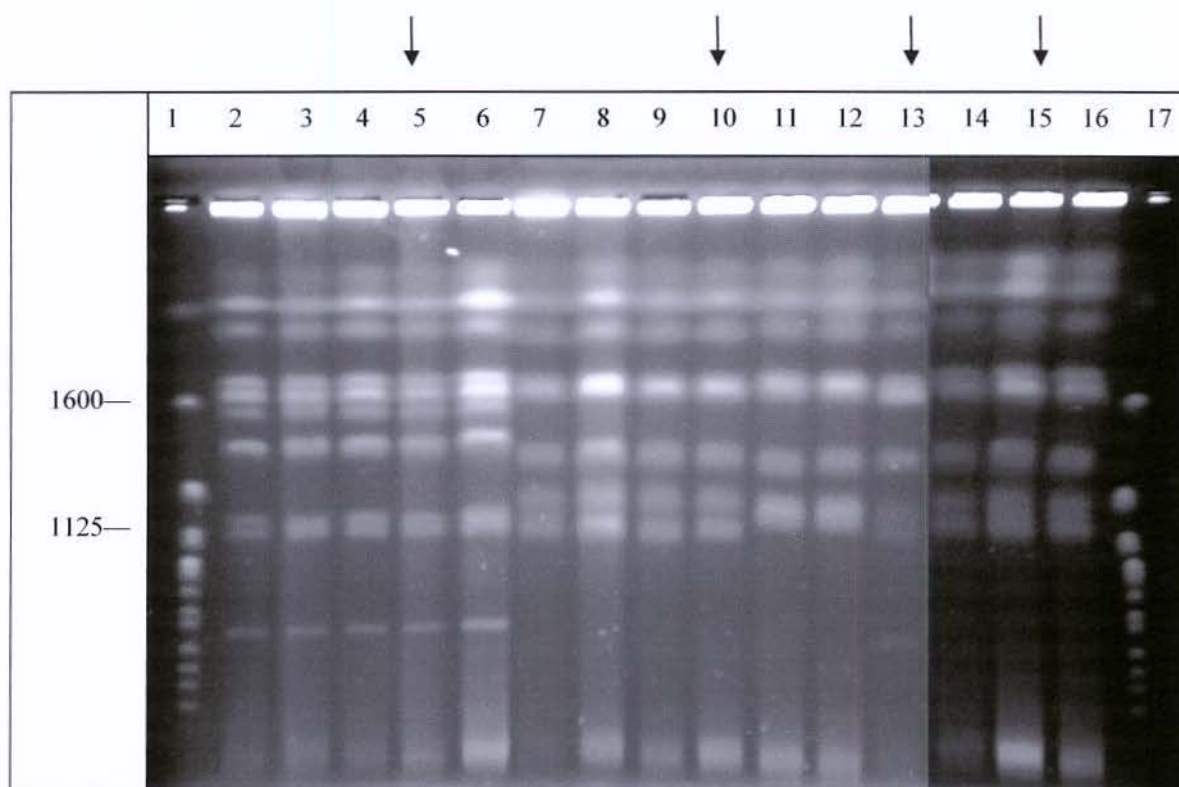


Figura 8 - Cariotipagem eletroforética de isolados orais seqüenciais dos pacientes que desenvolveram candidose oral. Canaletas: (1 e 17) Padrão de peso molecular de DNA de *S. cerevisiae*; (2-6) Paciente 18: Cepas 18A, 18B, 18C, 18D e 18E; (7-10) Paciente 21: Cepas 21A, 21B, 21D e 21CO; (11-13) Paciente 29: Cepas 29A, 29C e 29D; (14-16) Paciente 20: Cepas 20A, 20D e 20E. As setas indicam as cepas que foram isoladas durante os eventos de candidose oral





## 6 DISCUSSÃO

As complicações orais são freqüentes causas de morbidade nos pacientes que são submetidos a TCPH. Essas complicações podem representar efeitos combinados da doença de base, do condicionamento pré-transplante, de infecções orais e das manifestações orais da DECH (Kolbinson *et al.*, 1988). Os pacientes podem apresentar queixa de xerostomia, disgeusia, disfonia e de disfagia, as quais podem estar relacionadas à redução do fluxo salivar ou a alterações na composição química da saliva (Kolbinson *et al.*, 1988; Sreebny, 2000; Tanida *et al.*, 2003). Dos 35 pacientes incluídos em nosso estudo, 21 (60,0%) apresentaram alguma queixa relacionada à cavidade oral. As queixas mais freqüentes foram xerostomia (45,5%) e sialorréia (27,3%), seguidas do aumento da viscosidade da saliva (18,2%).

A queixa de xerostomia, associada ou não à hipossalivação, é freqüentemente relacionada ao uso de algumas drogas como as de ação adrenérgica, anticolinérgica e as de ação citotóxica (Sreebny, 2000; Scully 2003; Porter *et al.*, 2004; Nagler & Hershkovich, 2005). Essas alterações também podem ocorrer após radioterapia para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço, ou após irradiação corporal total como parte do protocolo de condicionamento pré-TCPH (Bonan *et al.*, 2003; Nagler & Nagler, 2004). Nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico, a xerostomia e a hipossalivação também podem ocorrer devido ao aumento da reação inflamatória nas glândulas salivares maiores no período inicial pós-transplante, ou pelo desenvolvimento da DECH em períodos posteriores (Nagler & Nagler, 2004; Coracin *et al.*, 2006). A DECH pode afetar as glândulas salivares maiores e as menores provocando dano celular nos ductos e nas unidades secretoras seguido de fibrose (Nagler & Nagler, 2001 e 2004; Levy *et al.*, 2000).

Valores do fluxo salivar não estimulado  $\leq 0,1$ ml/min têm sido usados para caracterizar a hipossalivação (Sreebny, 2000). Em nosso trabalho, dos 5 (14,3%) pacientes que apresentaram níveis de hipossalivação, 3 (60%) queixaram-se de xerostomia. De outro lado, dos 10 pacientes com queixa de xerostomia, somente 3 (30%) mostraram níveis de

hipossalivação. Torres *et al.* (2002) encontraram, em análise de coleta de saliva total estimulada, a presença de hipossalivação em 58% dos 112 pacientes xerostômicos estudados. Esses dados sugerem que a xerostomia pode estar relacionada com alterações na composição química da saliva na ausência de redução do fluxo salivar (Sreebny, 1992 e 2000; Torres *et al.*, 2002; Peterson, 2003). As alterações na composição da saliva também podem ter sido responsáveis pelas queixas de aumento da viscosidade da saliva, disgeusia e ardência bucal descritas pelos pacientes do presente estudo (Kolbinson *et al.*, 1988; Nagler & Nagler, 2001 e 2004; Tanida *et al.*, 2003; Nagler & Hershkovich, 2005). A xerostomia, disgeusia e a ardência também podem ser causadas pela presença de colonização oral por *Candida* (Kurnatowska, 2001).

O fluxo salivar obtido em coletas seqüenciais variou de modo estatisticamente significativo tanto nos pacientes submetidos a TCPH Autólogo ( $p=0,0058$ ), quanto nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico ( $p=0,0003$ ). A redução do fluxo salivar observada durante o quadro de granulocitopenia dos pacientes do grupo TCPH Autólogo pode ter ocorrido devido à ação das drogas administradas durante o condicionamento pré-transplante, as quais promovem redução do fluxo salivar.

Nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico foi observado um aumento da mediana do fluxo salivar nas coletas realizadas na presença de granulocitopenia e após a enxertia medular, comparados aos demais períodos de coleta. O aumento da mediana do fluxo salivar observado durante o quadro de granulocitopenia coincide com a queixa de sialorréia de 8 (38%) pacientes deste grupo durante esse período. O período de granulocitopenia também está relacionado com a presença de mucosite principalmente nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico. Neste grupo, a presença de mucosite foi observada em 19 (90,5%) dos 21 pacientes incluídos neste estudo, sendo que destes, 14 (73,7%) apresentaram mucosite grave. Dos 8 pacientes submetidos a TCPH Alogênico que apresentaram queixa de sialorréia, 6 (75%) exibiram um quadro de mucosite grave. Embora a presença de mucosite não tenha influenciado de maneira estatisticamente significativa o fluxo salivar ( $p=0,308$ ), podemos supor que a odinofagia associada aos quadros de mucosite grave dificulta a deglutição da saliva pelo paciente, o que pode ser responsável

pela queixa de sialorréia e, de alguma forma, pode estimular a maior produção de saliva nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico (Grosso *et al.*, 2005).

Nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico a variável que influenciou o fluxo salivar de maneira estatisticamente significativa foi a idade ( $p=0,0058$ ). Nos pacientes idosos as queixas de xerostomia, ardência bucal e de alterações no paladar são mais freqüentes e podem estar relacionadas tanto com a redução do fluxo salivar, quanto com alterações na composição da saliva. Essas alterações podem ser devido à substituição do parênquima glandular por tecido fibroso e/ou tecido adiposo evidenciada nas glândulas salivares dos pacientes idosos, assim como ser devido à maior ocorrência de doenças e ao uso de múltiplas drogas por essa população (Lockhart *et al.*, 1999; Sreebny, 2000; Nagler & Hershkovich, 2005).

Outro fator que pode influenciar o fluxo salivar dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico é o desenvolvimento da DECH crônica. Os pacientes que desenvolvem essa doença freqüentemente apresentam alteração na composição da saliva e/ou hipossalivação, as quais são decorrentes da ação dos linfócitos T do enxerto seguida da fibrose do parênquima das glândulas salivares (Levy *et al.*, 2000; Nagler & Nagler, 2001 e 2004; Alborguetti *et al.*, 2005). Embora a hipossalivação seja mais evidente nos pacientes que apresentam DECH crônica, acreditamos que alterações bioquímicas possam ser identificadas na saliva antes do desenvolvimento da doença ou mesmo na presença de DECH aguda, visto que alterações moleculares precedem as alterações morfológicas como a fibrose observada nas glândulas salivares dos pacientes que desenvolvem DECH crônica. No presente trabalho nenhum paciente desenvolveu DECH crônica. Três dos 21 pacientes do TCPH Alogênico apresentaram DECH aguda, mas nenhum apresentou hipossalivação medida pela análise do fluxo salivar. Outros estudos são necessários para analisar o efeito do TCPH na composição salivar desses pacientes.

As alterações na composição da saliva resultam no comprometimento da sua capacidade funcional, visto que esta capacidade está diretamente relacionada com a composição salivar normal e podem atuar sinergicamente com a redução do fluxo salivar. Essas alterações podem levar ao aumento ou diminuição da concentração de certos íons na

saliva, aumento na concentração de proteína, assim como diminuição de IgA secretora. (Levy *et al.*, 2000; Tanida *et al.*, 2003; Nagler & Nagler, 2004), propiciando o desenvolvimento de infecções orais exemplificadas pela candidose oral.

O efeito protetor da saliva está relacionado com seus constituintes como enzimas presença de IgA secretora (Jorge *et al.*, 1993a; Levy *et al.*, 2000; Tanida *et al.*, 2003; Nagler & Nagler, 2004; Totti *et al.*, 2004). Níveis reduzidos dessas substâncias podem propiciar o desenvolvimento de infecções orais como a candidose. Estudos *in vivo* mostraram que ratos sialodenectomizados apresentam maior colonização e maior ocorrência de candidose oral comparado com ratos não sialodenectomizados (Jorge *et al.*, 2003a e 2003b; Totti *et al.*, 2004). De outra forma, o desenvolvimento de candidose oral em ratos parece ser inibido pela ingestão de saliva humana (Kamagata-Kiyoura *et al.*, 2004).

Um fator local que pode favorecer o aparecimento de candidose oral é a formação de biofilmes por leveduras do gênero *Candida*, associadas ou não com bactérias, nas superfícies dentárias, protéticas e na mucosa oral (Edgerton *et al.*, 1993; Chandra *et al.*, 2001; Sen *et al.*, 1997 e 2003; Hsu *et al.*, 1990; Adam *et al.*, 2002). Os biofilmes representam comunidades complexas de microorganismos inseridos em uma matriz de exopolissacarídeos. Esses microorganismos, quando inseridos no biofilme, exibem características fenotípicas que conferem maior resistência à ação do sistema imune e ação dos medicamentos. Desta forma, os biofilmes são freqüentemente relacionados com infecções persistentes e refratárias à terapêutica convencional por atuarem como um reservatório de microorganismos (Costerton *et al.*, 1999; Ramage *et al.*, 2001; Kunh *et al.*, 2002). As próteses dentárias podem atuar como um nicho para o desenvolvimento de biofilmes em decorrência das irregularidades de sua superfície, atuando, portanto, como um reservatório para microorganismos que podem ser responsáveis por infecções locais e por infecções sistêmicas (Edgerton *et al.*, 1993; Chandra *et al.*, 2001; Sen *et al.*, 1997 e 2003; Perezous *et al.*, 2005). Em nosso trabalho, dos 4 pacientes que desenvolveram candidose oral, dois eram usuários de próteses dentárias removíveis.

Além dos fatores locais citados acima, outro importante fator de risco para o desenvolvimento tanto de infecção sistêmica quanto de infecção superficial por *Candida* é a presença de colonização prévia. A colonização do trato gastrointestinal representa uma fonte de contaminação endógena nos pacientes submetidos a TCPH em virtude da proliferação fúngica propiciada pelo uso de antimicrobianos de largo espectro, da possibilidade de disseminação hematógena devido à quebra da barreira mucosa e pelo imunocomprometimento decorrente do condicionamento quimioterápico, do uso de imunossupressores e do desenvolvimento da DECH (Pfaller, 1995; Epstein *et al.*, 1996; Wey *et al.*, 1989; Verfaillie *et al.*, 1991; Goodman *et al.*, 1992; Pittet *et al.*, 1994; Pagano *et al.*, 1999; Marr *et al.*, 2000a; Trabasso, 2001; Safdar & Armstrong, 2002).

Em nosso trabalho, verificamos um percentual de colonização oral por *Candida* de 57,1% dos 35 pacientes estudados, sendo 52,4% dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico e 64,3% dos pacientes submetidos a TCPH Autólogo. Valores percentuais similares foram descritos por Hoppe *et al.* (1997) ao estudarem a colonização por leveduras em vários sítios de pacientes pediátricos submetidos a TCPH. Esses autores verificaram um percentual de 54,7% de pacientes colonizados, sendo 44,4% dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico e 67,9% dos pacientes submetidos a TCPH Autólogo. Nos pacientes submetidos a TCPH no Hospital de Clínicas da UNICAMP no período de 1996 a 2000, Silva (2001) descreveu a presença de colonização por *Candida* em 53% dos pacientes incluídos no estudo.

Para diminuir o risco de infecção por *Candida* os pacientes submetidos a TCPH fazem uso protocolar de fluconazol em doses diárias de 200 a 400 mg até a enxertia medular ou até o término da terapia imunossupressora para os pacientes submetidos a TCPH Alogênico que desenvolvem DECH. O objetivo é promover a descontaminação seletiva do trato gastrointestinal e assim reduzir o risco de infecção (Samonis *et al.*, 1990; Goodman *et al.*, 1992; Chandrasekar *et al.*, 1994; Slavin *et al.*, 1995; Marr *et al.*, 2000a; Safdar *et al.*, 2001a; MacMillan *et al.* 2002).

A redução do percentual de pacientes colonizados por *Candida* associada à instituição do uso profilático de fluconazol tem sido descrita por diversos autores (Samonis

*et al.*, 1990; Goodman *et al.*, 1992; Chandrasekar *et al.*, 1994). A influência do fluconazol na colonização oral por *Candida* em pacientes com câncer foi avaliada por Samonis *et al.* (1990) através de um estudo prospectivo. Esses autores verificaram uma redução de 45% no número de pacientes colonizados contrastando com uma redução de 8% encontrada nos pacientes do grupo placebo.

A redução no percentual de pacientes submetidos a TCPH colonizados por *Candida* foi descrita por Goodman *et al.* (1992) que verificaram uma redução de 58% do número de pacientes colonizados e que fizeram uso de fluconazol contrastando com um aumento de 6% nos pacientes do grupo placebo que apresentaram coletas subsequentes negativas. No trabalho aqui apresentado, verificamos que dos 15 pacientes que eram colonizados na coleta inicial, 9 não mostraram-se colonizados nas coletas subsequentes B e C, realizadas estando o paciente sob profilaxia com fluconazol. Portanto, a redução do número de pacientes colonizados foi de 60%, sendo que não foram encontrados pacientes colonizados no grupo Autólogo nesse período de estudo.

Além da diminuição do número de pacientes colonizados, em nosso trabalho verificamos uma redução do número de UFC/ml de saliva nas coletas realizadas no período de internação, fato também demonstrado por Samonis *et al.* (1990). Nas coletas subsequentes D e E houve um expressivo aumento do número de UFC/ml de saliva em ambos os grupos quando comparado com o número obtido na coleta inicial. Em nosso trabalho, após categorização dos dados, observamos uma relação inversamente proporcional entre o número de UFC/ml de saliva e o fluxo salivar ( $p=0,005$ ), fato também demonstrado por outros autores e que reforça a importância da saliva no controle do crescimento fúngico na cavidade oral (Whalin, 1991; Navazesh *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 2002).

Além das drogas de uso sistêmico, o uso de bochecho com clorexidina, instituído para esses pacientes durante o período de internação também pode ter atuado como co-fator na redução do número de UFC/ml de saliva obtido durante as coletas B e C (Ellepola & Samaranayake, 2001). Além do efeito antibacteriano, essa droga atua como

antifúngico inibindo a adesão das leveduras às células epiteliais e também às superfícies do acrílico (Epstein *et al.*, 2003; Soysa *et al.*, 2004).

Embora tenha ocorrido um aumento do número de quadros infecciosos provocados por espécies de *Candida* não *albicans* após a instituição do uso protocolar de fluconazol profilático em pacientes de maior risco, *Candida albicans* ainda é a espécie mais freqüentemente encontrada como espécie colonizadora e mais comumente relacionada aos quadros de candidemia e de candidose oral, dado também mostrado em estudos realizados na população brasileira (Wingard *et al.*, 1991; Abi-Said *et al.*, 1997; Colombo *et al.*, 1999; Marr & Bowden, 1999; Marr, 2000b; Pfaller *et al.*, 2000; Silva, 2001; Trabasso, 2001; Torres *et al.*, 2002). Em nosso trabalho a *Candida albicans* foi a espécie mais freqüentemente encontrada representando 63% de todos os isolados clínicos, seguida da *Candida parapsilosis* a qual correspondeu a 20,37% dos isolados e 55% dos isolados de *Candida* não *albicans*. Esse dado está acordo com o estudo de Torres *et al.* (2002) que verificaram a colonização oral por *Candida albicans* em 84,8% e por *Candida parapsilosis* em 32,9% dos pacientes xerostômicos avaliados (Hannula *et al.*, 1999).

A grande freqüência de colonização oral por *Candida parapsilosis* pode indicar o próprio perfil da população estudada visto que Colombo *et al.* (1999) descreveram uma maior incidência de infecção provocada por *Candida parapsilosis* e por *Candida tropicalis*, espécies que representaram, respectivamente, 25% e 24% dos casos de candidemia registrados em hospitais terciários do Brasil mesmo na ausência do uso profilático do fluconazol (Colombo *et al.*, 1999; Pfaller *et al.*, 2000).

Ainda no Brasil, o aumento da incidência de candidemia provocada por espécies de *Candida* não *albicans* nos pacientes do Setor de Transplante de Medula Óssea da UNICAMP foi descrito por Trabasso (2001). O autor verificou que entre os anos de 1997 a 1999 foram confirmados 5 casos de candidemia nessa população. Três (60%) quadros foram causados por *Candida parapsilosis*, 1 (20%) por *Candida lusitanae* e 1 (20%) por *Candida albicans*.

Para os pacientes de maior risco, a importância da vigilância epidemiológica recai na possibilidade de identificação prévia de espécies colonizadoras que são



naturalmente resistentes aos antifúngicos mais comumente utilizados, como a *Candida krusei*, ou na identificação de outras espécies que podem desenvolver resistência após uso prolongado de azólicos. Os pacientes que apresentam doenças onco-hematológicas normalmente fazem uso de profilaxia antifúngica devido ao imunocomprometimento propiciado pela doença de base e/ou pelo tratamento citotóxico. Isso pode levar à seleção de espécies e de cepas com melhor capacidade adaptativa (Epstein *et al.*, 1996; Nolte *et al.*, 1997; Marr *et al.*, 2000a; Pfaller *et al.*, 2000; Safdar & Armstrong, 2002).

Em nosso trabalho somente um paciente, o qual submetido a TCPH Alogênico, desenvolveu candidemia. A espécie identificada foi *Candida krusei*, mas não havia indício de colonização oral prévia. Neste caso podemos supor que o paciente possuía outros sítios colonizados que não a cavidade oral. Outro paciente do mesmo grupo apresentou colonização oral por *Candida krusei* no período pós-TCPH, mas nenhum quadro de infecção estava presente. Um quadro de microabcesso hepático sugestivo de infecção por *Candida* foi encontrado em outro paciente submetido a TCPH Alogênico, mas o agente não foi identificado. Este paciente não apresentou colonização oral por *Candida* no decorrer deste estudo. Assim, não pudemos, em nosso estudo, estabelecer a relação entre a colonização oral e o desenvolvimento de infecção fúngica sistêmica. Apesar disso, o fato de 11 (31,4%) pacientes terem feito uso empírico de anfotericina B devido à presença de febre persistente mesmo durante terapia antimicrobiana durante o transplante, demonstra a dificuldade do diagnóstico de infecção fúngica sistêmica nesses pacientes, e não podemos descartar a possibilidade de infecção por algum dos microorganismos colonizadores da cavidade oral. O uso de técnicas de identificação mais sensíveis como a reação em cadeia da polimerase, talvez pudessem ser úteis na compreensão da dinâmica entre colonização oral e infecção sistêmica por leveduras do gênero *Candida* nesses pacientes.

Dos 35 pacientes incluídos no presente estudo, 4 (11,4%) desenvolveram candidose oral. Todos os eventos ocorreram no período pós-enxertia e somente isolados de *Candida albicans* foram encontrados. Todos esses pacientes, 3 do TCPH Alogênico e 1 do TCPH Autólogo, estavam colonizados inicialmente pela mesma espécie.

A maior ocorrência de candidose oral no período pós-enxertia pode ter decorrido de alterações locais como a mudança da microbiota endógena, diminuição da capacidade protetora da saliva, assim como decorrido de fatores sistêmicos como a imaturidade do sistema imune. A importância da imunidade celular na proteção contra a infecção superficial por *Candida* é evidenciada nos pacientes portadores do HIV os quais comumente apresentam candidose oral recorrente. A maior ocorrência de infecção nestes pacientes é inversamente relacionada com o número de linfócitos-T CD4<sup>+</sup> circulantes (Powderly *et al.*, 1992; Liu *et al.* 2006). Nos pacientes submetidos a TCPH as alterações da imunidade celular são decorrentes tanto da imaturidade do sistema imune no período imediato pós-TCPH, quanto pelo uso de imunossupressores como profilaxia ou tratamento da DECH. Assim, infecções secundárias a defeitos na imunidade celular predominam durante essa fase do transplante (Sable & Donowitz, 1994).

Em nosso trabalho o diagnóstico de candidose oral pseudomembranosa foi baseado principalmente na evidência clínica de infecção. Epstein *et al.* (1980) sugeriram que um valor  $\geq 400$  UFC/ml de saliva indica infecção. Em nosso trabalho, 19 coletas apresentaram valores  $\geq 400$  UFC/ml, mas em somente 4 (21%) casos havia evidência clínica de candidose oral. A ausência de relação entre o número de UFC/ml de saliva e presença de doença também foi descrita por Torres *et al.* (2002).

A análise do cariótipo eletroforético e a determinação da CIM dos isolados orais de leveduras do gênero *Candida* é importante para a vigilância epidemiológica (Hamal *et al.*, 2001). Trabalhos anteriores mostraram a similaridade genotípica entre microorganismos colonizadores orais e causadores de pneumonia fúngica e de infecção fúngica sistêmica, o que sugere a atuação da cavidade oral como um importante nicho para o desenvolvimento de infecção de origem endógena (Redding *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2005).

Embora não tenha sido possível, no presente trabalho, estabelecer a relação entre colonização oral e infecção sistêmica, observamos uma relação entre infecção local e colonização oral prévia. Todos os 4 pacientes do presente estudo que desenvolveram infecção oral no período pós-transplante eram previamente colonizados pela mesma espécie, no caso a *Candida albicans*. Destes pacientes, 3 (75%) apresentaram infecção pela

mesma cepa colonizadora, o que foi evidenciado pela análise do cariótipo eletroforético. A manutenção da mesma cepa de *Candida albicans* colonizadora em quadros infecciosos orais recorrentes tem sido descrita em pacientes portadores do HIV (Schmid *et al.*, 1992; Bart-Delabesse *et al.*, 1993; Lasker *et al.*, 2001).

Em nosso trabalho encontramos um número reduzido de perfis eletroforéticos. O perfil 6 foi encontrado em 9 (64,3%) dos 14 pacientes colonizados ou infectados por *Candida albicans*. A similaridade entre os perfis eletroforéticos encontrados em diferentes pacientes tem sido descrita como evidência de contaminação cruzada (Branchini *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2004). Em nosso trabalho não pudemos confirmar contaminação cruzada, visto que os 4 casos de infecção oral ocorreram no período pós-transplante e em 3 destes casos a cepa infectante foi a mesma cepa previamente identificada como colonizadora oral. Além disso, no outro paciente que apresentou uma cepa diferente durante quadro infeccioso, a mesma cepa não foi identificada em nenhum outro paciente.

Estudos realizados utilizando cariotipagem eletroforética em isolados de *Candida albicans* têm demonstrado discrepância no número de perfis encontrados. Alguns trabalhos mostram grande variabilidade nos perfis, enquanto outros exibem um número reduzido (Lupetti *et al.*, 1995; Capoluongo *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2001; Tavanti *et al.*, 2004). A presença de poucos perfis pode ser devido ao baixo poder discriminatório da técnica utilizada ou pode representar a distribuição natural de linhagens de cepas com maior capacidade de adaptativa à superfície da mucosa oral e que, portanto, são mais freqüentemente encontradas como colonizadoras ou infectantes na mucosa oral (Lupetti *et al.*, 1995; Tavanti *et al.*, 2004).

Segundo Al-Kaarawi *et al.* (2002) parecem existir definidos genótipos de *Candida albicans* que têm predileção por um meio ambiente oral específico ou por um grupo de pacientes. Em nosso trabalho, a população estudada geralmente é submetida a tratamento quimioterápico prévio. Nesses casos, devido à indução de aplasia e ao maior risco de infecção, normalmente os pacientes fazem uso de antifúngico sistêmico o que poderia promover seleção entre as cepas, mantendo-se na cavidade oral as cepas com melhor capacidade adaptativa (Powderly *et al.*, 1992). Outras técnicas como genotipagem

através do uso de enzima de restrição podem ser necessárias para aumentar o poder discriminatório e permitir a distinção entre as cepas estudadas (Branchini *et al.*, 1995; Kanellopoulou *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2003; Ball *et al.*, 2004).

Entre as espécies de *Candida* não *albicans* a identificação da *Candida dubliniensis* como espécie colonizadora e infectante tem ganhado importância devido à maior frequência de desenvolvimento de resistência aos antifúngicos em pacientes que fazem uso prolongado de fluconazol e devido a sua similaridade com a *Candida albicans*, o que dificulta sua identificação por métodos fenotípicos (Sullivan *et al.* 1995; Kirkpatrick *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2002; Campanha *et al.*, 2005). A presença de isolados de *Candida dubliniensis* em quadros de candidose oral tem sido descrita principalmente em pacientes portadores do HIV, mas também em pacientes sob tratamento radioterápico na região de cabeça e pescoço, em pacientes submetidos ao TCPH, assim como em pacientes imunocompetentes (Sullivan *et al.*, 1995; Kirkpatrick *et al.*, 1998; Al-Karaawi *et al.*, 2002; Mariano *et al.*, 2003). Na população brasileira, a incidência de *Candida dubliniensis* gira em torno de 2 a 2,8% dos isolados clínicos anteriormente identificados como *Candida albicans* (Milan *et al.*, 2001; Mariano *et al.*, 2003).

No presente estudo, 2 testes fenotípicos foram realizados para a distinção entre *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. Somente um isolado foi considerado sugestivo de *Candida dubliniensis*, mas não houve confirmação com o uso do sistema Vitek® devido à evidência de assimilação da xilose (Gales *et al.*, 1999). Sullivan *et al.* (1995) descreveram que a presença de uma ou mais bandas <1Mb na cariotipagem eletroforética são indicativas de *Candida dubliniensis* (Redding *et al.* 2001; Martinez *et al.*, 2002). Embora 4 perfis cariótipos eletroforéticos apresentados em nosso trabalho, incluindo o isolado descrito acima, tenham exibido bandas com esse padrão, as nossas condições de corrida foram diferentes das dos trabalhos citados e, portanto, outros testes serão necessários para a distinção entre essas duas espécies (Donnelly *et al.*, 1999; Milan *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2002).

O uso de antifúngicos parece predispor ao desenvolvimento de resistência, ou favorece o crescimento de cepas menos susceptíveis da própria microbiota de pacientes multicolonizados (Pfaller *et al.*, 1994; Marr *et al.*, 1997; Nucci & Colombo, 2002).

Em pacientes imunocompetentes, a incidência de isolados orais de *Candida* resistentes ao fluconazol gira em torno de 1,2%, variando de 0,3% dos isolados de *Candida albicans* a 6,8% dos isolados de *Candida glabrata*. Nesses pacientes, parece não haver diferença na susceptibilidade entre os pacientes com ou sem história de uso prévio de antifúngicos (Kuryama *et al.*, 2005). Esses percentuais parecem aumentar em pacientes imunocomprometidos que fazem uso profilático desse medicamento.

Em pacientes com câncer, a incidência geral de resistência ao fluconazol descrita por Safdar *et al.* (2001b) foi de 9,4%, sendo de 3% entre os isolados de *Candida albicans* e de 30,8% entre os isolados de *Candida glabrata*. Esses autores também encontraram resistência ao itraconazol em 10,8% dos casos, sendo 4% dos isolados de *Candida albicans* e 46,2% dos isolados de *Candida glabrata*. A resistência dos isolados de *Candida albicans* ao fluconazol e ao itraconazol foi associada com exposição prévia as azólicos, o que não ocorreu com os isolados de *Candida glabrata* (Safdar *et al.*, 2001b).

Em nosso trabalho, 91% dos isolados mostraram-se susceptíveis aos antifúngicos testados, valor similar o obtido por Melo (2002) em seu grupo controle. Somente 6 (11%) isolados clínicos, todos de *Candida* não *albicans*, mostraram resistência a uma ou mais drogas testadas, representando 30% dos isolados de *Candida* não *albicans*. A incidência de resistência foi de 3,7% ao fluconazol, cetoconazol e anfotericina e de 9,3% ao itraconazol.

Neste trabalho encontramos um isolado de *Candida parapsilosis* e um de *Candida guilliermondii* resistentes ao itraconazol, um isolado de *Candida parapsilosis* resistente ao itraconazol e ao cetoconazol e um isolado de *Candida guilliermondii* resistente ao fluconazol e ao itraconazol. O único isolado de *Candida* sp. identificado no presente estudo mostrou-se resistente à anfotericina B e o isolado de *Candida krusei* exibiu resistência às 4 drogas testadas. A identificação de isolados orais de *Candida* resistentes aos antifúngicos de uso comum reforça a importância da vigilância epidemiológica para os pacientes submetidos a TCPH na tentativa de adequar o protocolo antifúngico prescrito a esses

pacientes. Além disso, erradicação dos reservatórios orais através da orientação de higiene, adequação do meio e uso de anti-sépticos torna-se imprescindível no intuito de reduzir a colonização e assim, reduzir o risco de desenvolvimento de infecção superficial e de infecção sistêmica.

Nos isolados seqüenciais de *Candida albicans* notamos pequena variação na CIM do fluconazol (0,125-0,25) (Pfaller *et al.*, 1994). Isso foi observado nos isolados obtidos dos 6 pacientes nos quais houve manutenção da mesma cepa colonizadora e nos 3 pacientes nos quais houve re-colonização por uma cepa diferente de *Candida albicans*. Portanto, no presente estudo, não foi possível estabelecer a relação entre o uso de antifúngicos e o desenvolvimento de resistência. A susceptibilidade aos antifúngicos encontrada nos isolados de *Candida albicans* obtidos durante os episódios de candidose oral sugere que fatores locais inerentes ao hospeiro são os responsáveis pela predisposição ao desenvolvimento de candidose oral no período pós-TCPH. A persistência da mesma cepa sugere que a profilaxia com fluconazol não erradica a cepa colonizadora e que a colonização prévia parece ser um pré-requisito para o desenvolvimento de infecção (Wilson *et al.*, 2001).



## 7 CONCLUSÕES

- 1) Houve variação significativa do fluxo salivar em ambos os grupos caracterizada por uma redução no período do transplante e retorno ao padrão inicial nos pacientes submetidos a TCPH Autólogo ( $p=0,0058$ ) e um aumento do fluxo no período do transplante seguido de redução a níveis inferiores ao encontrado na coleta inicial nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico ( $p=0,0003$ );
- 2) Colonização por *Candida* ocorreu em 57% dos 35 pacientes estudados, sendo 52% dos 21 pacientes submetidos a TCPH Alogênico e 64% dos 14 pacientes submetidos a TCPH Autólogo. Durante as coletas B e C, realizadas com o paciente sob regime profilático com fluconazol (200mg/dia), houve uma redução de 60% no número de pacientes colonizados;
- 3) Houve redução do número de UFC/ml de saliva encontrada durante as coletas B e C, realizadas estando o paciente sob regime profilático com fluconazol (200mg/dia), nos pacientes submetidos a TCPH Alogênico seguido de aumento nas coletas subseqüentes a valores superiores ao encontrados na coleta inicial. Nos pacientes submetidos a TCPH Autólogo, não foram identificados pacientes colonizados durante as coletas B e C; nas coletas subseqüentes notou-se aumento do número de UFC/ml a valores superiores aos encontrados na coleta inicial.
- 4) Houve relação inversamente proporcional entre o número de UFC/ml de saliva ( $p=0,005$ );
- 5) Não foi possível estabelecer relação entre o número de UFC/ml de saliva e a presença de candidose oral;
- 6) *Candida albicans* foi a espécie mais freqüentemente encontrada, representando 63% de todos os isolados clínicos. Entre as espécies de *Candida* não *albicans* a *Candida parapsilosis* foi a mais freqüente, seguida da *Candida guilliermondii*;



- 7) Resistência antifúngica foi encontrada em 5 isolados, sendo 2 *Candida parapsilosis*, 2 *Candida guilliermondii*, 1 *Candida krusei* e 1 *Candida* sp.
- 8) Foram encontrados 9 diferentes perfis de cariótipo eletroforético entre aos 35 isolados de *Candida albicans* identificados. Dos 9 pacientes colonizados por *Candida albicans* na coleta inicial e em pelo menos uma coleta posterior, em 6 a mesma cepa foi identificada ao longo do estudo.
- 9) Não foi possível correlacionar a colonização oral por *Candida* spp. com infecção sistêmica. Candidose oral por *Candida albicans* ocorreu em 4 pacientes no período pós-TCPH. Todos os pacientes foram colonizados inicialmente pela mesma espécie. Em 3 casos cepa colonizadora foi a mesma responsável pela infecção. A persistência da mesma cepa sugere que a colonização parece ser um pré-requisito para o desenvolvimento de infecção.

## REFERÊNCIAS\*

1. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clin Infect Dis.** 1997; 24: 1122-8.
2. Adam B, Baillie GS, Douglas LJ. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. **J Med Microbiol.** 2002; 51: 344-9.
3. Alborguetti MR, Correa MEP, Adam RL, Metze K, Coracin FL, Souza CA *et al.* Late effects of chronic graft-vs.-host disease in minor salivary glands. **J Oral Pathol Med.** 2005; 34: 486-93.
4. Al-Karaawi ZM, e al. Molecular characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. **Oral Immunol Immunol.** 2002; 17: 44-9.
5. Alves PC. **Avaliação comparativa de testes de suscetibilidade a antifúngicos pelos métodos NCCLS e EUCAST de leveduras do gênero *Candida* [dissertação].** Campinas: UNICAMP/FCM; 2004.
6. Andruits KA, Riggle PJ, Kumamoto CA, Tzipori S. Intestinal lesions associated with disseminated candidiasis in an experimental animal model. **J Clin Microbiol.** 2000; 38: 2317-23.
7. Ball LM, Bes MA, Theelen B, Boekhout T, Egeler RM, Kuijper EJ. Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and epidemiological examination of *Candida* species colonization in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. **J Clin Microbiol.** 2004; 42: 1673-9.
8. Bart-Delabesse E, Boiron P, Carlotti A, Dupont B. *Candida albicans* genotyping in studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. **J Clin Microbiol.** 1993; 31: 2933-7.
9. Beck-Sagué CM, Jarvis WR, and the National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1982-1990. **J Infect Dis.** 1993; 167: 1247-51.
10. Bonan PRF, Pires FR, Lopes MA, Di Hipolito Jr. Evaluation of salivary flow in patients during head and neck radiotherapy. **Pesqui Odontol Bras.** 2003; 17: 156-60.
11. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol.** 1994; 32: 452-6.

---

\*De acordo com a norma UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

12. Branchini MLM, Geiger DCP, Fischman O, Pignatari AC. Molecular typing of *Candida albicans* strains isolated from nosocomial candidemia. **Rev Inst Med trop São Paulo**. 1995; 37: 483-7.
13. Campanha NH, Neppelenbroek KH, Spolidorio DMP, Spolidorio LC, Pavarina AC. Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. **Oral Dis**. 2005; 11: 392-8.
14. Capoluongo E, Moretto D, Giglio A, Belardi M, Prignano G, Crescimbeni E *et al*. Heterogeneity of oral isolates of *Candida albicans* in HIV-positive patients: correlation between candidal carriage, karyotype and disease stage. **J Med Microbiol**. 2000; 49: 985-91.
15. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ *et al*. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. **J Dent Res**. 2001; 80: 903-8.
16. Chandrasekar PH, Gatny CM, Bone Marrow Transplant Team. The effect of fluconazole prophylaxis on fungal colonization in neutropenic cancer patients. **J Antimicrob Chemother**. 1994; 33: 309-18.
17. Colombo AL, Branchini ML, Geiger D, Schmidt AL, Pignatari ACC, Fischman O. Gastrointestinal translocation as a possible source of candidemia in an AIDS patient. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 1996; 38: 197-200.
18. Colombo AL, Nucci M, Salomao R, Branchini MLM, Richtmann R, Derossi A *et al*. High rate of non-*albicans* candidemia in brazilian tertiary care hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 1999; 34: 281-6.
19. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2003; 36: 599-607.
20. Coracin FL, Pizzigatti Correa ME, Camargo EE, Peterson DE, de Oliveira Santos A, Vigorito AC *et al*. Major salivary gland damage in allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation assessed by scintigraphic methods. **Bone Marrow Transplant**. 2006; 37: 955-9.
21. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. 1999; 284: 1318-22.
22. De La Rosa GR, Champlin RE, Kontoyiannis DP. Risk factors for the development of invasive fungal infections in allogeneic blood and marrow transplant recipients. **Transpl Infect Dis**. 2002; 4: 3-9.
23. Degregorio MW, Lee WMF, Ries CA. *Candida* infections in patients with acute leukemia: ineffectiveness of nystatin prophylaxis and relationship between oropharyngeal and systemic candidiasis. **Cancer**. 1982; 50: 2780-4.
24. Donnelly SM, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. **Microbiology**. 1999; 145: 1871-82.

25. Edgerton M, Scannapieco FA, Reddy MS, Levine MJ. Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. **Infect Immun.** 1993; 61: 2644-52.
26. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet.** 2003; 3: 685-702.
27. Ellepola AN, Samaranayake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. **Oral Dis.** 2001; 7: 11-7.
28. Epstein JB, Pearsall NN, Truelove EL. Quantitative relationships between *Candida albicans* in saliva and the clinical status of human subjects. **J Clin Microbiol.** 1980; 12: 475-6.
29. Epstein JB, Ransier A, Lunn R, Chin E, Jacobson JJ, Le N *et al.* Prophylaxis of candidiasis in patients with leukemia and bone marrow transplants. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1996; 81: 291-6.
30. Epstein JB, Hancock PJ, Nantel S. Oral candidiasis in hematopoietic cell transplantation patients: an outcome-based analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2003; 96: 154-63.
31. Espinel-Ingroff A, Steele-Moore L, Galgiani JN. Evaluation of 80% inhibition standards for the determination of fluconazole minimum inhibitory concentrations in three laboratories. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 1994; 20: 81-6.
32. Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC *et al.* Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and  $\alpha$ -methyl-D-glucoside as determined with the API 20 AUX and Vitek YBC systems. **J Clin Microbiol.** 1999; 37: 3804-8.
33. Goodman JL, Winston DJ, Greenfield RA, Chandrasekar PH, Fox B, Kaizer H *et al.* A controlled trial of fluconazole to prevent fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation. **N Engl J Med.** 1992; 326: 845-51.
34. Goodrich JM, Reed EC, Mori M, Fisher LD, Skerrett S, Dandliker PS *et al.* Clinical features and analysis of risk factors for invasive candidal infection after marrow transplantation. **J Infect Dis.** 1991; 164: 731-40.
35. Grosso RM, Santos PSS, Wakin RCS, Barros JCA. Uso do coletor de saliva em paciente transplantado de medula óssea com mucosite oral: relato de caso [resumo M-032]. **Rev Bras Hematol Hemoter.** 2005; 27(supl 1): 75.
36. Hamal P, Kappe R, Rimek D. Rate of transmission and endogenous origin of *C. albicans* and *C. glabrata* on adult intensive care units studied by pulsed field gel electrophoresis. **J Hosp Infect.** 2001; 49: 37-42.
37. Hannula J, Saarela M, Jousimies-Somer H, Takala A, Syrjänen R, Könönen E *et al.* Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal yeast species and stability of colonization in young children. **Oral Microbiol Immunol.** 1999; 14: 176-82.

38. Hoppe JE, Klausner M, Klingebiel T, Niethammer D. Retrospective analysis of yeast colonization and infections in paediatric bone marrow transplant recipients. **Mycoses**. 1997; 40: 47-54.
39. Hossain H, Ansari F, Schulz-Weidner N, Wetzel WE, Chakraborty T, Domann E. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. **Oral Microbiol Immunol**. 2003; 18: 302-8.
40. Hsu LY, Minah GE, Peterson DE, Wingard JR, Merz WG, Altomonte V *et al*. Coaggregation of oral *Candida* isolates with bacteria from bone marrow transplant recipients. **J Clin Microbiol**. 1990; 28: 2621-6.
41. Huang YC, Su LH, Wu TL, Lin TY. Genotyping analysis of colonizing candidal isolates from very-low-birthweight infants in a neonatal intensive care unit. **J Hosp Infect**. 2004; 58: 200-3.
42. Jorge AOC, Totti MAG, Almeida OP, Scully C. Oral candidiasis established in the sialoadenectomised rats. **J Oral Pathol Med**. 1993a; 22: 54-6.
43. Jorge AOC, Totti MAG, Almeida OP, Scully C. Effect of sialoadenectomy on the carriage of *Candida albicans* in mouths of rats. **J Oral Pathol Med**. 1993b; 22: 138-40.
44. Kamagata-Kiyoura Y, Abe S, Yamaguchi H, Nitta T. Protective effects of human saliva on experimental murine oral candidiasis. **J Infect Chemother**. 2004; 10: 253-5.
45. Kanellopoulou M, Stamos G, Petinnelli I, Savala M, Tzimogianni A, Legakis NJ *et al*. Subtyping and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. in the intensive care unit of a Greek general hospital. **Int J Antimicrob Agent**. 2001; 18: 179-83.
46. Kern ME. **Medical mycology. A self-instructional text**. Philadelphia: F.A. Davis Company; 1985.
47. Kirkpatrick WR, Revankar SG, Mcatee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI *et al*. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. **J Clin Microbiol**. 1998; 36: 3007-12.
48. Klepser ME, Lewis RE, Pfaller MA. Therapy of *Candida* infections: susceptibility testing, resistance, and therapeutic options. **Ann Pharmacother**. 1998; 32: 1353-61.
49. Kolbinson DA, Schubert MM, Flournoy N, Truelove EL. Early oral changes following bone marrow transplantation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1988; 66: 130-8.
50. Krause W, Matheis H, Wulf K. Fungemia and funguria after oral administration of *Candida albicans*. **Lancet** 1969; 1: 598-9.

51. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrob Agents Chemother.** 2002; 46: 1773-80.
52. Kurnatowska AJ. Search for correlation between symptoms and signs of changes in the oral mucosa and presence of fungi. **Mycoses.** 2001; 44: 379-82.
53. Lasker BA, Elie CM, Lott TJ, Espinel-Ingroff A, Gallagher L, Kuykendall RJ *et al.* Molecular epidemiology of *Candida albicans* strains isolated from the oropharynx of HIV-positive patients at successive clinic visits. **Med Mycol.** 2001; 39: 341-52.
54. Levy S, Nagler A, Okon S, Marmary Y. Parotid salivary gland dysfunction in chronic graft-versus-host disease (cGVHD): a longitudinal study in a mouse model. **Bone Marrow Transplant.** 2000; 25: 1073-8.
55. Liu X, Liu H, Guo Z, Luan W. Association of asymptomatic oral candidal carriage, oral candidiasis and CD4<sup>+</sup> lymphocyte count in HIV-positive patients in China. **Oral Dis.** 2006; 12: 41-4
56. Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR. Natural desenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. **J Dent Res.** 1999; 78: 857-68.
57. Lupetti A, Guzzi G, Paladini A, Swart K, Campa M, Senesi S. Molecular typing of *Candida albicans* in oral candidiasis: karyotype epidemiology with human immunodeficiency virus-seropositive patients in comparison with that with healthy carriers. **J Clin Microbiol.** 1995; 33: 1238-1242.
58. MacMillan ML, Goodman JL, Defor TE, Weisdorf DJ. Fluconazole to prevent yeast infections in bone marrow transplantation patients: a randomized trial of high *versus* reduced dose, and determination of the value of maintenance therapy. **Am J Med.** 2002; 112: 369-79.
59. Manfredi M, Al-Karaawi Z, McCullough MJ, Hurel S, Porter SR. The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. **Oral Microbiol Immunol.** 2002; 17: 181-185.
60. Mariano PLS, Milan EP, Matta DA, Colombo AL. *Candida dubliniensis* identification in brazilian yeast stock collection. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2003; 98: 533-8.
61. Marr KA, White TC, Burik JH, Bowden RA. Development of fluconazole resistance in *Candida albicans* causing disseminated infection in a patient undergoing marrow transplantation. **Clin Infect Dis.** 1997; 25: 908-10.
62. Marr KA, Bowden RA. Fungal infections in patients undergoing blood and marrow transplantation. **Transpl Infect Dis.** 1999; 1: 237-46.

63. Marr KA, Seidel K, White TC, Bowden RA. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. **J Infect Dis.** 2000a; 181: 309-16.
64. Marr KA. The changing spectrum of candidemia in oncology patients: therapeutic implications. **Curr Opin Infect Dis.** 2000b; 13: 615-20.
65. Martinez M, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *Candida dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. **J Clin Microbiol.** 2002; 40: 3135-9.
66. Mellado E, Cuenca-Estrella M, Regadera J, González M, Díaz-Guerra TM, Rodríguez-Tudela JL. Sustained gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* in adult mice. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2000; 38: 21-8.
67. Melo NR. **Caracterização de *Candida* spp. e susceptibilidade a agentes antifúngicos em isolados orais de pacientes HIV+ [tese].** Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2002.
68. Milan EP, Burattini MN, Kallás EG, Fischmann O, Costa PRO, Colombo AL. Azole resistance among oral *Candida* species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 1998; 32: 311-6.
69. Milan EP, Sant'Ana PLS, Melo ASA, Sullivan DJ, Coleman DC, Lewi D *et al.* Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2001; 41: 29-35.
70. Nagler RM, Nagler A. The effect of pilocarpine on salivary constituents in patients with chronic graft-versus-host disease. **Arch Oral Biol.** 2001; 46: 689-95.
71. Nagler RM, Nagler A. The molecular basis of salivary gland involvement in graft-vs.-host disease. **J Dent Res.** 2004; 83: 98-103.
72. Nagler RM, Hershkovich O. Relationships between age, drugs, oral sensorial complaints and salivary profile. **Arch Oral Biol.** 2005; 50: 7-16.
73. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) and document M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard – second edition. 2002. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
74. Navazesh M, Christensen C, Brightman V. Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. **J Dent Res.** 1992; 71: 1363-9.
75. Navazesh M, Wood G, Brightman V. Relationship between salivary flow rates and *Candida albicans* counts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1995; 80: 284-8.

76. Nolte F, Parkinson T, Falconer DJ, Dix S, Williams J, Gilmore C *et al.* Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. **Antimicrob Agents Chemother.** 1997; 44: 196-9.
77. Nucci M, Anaissie E. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? **Clin Infect Dis.** 2001; 33: 1959-67.
78. Nucci M, Colombo AL. Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. **Braz J Infect Dis.** 2002; 6: 124-8.
79. Nucci M, Andrade F, Vigorito A, Trabasso P, Aranha JF, Maiolino A *et al.* Infectious complications in patients randomized to receive allogeneic bone marrow or peripheral blood transplantation. **Transpl Infect Dis.** 2003; 5: 167-73.
80. Odds FC, Bernaerts, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J Clin Microbiol.** 1994; 32: 1923-9.
81. Pagano L, Antinori A, Ammassari A, Mele L, Nosari A, Melillo L *et al.* Retrospective study of candidemia in patients with hematological malignancies: clinical features, risk factors and outcome of 76 episodes. **Eur J Haematol.** 1999; 63: 77-85.
82. Pereira CM, Pires FR, Corrêa MEP, Di Hipólito Jr O, Almeida OP. *Candida* in saliva of brazilian hemophilic patients. **J Appl Oral Sci.** 2004; 12: 301-6.
83. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of candida species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. **J Prosth Dent.** 2005; 93: 288-93.
84. Peterson DE. Xerostomia: any progress? **Support Care Cancer.** 2003; 11: 199-200.
85. Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Redding SW, Smith J, Farinacci G, Fothergill AW *et al.* Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. **J Clin Microbiol.** 1994; 32: 59-64.
86. Pfaller MA. Epidemiology of candidiasis. **J Hosp Infect.** 1995; 30(suppl): 329-38.
87. Pfaller MA, Rex JR, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. **Clin Infect Dis.** 1997; 24: 776-84.
88. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A *et al.* Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. **Antimicrob Agents Chemother.** 2000; 44: 747-51.
89. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. **Ann Surg.** 1994; 220: 751-8.



90. Porter SR, Scully C, Hegarty AM. An update of the etiology and management of xerostomia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2004; 97: 28-46.
91. Powderly WG, Robinson K, Keath EJ. Molecular typing of *Candida albicans* isolated from oral lesions of HIV-infected individuals. **AIDS.** 1992; 6: 81-4.
92. Ramage G, Walle KV, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother.** 2001; 45: 2475-9.
93. Reagan DR, Pfaller MA, Hollis RJ, Wenzel RP. Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. **J Clin Microbiol.** 1990; 28: 2733-8.
94. Redding SW, Bailey CW, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Fothergill AW, Rinaldi MG *et al.* *Candida dubliniensis* in radiation-induced oropharyngeal candidiasis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2001; 91: 659-62.
95. Redding SW, Marr KA, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Patterson TF. *Candida glabrata* sepsis secondary to oral colonization in bone marrow transplantation. **Med Mycol.** 2004; 42: 479-81.
96. Repentigny L, Phaneuf M, Mathieu L. Gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in intact and immunocompromised mice. **Infect Immun.** 1992; 60: 4907-14.
97. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA *et al.* Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infections. **Clin Infect Dis.** 1997;24: 235-47.
98. Sable CA, Donowitz GR. Infections in bone marrow transplant recipients. **Clin Infect Dis.** 1994; 18: 273-84.
99. Safdar A, Armstrong D. Prospective evaluation of *Candida* species colonization in hospitalized cancer patients: impact on short-term survival in recipients of marrow transplantation and patients with hematological malignances. **Bone Marrow Transplant.** 2002; 30: 931-5.
100. Safdar A, van Rhee F, Henslee-Downey JP, Singhal S, Mehta J. *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia after high-risk allogeneic marrow transplantation: no adverse effects of low-dose fluconazole prophylaxis on incidence and outcome. **Bone Marrow Transplant.** 2001a; 28: 873-8.
101. Safdar A, Chaturvedi V, Cross EW, Park S, Bernard EM, Armstrong D *et al.* Prospective study of *Candida* species in patients at a comprehensive cancer center. **Antimicrob Agents Chemother.** 2001b; 45: 2129-33.
102. Samonis G, Rolston K, Karl C, Miller P, Bodey GP. Prophylaxis of oropharyngeal candidiasis with fluconazole. **Rev Infect Dis.** 1990; 12(Suppl 3): S369-73.

103. Schmid J, Odds FC, Wiselka MJ, Nicholson KG, Soll DR. Genetic similarity and maintenance of *Candida albicans* strains from a group of AIDS patients, demonstrated by DNA fingerprint. **J Clin Microbiol.** 1992; 30: 935-41.
104. Scully C. Drug effects on salivary glands: dry mouth. **Oral Dis.** 2003; 9: 165-76.
105. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LSW. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissue. **Archs Oral Biol.** 1997; 42: 513-20.
106. Sen BH, Chugal NM, Liu H, Fleischmann MD. A new method for studying the adhesion of *Candida albicans* to dentin in the presence or absence of smear layer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2003; 96: 201-6.
107. Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro; 1999.
108. Silva M. Estudo da prevalência e avaliação da susceptibilidade a antifúngicos de espécies de *Candida* isoladas a partir de espécies clínicas de pacientes portadores de malignidades hematológicas [dissertação]. Campinas: UNICAMP/FCM; 2001.
109. Slavin MA, Osborne B, Adams R, Levenstein MJ, Schoch HG, Feldman AR *et al.* Efficacy and safety of fluconazole prophylaxis for fungal infections after marrow transplantation – a prospective, randomized, double-blind study. **J Infect Dis.** 1995; 171: 1545-52.
110. Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncol.** 1998; 34: 39-43.
111. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M *et al.* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer.** 2004; 100(Supl 9): 1995-2025.
112. Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Cytotoxic drugs, radiotherapy and oral candidiasis. **Oral Oncol.** 2004; 40: 971-8.
113. Sreebny LM. Saliva in health and disease: an appraisal and update. **Int Dent J.** 2000; 50: 140-61.
114. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidiasis in HIV-infected individuals. **Microbiology.** 1995; 141: 1507-21.
115. Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E *et al.* Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. **J Oral Pathol Med.** 2003; 32: 586-94.
116. Tavanti A, Pardini G, Campa D, Davini P, Lupetti A, Senesi S. Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (SAP-10) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. **J Clin Microbiol.** 2004; 42: 4726-34.

117. Taylor BN, Harrer T, Pscheidl E, Schweizer A, Röllinghoff M, Schröppel K. Surveillance of nosocomial transmission of *Candida albicans* in an intensive care unit by DNA fingerprinting. **J Hosp Infect.** 2003; 55: 283-9.
118. Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Silva EB, Akiti T, Nucci M. Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2002; 93: 149-54.
119. Totti MA, Santos EB, Almeida OP, Koga-Ito CY, Jorge AO. Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. **Pesqui Odontol Bras.** 2004; 18: 202-7.
120. Trabasso P. **Estudo clínico-epidemiológico das infecções fúngicas em receptores de transplante de medula óssea no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas [tese].** Campinas: UNICAMP/FCM; 2001.
121. Verfaillie C, Weisdorf D, Haake R, Hostetter M, Ramsay NKC, McGlave P. *Candida* infections in bone marrow transplant recipients. **Bone Marrow Transplant.** 1991; 8: 177-84.
122. Vincent JL, Anaissie E, Bruining H, Demajo W, El-Ebiary M, Haber J *et al.* Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care. **Intensive Care Med.** 1998; 24: 206-16.
123. Voss A, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, Doebbeling BN. Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. **J Clin Microbiol.** 1994; 32: 975-80.
124. Wanke B, Lazéra MS, Nucci M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2000; 95(Suppl I): 153-8.
125. Wenzel RP. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. **Clin Infect Dis.** 1995; 20: 1531-4.
126. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-acquired candidemia: the attributable mortality and excess length of stay. **Arch Intern Med.** 1988; 148: 2642-5.
127. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Risk factors for hospital-acquired candidemia: a matched case-control study. **Arch Intern Med.** 1989; 149: 2349-53.
128. Whalin YB. Salivary secretion rate, yeast cells, and oral candidiasis in patients with acute leukemia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1991; 71: 689-95.
129. Willinger B, Manafi M. Evaluation of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. **Mycoses.** 1999; 42: 61-5.
130. Wilson MJ, Williams DW, Forbes MDL, Finlay IG, Lewis MAO. A molecular epidemiological study of sequential oral isolates of *Candida albicans* from terminally ill patients. **J Oral Pathol Med.** 2001; 30: 206-12.

131. Wingard JR, Merz WG, Rinald MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. **N Engl J Med.** 1991; 325: 1274-7.
132. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin Infect Dis.** 1995; 20: 115-25.
133. Wingard JR. Antifungal chemoprophylaxis after blood and marrow transplantation. **Clin Infect Dis.** 2002; 34: 1386-90.
134. Yamamoto T, Ueta E, Kamatani T, Osaki T. DNA identification of the pathogen of candidal aspiration pneumonia induced in the course of cancer therapy. **J Med Microbiol.** 2005; 54: 493-6.



## ANEXOS

Anexo 1  
Valores do fluxo salivar (ml/min) medidos nos diferentes períodos de estudo  
em pacientes submetidos a TCPH Alogênico

| Paciente / UPN | Coleta A | Coleta B | Coleta C | Coleta D | Coleta E |
|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1 475          | 0,462    |          |          |          |          |
| 4 478          | 0,260    | 0,414    | 0,366    | 0,500    | 0,394    |
| 5 481          | 0,824    | *        |          |          |          |
| 6 483          | 0,352    | 0,482    | 0,642    | 0,420    |          |
| 10 485         | 0,238    | 1,330    | 0,626    | 0,384    | 0,166    |
| 11 488         | 0,686    | 0,998    | 1,192    | 1,416    | 0,434    |
| 14 492         | 0,844    | *        |          |          |          |
| 15 494         | 0,190    | 0,362    |          |          |          |
| 16 495         | 0,122    | 0,364    | *        | *        |          |
| 18 499         | 0,144    | 0,192    | 0,160    | 0,132    | 0,070    |
| 19 500         | 0,250    | 0,790    | 0,528    | 0,264    | 0,580    |
| 21 502         | 0,252    | 0,556    | 0,262    | 0,090    | 0,128    |
| 22 503         | 0,368    | 0,386    | 0,398    | 0,260    | 0,112    |
| 23 504         | 0,235    | *        |          |          |          |
| 24 505         | 0,250    | 0,632    | 0,558    | 0,294    |          |
| 27 511         | 0,482    | 0,352    | 0,614    | 0,286    | 0,158    |
| 29 510         | 0,106    | *        | 0,170    | 0,172    |          |
| 32 514         | 0,570    | *        |          |          |          |
| 36 520         | 0,234    | 0,232    |          |          |          |
| 37 522         | 0,424    |          |          |          |          |
| 38 523         | 0,314    | 1,088    | 0,568    | 0,340    | 0,127    |
| Número         | 21       | 14       | 12       | 12       | 9        |
| Mediana        | 0,260    | 0,448    | 0,543    | 0,290    | 0,158    |
| Média          | 0,362    | 0,584    | 0,507    | 0,380    | 0,241    |
| Desvio padrão  | 0,215    | 0,344    | 0,277    | 0,347    | 0,180    |
| Valor máximo   | 0,844    | 1,330    | 1,192    | 1,416    | 0,580    |
| Valor mínimo   | 0,106    | 0,192    | 0,160    | 0,090    | 0,070    |

UPN. "Unique Patient Number"; (\*) Coletas realizadas com zaragatoa;  Pacientes que vieram a óbito;  
 Coleta não realizada

**Anexo 2**  
**Valores do fluxo salivar (ml/min) medidos nos diferentes períodos de estudo**  
**em pacientes submetidos a TCPH Autólogo**

| Paciente / UPN |     | Coleta A | Coleta B | Coleta C | Coleta D | Coleta E |
|----------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|
| 2              | 477 | 0,758    | 0,222    | *        |          |          |
| 7              | 482 | 0,482    | 0,742    | 0,330    | 0,530    | 0,416    |
| 8              | 484 | 0,166    | 0,594    | 0,234    | 0,460    | 0,216    |
| 9              | 487 | 0,730    | 0,520    | 0,318    | 0,912    | 0,932    |
| 13             | 491 | 1,176    | 0,484    | 0,406    | 0,572    | 0,478    |
| 17             | 497 | 0,546    | 0,158    | 0,638    | 0,766    | 0,538    |
| 20             | 501 | 0,260    | 0,136    | 0,154    | 0,302    | 0,306    |
| 25             | 506 | 0,478    | 0,166    | 0,176    | 0,316    | 1,242    |
| 26             | 507 | 0,506    | 0,622    | 0,304    | 0,682    | 0,590    |
| 28             | 509 | 0,048    | *        | *        |          |          |
| 30             | 512 | 0,320    | 0,110    |          |          |          |
| 33             | 516 | 0,442    | 0,178    | 0,078    | 0,096    |          |
| 34             | 517 | 0,432    | 0,212    |          |          |          |
| 39             | 524 | 0,656    | 0,472    | 0,534    | 0,410    | 0,464    |
| Número         |     | 14       | 13       | 10       | 10       | 9        |
| Mediana        |     | 0,480    | 0,222    | 0,311    | 0,495    | 0,478    |
| Média          |     | 0,500    | 0,355    | 0,317    | 0,505    | 0,576    |
| Desvio padrão  |     | 0,280    | 0,221    | 0,173    | 0,242    | 0,321    |
| Valor máximo   |     | 1,176    | 0,742    | 0,638    | 0,912    | 1,242    |
| Valor mínimo   |     | 0,048    | 0,110    | 0,078    | 0,096    | 0,216    |

UPN= "Unique Patient Number"; (\*) Coletas realizadas com zaragatoa;  Pacientes que vieram a óbito;  
 Coleta não realizada

Anexo 3  
Número de UFC/ml de saliva obtido nos diferentes períodos de estudo  
dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico

| Paciente / UPN   |     | Coleta A<br>UFC/ml | Coleta B<br>UFC/ml | Coleta C<br>UFC/ml | Coleta D<br>UFC/ml | Coleta E<br>UFC/ml |
|------------------|-----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1                | 475 | 0                  |                    |                    |                    |                    |
| 4                | 478 | 1620               | 0                  | 0                  | 5                  | 780                |
| 5                | 481 | 0                  | *0                 |                    |                    |                    |
| 6                | 483 | 260                | 0                  | 0                  | 3500               |                    |
| 10               | 485 | 210                | 0                  | 15                 | 430                | 7.700              |
| 11               | 488 | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  |
| 14               | 492 | 0                  | *0                 |                    |                    |                    |
| 15               | 494 | 0                  | 50                 |                    |                    |                    |
| 16               | 495 | 0                  | 0                  | *0                 | *0                 |                    |
| 18               | 499 | 20                 | 200                | 4                  | 25.300             | 3.660              |
| 19               | 500 | 0                  | 0                  | 0                  | 1.490              | 0                  |
| 21               | 502 | 4                  | 12                 | 0                  | 340                | 180                |
| 22               | 503 | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  |
| 23               | 504 | 0                  | *0                 |                    |                    |                    |
| 24               | 505 | 16                 | 0                  | 0                  | 10                 |                    |
| 27               | 511 | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  | 8                  |
| 29               | 510 | 120                | *0                 | 2                  | 73.600             |                    |
| 32               | 514 | 0                  | *0                 |                    |                    |                    |
| 36               | 520 | 0                  | 0                  |                    |                    |                    |
| 37               | 522 | 0                  |                    |                    |                    |                    |
| 38               | 523 | 0                  | 0                  | 0                  | 30                 | 0                  |
| Número           |     | 21                 | 19                 | 13                 | 13                 | 9                  |
| Positivas, n (%) |     | 7 (33,5)           | 3 (15,8)           | 3 (23,1)           | 9 (69,3)           | 5 (55,5)           |
| Negativas, n (%) |     | 14 (66,5)          | 16 (84,2)          | 10 (76,9)          | 4 (30,7)           | 4 (44,5)           |
| Média UFC/ml     |     | 107                | 19                 | 2                  | 8.725              | 1.370              |
| Número           |     |                    |                    |                    |                    | 75                 |
| Positivas (%)    |     |                    |                    |                    |                    | 27 (36)            |
| Negativas (%)    |     |                    |                    |                    |                    | 48 (64)            |
| Média UFC/ml     |     |                    |                    |                    |                    | 1.758              |

UPN= "Unique Patient Number"; (\*) Coletas realizadas com zaragatoa (valores não utilizados para a determinação da média);  Pacientes que vieram a óbito;  Coleta não realizada



Anexo 4  
Número de UFC/ml de saliva obtido nos diferentes períodos de estudo dos  
pacientes submetidos a TCPH Autólogo

| Paciente / UPN   | Coleta A<br>UFC/ml | Coleta B<br>UFC/ml | Coleta C<br>UFC/ml | Coleta D<br>UFC/ml | Coleta E<br>UFC/ml |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 2      477       | 0                  | 0                  | *0                 |                    |                    |
| 7      482       | 360                | 0                  | 0                  | 1.920              | 370                |
| 8      484       | 6                  | 0                  | 0                  | 2.360              | 2.100              |
| 9      487       | 0                  | 0                  | 0                  | 1.420              | 80                 |
| 13     491       | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  |
| 17     497       | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  |
| 20     501       | 3.700              | 0                  | 0                  | 15.000             | 18.340             |
| 25     506       | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  |
| 26     507       | 790                | 0                  | 0                  | 370                | 4.380              |
| 28     509       | 25                 | *0                 | *0                 |                    |                    |
| 30     512       | 100                | 0                  |                    |                    |                    |
| 33     516       | 460                | 0                  | 0                  | 5.200              |                    |
| 34     517       | 420                | 0                  |                    |                    |                    |
| 39     524       | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  |
| Número           | 14                 | 14                 | 12                 | 10                 | 9                  |
| Positivas, n (%) | 8 (57,1)           | 0 (0,0)            | 0 (0,0)            | 6 (60,0)           | 5 (55,5)           |
| Negativas, n (%) | 6 (42,9)           | 14 (100,0)         | 12 (100,0)         | 4 (40,0)           | 4 (44,5)           |
| Média UFC/ml     | 419                | 0                  | 0                  | 2.627              | 2.808              |
|                  |                    |                    |                    | Número             | 59                 |
|                  |                    |                    |                    | Positivas (%)      | 19 (32,2)          |
|                  |                    |                    |                    | Negativas (%)      | 40 (67,8)          |
|                  |                    |                    |                    | Média de UFC/ml    | 1.025              |

UPN= "Unique Patient Number"; (\*) Coletas realizadas com zaragatoa (valores não utilizados para a determinação da média);  Pacientes que vieram a óbito;  Coleta não realizada

Anexo 5  
Resultados dos testes de susceptibilidade antifúngica das cepas de *Candida* spp. obtidas dos pacientes submetidos a TCPH Alogênico

| Levedura                 | Isolado | Concentração inibitória mínima (µg/ml) – CIM |       |       |        |
|--------------------------|---------|----------------------------------------------|-------|-------|--------|
|                          |         | FLUCO                                        | ITRA  | CETO  | ANFO B |
| <i>C. albicans</i>       | 4Aa     | 0,25                                         | 0,25  | 0,06  | 0,5    |
|                          | 4E      | 0,25                                         | 0,25  | 0,06  | 0,5    |
|                          | 6Aa     | 0,5                                          | 0,25  | 0,06  | 1      |
|                          | 10Aa    | 0,25                                         | 0,25  | 0,03  | 1      |
|                          | 10C     | 0,25                                         | 0,25  | 0,06  | 1      |
|                          | 10Da    | 0,25                                         | 0,25  | 0,125 | 1      |
|                          | 10E     | 0,25                                         | 0,25  | 0,06  | 0,5    |
|                          | 18A     | 0,125                                        | 0,125 | 0,03  | 0,5    |
|                          | 18B     | 0,125                                        | 0,25  | 0,03  | 0,5    |
|                          | 18C     | 0,25                                         | 0,25  | 0,06  | 0,5    |
|                          | 18D     | 0,25                                         | 0,5   | 0,03  | 0,5    |
|                          | 18E     | 0,125                                        | 0,25  | 0,03  | 0,5    |
|                          | 21A     | 0,5                                          | 0,25  | 0,06  | 0,5    |
|                          | 21Ba    | 0,5                                          | 0,25  | 0,06  | 0,5    |
|                          | 21D     | 0,5                                          | 0,125 | 0,06  | 1      |
|                          | 21CO    | 0,25                                         | 0,25  | 0,06  | 0,5    |
|                          | 24A     | 0,125                                        | 0,25  | 0,03  | 0,5    |
|                          | 29A     | 0,25                                         | 0,25  | 0,06  | 0,5    |
|                          | 29C     | 0,25                                         | 0,25  | 0,06  | 0,5    |
|                          | 29D     | 0,125                                        | 0,25  | 0,03  | 0,5    |
| <i>C. parapsilosis</i>   | 4D      | 2                                            | 0,25  | 0,125 | 1      |
|                          | 6Ab     | 2                                            | 0,25  | 0,125 | 1      |
|                          | 10Db    | 4                                            | 1     | 1     | 1      |
|                          | 21Bb    | 2                                            | 0,25  | 0,125 | 1      |
|                          | 27E     | 2                                            | 0,25  | 0,125 | 1      |
|                          | 38D     | 1                                            | 0,5   | 0,06  | 0,5    |
| <i>C. guilliermondii</i> | 4Ab     | 16                                           | 0,5   | 0,125 | 1      |
|                          | 10Ab    | 8                                            | 1     | 0,5   | 0,5    |
|                          | 15B     | 64                                           | 1     | 0,25  | 1      |
|                          | 24D     | 16                                           | 0,5   | 0,5   | 1      |
| <i>C. tropicalis</i>     | 21E     | 0,5                                          | 0,5   | 0,06  | 1      |
| <i>C. lusitaniae</i>     | 6Db     | 0,5                                          | 0,5   | 0,06  | 1      |
| <i>C. krusei</i>         | 19D     | 64                                           | 1     | 2     | 2      |
| <i>Candida</i> sp.       | 6Da     | 2                                            | 0,5   | 0,06  | 2      |

CIM=Concentração inibitória mínima; FLUCO=fluconazol; ITRA=itraconazol; CETO=cetoconazol; ANFO B=anfotericina B.

Anexo 6  
Resultados dos testes de susceptibilidade antifúngica das cepas de *Candida* spp. obtidas dos pacientes submetidos a TCPH Autólogo

| Levedura               | Isolado | Concentração inibitória mínima (µg/ml) – CIM |      |       |        |
|------------------------|---------|----------------------------------------------|------|-------|--------|
|                        |         | FLUCO                                        | ITRA | CETO  | ANFO B |
| <i>C. albicans</i>     | 7A      | 0,5                                          | 0,25 | 0,03  | 0,5    |
|                        | 7D      | 0,25                                         | 0,25 | 0,06  | 1      |
|                        | 7E      | 0,25                                         | 0,25 | 0,06  | 0,5    |
|                        | 8Aa     | 0,25                                         | 0,25 | 0,06  | 0,5    |
|                        | 8Da     | 0,5                                          | 0,5  | 0,06  | 0,5    |
|                        | 8E      | 0,5                                          | 0,25 | 0,06  | 0,5    |
|                        | 9D      | 0,25                                         | 0,5  | 0,06  | 0,5    |
|                        | 9E      | 0,25                                         | 0,25 | 0,06  | 1      |
|                        | 20A     | 0,25                                         | 0,25 | 0,03  | 0,5    |
|                        | 20D     | 0,25                                         | 0,25 | 0,06  | 0,5    |
|                        | 20E     | 0,25                                         | 0,25 | 0,06  | 0,5    |
|                        | 30A     | 0,25                                         | 0,25 | 0,125 | 0,5    |
|                        | 33A     | 0,25                                         | 0,5  | 0,06  | 1      |
|                        | 33D     | 0,125                                        | 0,25 | 0,06  | 0,5    |
|                        | 34A     | 0,125                                        | 0,25 | 0,03  | 0,5    |
| <i>C. parapsilosis</i> | 8Ab     | 2                                            | 1    | 0,5   | 1      |
|                        | 8Db     | 2                                            | 0,5  | 0,125 | 1      |
|                        | 26D     | 2                                            | 0,25 | 0,125 | 1      |
|                        | 26E     | 1                                            | 0,5  | 0,25  | 1      |
|                        | 28A     | 1                                            | 0,25 | 0,06  | 1      |
| <i>C. tropicalis</i>   | 26A     | 1                                            | 0,5  | 0,06  | 1      |

CIM=Concentração inibitória mínima; FLUCO=fluconazol; ITRA=itraconazol; CETO=cetoconazol; ANFO B=anfotericina B.