

# Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos

Microbiological identification and *in vitro* sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV-positive individuals

Márcia Arias Wingeter<sup>1</sup>, Eliana Guilhermetti<sup>2</sup>, Cristiane Suemi Shinobu<sup>2</sup>, Ione Takaki<sup>2</sup> e Terezinha Inez Estivalet Svidzinski<sup>3</sup>

## RESUMO

A candidíase orofaríngea é a infecção fúngica mais comum entre os pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana e seu tratamento é realizado com antifúngicos tópicos ou sistêmicos, que são indicados empiricamente com base em dados clínicos. O objetivo deste estudo foi determinar a frequência de leveduras em lavados bucais de indivíduos HIV positivos, comparando os resultados entre pacientes com diferentes condições de imunodeficiência e verificar o perfil de susceptibilidade das espécies isoladas frente aos antifúngicos visando avaliar se as opções de tratamento utilizadas na prática clínica atingem a maioria das espécies identificadas. Leveduras foram isoladas em 58% das amostras de lavado bucal coletadas e *Candida albicans* foi a espécie mais (93%) frequente. Resistência ou susceptibilidade dose dependente, frente aos antifúngicos testados foi registrada em aproximadamente 17% das amostras. A importante variabilidade de resposta sugere limitações quanto à eficácia das terapias instituídas empiricamente.

**Palavras-chaves:** Antifúngicos. Candidíase oral. Pacientes HIV positivos. *Candida albicans*.

## ABSTRACT

Oropharyngeal candidiasis is the most common fungal infection among patients infected with the human immunodeficiency virus. It can be treated with either systemic or topical antifungal agents, which are indicated empirically on the basis of clinical data. The objective of this study was to determine the frequency of yeast in mouthwashes from HIV-positive patients, compare the results between patients presenting different states of immunodeficiency, and investigate the susceptibility profile of the species isolated in relation to antifungal agents, with the aim of evaluating whether the treatments used in clinical practice are able to reach the majority of the species identified. Yeasts were isolated from 58% of the mouthwash samples collected. *Candida albicans* was the most (93%) frequent species. Resistance or dose-dependent susceptibility in relation to the antifungal agent tested was registered in approximately 17% of the samples. The significant variability of responses suggests that there are limitations regarding the effectiveness of the empirical therapies instituted.

**Key-words:** Antifungal agents. Oral candidiasis. HIV-positive patients. *Candida albicans*.

Candidíase orofaríngea é a infecção fúngica mais comum entre os pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)<sup>2,6</sup>, muitas vezes é detectada em episódios recorrentes, principalmente quando a contagem de linfócitos CD4 for baixa<sup>3,9</sup>. Com a utilização dos novos anti-retrovirais na terapia HAART (*highly active antiretroviral therapy*) passou a observar-se uma redução na ocorrência de infecções oportunistas, porém para os pacientes de diagnóstico tardio ou aqueles que não respondem adequadamente à terapêutica anti-retroviral, a candidíase orofaríngea ainda é muito frequente<sup>5,8,26</sup>.

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

1. Serviço de Infectologia, Hospital Universitário Regional de Maringá. Maringá, PR. 2. Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. 3. Disciplina de Micologia Médica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

**Endereço para correspondência:** Profa. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski. R. Júlio Favoretto 35, Vila Esperança, 87020-600 Maringá, PR.

Tel: 55 44 3261-4809; Fax: 55 44 3261-4959

e-mail: tiesvidzinski@uem.br

Recebido para publicação em 26/7/2007

Aceito em 26/4/2007

toxicidade hepática e pela contra-indicação em associações com diversos medicamentos, inclusive com anti-retrovirais e o itraconazol, apesar da baixa toxicidade apresenta diversas interações medicamentosas desfavoráveis. A anfotericina B, para uso endovenoso, está estritamente reservada aos casos graves, devido às freqüentes reações adversas<sup>25</sup>. Novas drogas antifúngicas como a caspofungina estão sendo empregadas em protocolos recentes<sup>18</sup>, entretanto ainda não são utilizadas na prática clínica devido ao elevado custo.

O tratamento da candidíase oral em geral é instituído empiricamente, porém é importante lembrar que essa infecção pode apresentar-se com sintomas e aparência macroscópica bastante variáveis<sup>25</sup>. Esse polimorfismo exigiria do clínico a necessidade de adequação da terapêutica, contudo o tratamento medicamentoso utilizado na candidíase orofaríngea, em pacientes infectados pelo HIV, é instituído empiricamente e muitas vezes por tempo prolongado. Este fato contribui para o aparecimento de espécies de leveduras resistentes<sup>19</sup>. Este fato, aliado à pouca disponibilidade de novos produtos desenvolvidos pela indústria farmacêutica tem motivado vários estudos sobre a susceptibilidade *in vitro* dos fungos agentes de infecções humanas, principalmente em imunocomprometidos<sup>120</sup>.

O objetivo deste estudo foi determinar a freqüência de leveduras em lavados bucais de indivíduos HIV positivos, comparando os resultados entre pacientes com diferentes condições de imunodeficiência e verificar o perfil de susceptibilidade das espécies isoladas frente aos antifúngicos, com vistas em avaliar se as opções de tratamento utilizadas na prática clínica atingem a maioria das espécies identificadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

No período de julho a dezembro de 2003, foram coletadas amostras de lavado bucal de pacientes com infecção pelo HIV ou portadores de AIDS, que compareceram ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá para a coleta periódica dos exames para o acompanhamento da doença.

O LEPAC é o laboratório público de referência que atende pelo Sistema Único de Saúde (SUS) onde são realizados os exames para diagnóstico e controle de tratamento da AIDS em Maringá.

Os pacientes incluídos na pesquisa tinham o diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV ou eram doentes de AIDS, conforme os critérios da vigilância epidemiológica de 1998<sup>3</sup>. Todos tinham idade superior a 18 anos e estavam sendo acompanhados no Serviço de Atendimento Especializado para pacientes infectados pelo HIV da 15ª Regional de Saúde do Paraná e do Ambulatório de Infectologia do Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM). Foram excluídos do trabalho os indivíduos em vigência de outras terapias imunossupressoras.

Os pacientes foram esclarecidos e convidados a participar voluntariamente do estudo e assinaram o termo de consentimento aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de

Maringá (COPEP- UEM). Os dados clínicos foram obtidos a partir de consulta médica e revisão do prontuário.

Foi obtida uma amostra biológica de cada paciente através de bochecho, por 30 segundos, com 10ml de solução fisiológica esterilizada. O líquido resultante do bochecho foi recolhido e, após ser centrifugado por 30 segundos a 2.000rpm, foi ressuspenso em 1ml de salina tamponada (PBS pH 7,2), e alíquotas de 10µl foram cultivadas em placas de Petri contendo o meio seletivo diferencial CHROMagar® *Candida* (CHROMagar Company, Paris, França) e incubadas a 25°C por até cinco dias. A seguir as colônias individuais de cada amostra foram identificadas ao nível de gênero e espécie baseado na produção de tubo germinativo, micromorfologia em agar fubá com tween 80, além das provas bioquímicas assimilação e fermentação de carboidratos de acordo com Larone<sup>11</sup>, complementado por Kurtzman & Fel<sup>10</sup>. A presença de *Candida dubliniensis* foi descartada pela incubação em ágar salgado a 45°C.

**Testes de susceptibilidade aos antifúngicos.** Os testes de microdiluição em caldo para determinação do perfil de susceptibilidade das leveduras aos antifúngicos clássicos foram realizados de acordo com a metodologia padronizada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards publicadas no documento M-27A<sup>16</sup>.

Os antifúngicos testados foram fluconazol (Galena Química e Farmacêutica), itraconazol (Janssen Pharmaceutica), cetoconazol (Janssen Pharmaceutica), nistatina (Sigma N 3503, USA) e anfotericina B (Fungizon®, Bristol-Myers Squibb Brasil). Foram utilizadas concentrações variando de 0,125 a 64µg/ml para o fluconazol e nistatina e de 0,03 a 16µg/ml para itraconazol, cetoconazol e anfotericina B.

Ao meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) foi adicionado tampão (MOPS) e glicose e ajustado o pH para 7,0 com ácido clorídrico concentrado P.A. (Merck). Alíquotas de 100µl de dez concentrações de cada antifúngico foram dispensadas seqüencialmente nas colunas numeradas de 1 a 10 de cada placa de microtitulação de 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark).

A concentração do inóculo foi ajustada em 90% de transmitância em 530nm espectrofotômetro (Baush & Lomb) de modo que o volume de 100µl dessa suspensão, adicionado aos antifúngicos já distribuídos na placa, continha entre 0,5 e 2,5 x 10<sup>3</sup> UFC/ml. Na coluna onze, foi distribuído o inóculo aferido sobre 100µl do meio de cultura isento de drogas para proporcionar 100% de crescimento da levedura testada (controle positivo) e na coluna 12 foram dispensados 200µl de meio RPMI-1640 (controle negativo). As placas com as drogas e inóculo foram incubadas, em câmara úmida, a 35°C por 48 horas. A leitura do teste foi feita através de comparação visual, por reflexão em espelho.

A atividade das drogas antifúngicas e a reprodutibilidade dos resultados foram asseguradas pela inclusão do isolado de referência *Candida parapsilosis* ATCC 22019 em todos os ensaios realizados.

O critério de leitura considerou que a concentração inibitória mínima (CIM) seria aquela capaz de inibir 50% do crescimento para os azólicos e 90% para os poliênicos.

Na Tabela 1 é apresentada a interpretação dos valores de CIM considerados para os cinco antifúngicos testados. Para fluconazol, itraconazol e anfotericina B foi considerado o documento NCCLS - M27-A, já para cetoconazol e nistatina utilizou-se critérios estabelecidos pelo laboratório já considerados em estudos anteriores<sup>17</sup>.

**Tabela 1 - Interpretação dos valores de concentração inibitória mínima dos cinco antifúngicos testados.**

Antifúngico	Concentração inibitória mínima (µg/ml) para:		
	sensível	intermediário ou sensibilidade dose-dependente	resistente
Fluconazol	≤ 8,0	16 a 32	≥ 64,0
Itraconazol	≤ 0,125	0,25 a 0,5	≥ 1,0
Cetoconazol	≤ 0,125	0,25 a 0,5	≥ 1,0
Nistatina	≤ 4,0	8 a 32	≥ 64,0
Anfotericina B	< 1,0	-	> 2,0

**Análise estatística.** Foi utilizado o Teste Exato de Fisher como teste de homogeneidade para verificar se existe diferença significativa ao nível de 5% entre a susceptibilidade das leveduras isoladas de pacientes com CD4 abaixo ou acima de 200 cel/mm<sup>3</sup>.

**RESULTADOS**

Dos 100 pacientes infectados pelo HIV, 58 apresentaram culturas positivas para *Candida* spp. Destes, 29 eram homens e 29 mulheres e a idade variou entre 19 e 69 anos, com média de 39 anos. A contagem de linfócitos CD4 variou entre 2 e 1.128 cel/mm<sup>3</sup>, em média de 364 cel/mm<sup>3</sup>, 12 (21%) pacientes tinham CD4 < 200 cel/mm<sup>3</sup>. A carga viral superior a 100.000 cópias/ml, foi verificada em 13 (22%) pacientes. Doze (21%) pacientes apresentaram pelo menos um episódio prévio de candidíase oral e 13 (22%) já haviam utilizado antifúngicos, sendo que cinco deles utilizaram mais de um produto. Os antifúngicos utilizados foram: anfotericina B em 2 pacientes, nistatina em 3, cetoconazol em 4 e fluconazol em 11 pacientes. Cinquenta e um pacientes estavam fazendo uso de terapia anti-retroviral, sendo que 47 (81%) há mais de um ano.

*Candida albicans* foi a espécie isolada na maioria (93%) dos pacientes, somente em quatro (7%) deles foram isoladas outras espécies de leveduras *Candida tropicalis* (2) e *Candida glabrata* (2).

**Tabela 2 - Perfil de susceptibilidade in vitro de isolados de *Candida* sp aos antifúngicos.**

Organismos	Variação da concentração inibitória mínima (µg/ml)				
	anfotericina B	nistatina	cetoconazol	fluconazol	itraconazol
<i>Candida albicans</i>	0,03 - 16	2 - 64	0,03 - 16	0,125 - 64	0,03 - 16
<i>Candida não albicans</i>	0,06 - 0,125	16 - 64	0,125 - 2	2 - 64	4 - 16

A Tabela 2 apresenta a variação das CIM de cada antifúngico testado. O padrão de susceptibilidade, analisando todos os isolados, mostrou amplo espectro de variação frente aos antifúngicos testados e, apesar do pequeno número, as amostras de *Candida não albicans* apresentaram CIM mais elevadas.

Na Tabela 3 é possível observar a distribuição dos isolados conforme a concentração de cada droga. Para a nistatina, 95% dos isolados foram inibidos por até 4µg/ml, enquanto CIM≤8µg/ml de fluconazol foi suficiente para inibir 86% dos isolados.

Durante a realização dos testes, ocorreu a perda de duas amostras, que não apresentaram crescimento, uma para o teste com anfotericina B e outra para o teste com itraconazol, portanto para estes antifúngicos foram consideradas 57 amostras (Tabela 4).

Para o cetoconazol e itraconazol, a variação das CIM foi maior, mesmo assim 72% dos isolados apresentaram CIM<1µg/ml para o cetoconazol, enquanto 77% deles foram susceptíveis ao itraconazol em CIM<1µg/ml. Dois dos 57 isolados testados demonstraram CIM>2 µg/ml para a anfotericina B (Tabelas 3 e 4).

De forma geral, a sensibilidade foi alta, mais de 60% dos isolados foram sensíveis a todos os antifúngicos testados conforme demonstra a Tabela 4, sendo que para o cetoconazol foi observado maior número de isolados resistentes (28%) e de susceptibilidade dose-dependente (5%).

A análise estatística, não mostrou diferença significativa entre os grupos de pacientes com CD4 abaixo ou acima de 200 cel/mm<sup>3</sup>, quando avaliado a susceptibilidade ao cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Para nistatina e anfotericina B, a análise estatística foi desnecessária, visto que os resultados dos dois grupos eram muito semelhantes. Entre os pacientes com CD4 abaixo de 200 cel/mm<sup>3</sup>, todos os isolados foram sensíveis a anfotericina B e nistatina, enquanto que entre os pacientes com CD4 acima de 200 cel/mm<sup>3</sup> a sensibilidade foi 95,2% para a anfotericina B e 96% para a nistatina.

**Tabela 3 - Distribuição dos isolados de *Candida* sp conforme a concentração inibitória mínima de cada um dos cinco antifúngicos analisados.**

	Número de isolados inibidos nas concentrações (µg/ml) de:										CIM	
	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
Nistatina	0	0	0	0	6	49	2	0	0	1	4	4
Fluconazol	1	4	15	16	10	3	1	0	2	6	1	64
	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
Cetoconazol	30	1	8	2	1	3	5	2	5	1	0,03	8
Anfotericina B	9	39	7	0	0	0	0	1	0	1	0,06	0,125
Itraconazol	10	23	8	1	2	3	1	1	2	6	0,06	16

CIM: concentração inibitória mínima

**Tabela 4 - Número e porcentagem de isolados de *Candida sp* considerados sensíveis, susceptibilidade dose-dependente ou intermediários e resistentes.**

	Sensível		Intermediário (SDD)		Resistente	
	n°	%	n°	%	n°	%
Fluconazol (n = 58)	50	86	2	4	6	10
Itraconazol (n = 57)	41	72	3	5	13	23
Cetoconazol (n = 58)	39	67	3	5	16	28
Nistatina (n = 58)	55	95	2	3	1	2
Anfotericina B (n = 57)	55	96	0		2	4

SDD: susceptibilidade dose-dependente ou intermediária

## DISCUSSÃO

No presente estudo, foram coletadas amostras de lavado bucal de 100 pacientes infectados pelo HIV. Destes, 58 apresentaram culturas positivas para *Candida sp*, dos quais 20% apresentavam sintomas ou sinais de candidíase oral. A taxa de colonização por leveduras de 58% destes pacientes HIV positivos foi similar à encontrada em outros estudos<sup>2,13</sup>. Não é considerada elevada para essa população, visto que 60 a 80% desses pacientes desenvolvem uma ou mais infecções fúngicas durante sua doença, sendo a candidíase de orofaringe a mais freqüente<sup>21</sup>. Entre indivíduos normais a taxa média de colonização é de 34,4%<sup>2</sup>.

A média de idade dos pacientes com culturas positivas foi 39 anos, um pouco acima da faixa de 30 a 34 anos que apresenta a maior incidência de AIDS no Brasil<sup>15</sup>. Apesar do número de amostras positivas provenientes de homens e mulheres ser equivalente, a freqüência de diagnósticos para AIDS entre os gêneros, na região avaliada, segue a tendência nacional segundo o Ministério da Saúde<sup>14</sup> (1,5 homens para cada mulher). A maior proporção de mulheres no estudo talvez possa ser justificada pela característica feminina de maior assiduidade na realização dos exames de rotina e dedicação aos assuntos relacionados à saúde bem como na disposição para participar da pesquisa.

CD4 médio de 364 cel/mm<sup>3</sup> e carga viral baixa, na maioria dos pacientes, indicam que nessa população a imunodeficiência estava sob controle, fato possivelmente relacionado com a aderência ao tratamento, pois 51 pacientes estavam em uso da terapia anti-retroviral, sendo que 47 (81%) o utilizavam há mais de 1 ano. Apesar disso, a projeção em relação à população estudo merece atenção: a situação clínica favorável, portanto maior expectativa de vida e a importante freqüência de colonização por *Candida sp*, são duas características particulares que, se tomadas em conjunto, sugerem alta probabilidade de ocorrência de candidíase oral no decorrer do acompanhamento desses pacientes.

A Tabela 2 mostra que há grande variação quanto à capacidade de ação de cada droga antifúngica conforme o microrganismo isolado. Tendo em vista que a escolha da terapêutica é empírica e não é realizado rotineiramente nenhum tipo de teste para verificar a eficácia das drogas a serem utilizadas. Estes resultados sugerem diferentes respostas clínicas às opções de tratamento utilizadas.

A variação no padrão de susceptibilidade dos isolados de *Candida sp* aos antifúngicos é confirmado pela Tabela 3. Enquanto 95% dos isolados apresentaram CIM<sub>≤</sub>4µg/ml à nistatina

mostrando comportamento uniforme, em relação ao fluconazol, embora 86% dos isolados testados apresentaram CIM<sub>≤</sub>8µg/ml, a distribuição das leveduras em relação às diferentes concentrações da droga foi muito mais ampla e variável. Apesar da tendência à susceptibilidade, para estas duas opções terapêuticas mais utilizadas na prática, as variações observadas nas Tabelas 2 e 3 sugerem a possibilidade de falha clínica com o tratamento empírico.

Neste estudo, a CIM<sub>90</sub> das leveduras ao fluconazol foi 64µg/ml (Tabela 3) e 14% das amostras foram resistentes ou S-DD a esse antifúngico (Tabela 4), índice superior ao encontrado por outros autores<sup>4,20,22,23</sup>.

Em recente estudo multicêntrico realizado no Brasil, a freqüência de isolados resistentes e com S-DD aos azólicos foi de 11%, sendo que na maioria destes casos os pacientes apresentavam a contagem de linfócitos CD4 abaixo de 100 cels/mm<sup>3</sup> e tinham história prévia de candidíase de orofaringe com tratamento antifúngico<sup>15</sup>.

Para o cetoconazol e itraconazol, foi observada uma variação maior de susceptibilidade entre as amostras testadas, 72% dos isolados apresentam CIM<1µg/ml para o cetoconazol, enquanto 77% foram susceptíveis ao itraconazol em CIM<1µg/ml (Tabela 3).

O uso de itraconazol profilático em pacientes com AIDS foi associado à redução da susceptibilidade ao fluconazol para espécies isoladas de *Candida albicans* em episódios de candidíase oral recorrente<sup>7</sup>.

Apesar dos mais de 50 anos de uso dos polienos, a resistência a anfotericina B é rara, porém, neste estudo dois dos 57 isolados testados demonstraram CIM>2µg/ml para a anfotericina B, caracterizando resistência.

Neste estudo, não houve diferença estatística, quanto ao perfil de susceptibilidade aos antifúngicos, entre as leveduras isoladas de pacientes com contagens de CD4 superiores ou inferiores a 200 cel/mm<sup>3</sup>, o que está de acordo com outros autores<sup>5,12,13</sup>. Por outro lado a importante variabilidade encontrada entre os isolados sugere maior valorização das características relacionadas ao agente. É possível que em curto período de tempo os protocolos de acompanhamento dos pacientes HIV positivos incluam a confirmação laboratorial da espécie e perfil de susceptibilidade das leveduras isoladas. Uma rotina desse tipo talvez estimulasse a indústria farmacêutica a diversificar o arsenal terapêutico para a candidíase oral e o oferecimento de novas opções de drogas antifúngicas para uso tópico sobre mucosas, tendo em vista a forte ingestão de medicamentos orais por essa população.

## REFERÊNCIAS

- Bachmann SP, Patterson TE, Ribot JLL. *In vitro* activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *Journal Clinical Microbiology* 40:2228-2230, 2002.
- Campisi G, Pizzo G, Milici ME, Mancuso S, Margiotta V. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects. *Oral Medicine* 93 :281-286, 2002.
- Campos J, Del Romero J, Castilha J, Garcia S, Rodriguez C, Bascones A. Oral candidiasis as a clinical marker related to viral load, CD4 lymphocyte count

- and CD4 lymphocyte percentage in HIV-infected patients. *Journal Oral Pathology Medicine* 31:5-10, 2002.
4. Colombo AL, Matta D, Almeida LP, Rosas R. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 6:118-123, 2002.
  5. Eyeson JD, Tenant-Flowers M, Cooper DJ, Johnson NW, Warnakulasuriya KAS. Oral manifestations of an HIV positive cohort in the era of highly active anti-retroviral therapy (HAART) in South London. *Journal Oral Pathology Medicine* 31:169-174, 2002.
  6. Fidel Jr PL. Immunity to *Candida*. *Oral Diseases* 8:69-75, 2002.
  7. Goldman M, Cloud GA, Smedema M, Lemonte A, Connolly P, McKinsey D, Kauffman CA, Moskovitz B, Wheat J and members of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. Does long-term itraconazole prophylaxis result *in vitro* azole resistance in mucosal *Candida albicans* isolates from persons which advanced human immunodeficiency virus infection? *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 44:1585-1587, 2000.
  8. Greenspan D, Gange SJ, Phelan JA, Navazesh M, Alves MEAF, MacPhail LA, Mulligan R, Greenspan JS. Incidence of oral lesions in HIV-1-infected women: Reduction with HAART. *Journal Dental Research* 83:145-150, 2004.
  9. Gupta E, Vajpayee M, Xess I, Seth P. Oral candidiasis in HIV-infected patients and its relation to CD4 + counts: an adjunct clinical marker of HIV disease progression. *Tropical Doctor* 36:127, 2006.
  10. Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeast. A taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, 1998.
  11. Larone DH. *Medically important fungi. A guide to identification*. AMS Press, Washington, 1995.
  12. Melo NR, Taguchi H, Jorge J, Pedro RJ, Almeida OP, Fukushima K, Nishimura K, Miyaji M. Oral *Candida* flora from Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99:425-431, 2004.
  13. Milan EP. Avaliação fenotípica e genotípica de leveduras isoladas da cavidade oral de pacientes com AIDS. Dissertação de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 2001.
  14. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Critérios de definição de casos de AIDS em adultos e crianças. Ministério da Saúde, Brasília, 2003.
  15. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Boletim Epidemiológico AIDS – DST. Janeiro a Junho de 2004 1. Ministério da Saúde, Brasília, 2005.
  16. National Committee for Laboratory Standards NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Standard. NCCLS M27-A. 17:1-29, 1997.
  17. Pádua RAF, Guilhermetti E, Svidzinski TIE. *In vitro* activity of antifungal agents on yeasts isolated from vaginal secretion. *Acta Scientiarum. Health Sciences* 25:51-54, 2003.
  18. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *Journal of Clinical Microbiology* 41:5729-5731, 2003.
  19. Powderly WG, Robinson K, Keath EJ. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: evidence for two patterns of recurrence. *Journal of Infectious Diseases* 168:463-466, 1993.
  20. Rex JH, Rinald MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39:1-8, 1995.
  21. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, Edwards JE. Practice Guidelines for the Treatment of Candidiasis. *Clinical Infectious Diseases* 30:662-678, 2000.
  22. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, Lopez-Ribot JL, Gaitán-Cepeda LA, Quindós G. Point prevalence, microbiology and susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Revista Iberoamericana de Micología* 22:83-92, 2005.
  23. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 39:2378-2386, 1995.
  24. Sant'Ana PL, Milan EP, Martinez R, Telles FQ, Ferreira MS, Alcântara MTC, Carvalho MT, Colombo AL. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97:253-257, 2002.
  25. Schechter M, Rachid M. *Manual de HIV/AIDS*. Revinter, Rio de Janeiro, 2004.
  26. Telles FQ, Silva N, Carvalho MM, Alcântara AP, Matta D, Barberino MG, Bartezak S, Colombo AL. Evaluation of efficacy and safety of itraconazole oral solution for the treatment of oropharyngeal candidiasis in AIDS patients. *The Brazilian Journal of Infectious Disease* 5:60-66, 2002.