

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 08/08/2028.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Yuliana Del Pilar Vega Chacón

Identificação de *Candida* spp. de usuários de próteses removíveis por Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa (qPCR) combinada com a análise das curvas de dissociação

Araraquara
2022



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Yuliana Del Pilar Vega Chacón

Identificação de *Candida* spp. de usuários de próteses removíveis por Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa (qPCR) combinada com a análise das curvas de dissociação

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutora em Odontologia na Área de Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Araraquara
2022

V422i

Vega Chacón, Yuliana Del Pilar

Identificação de Candida spp. de usuários de próteses removíveis por Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa (qPCR) combinada com a análise das curvas de dissociação / Yuliana Del Pilar Vega Chacón. -- Araraquara, 2022

128 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Ewerton Garcia de Oliveira Mima

1. Candidíase. 2. Reação em Cadeia da Polimerase. 3. Estomatite
sob Prótese. 4. DNA. 5. Candida albicans. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Identificação de *Candida* spp. de usuários de próteses removíveis por Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa (qPCR) combinada com a análise das curvas de dissociação

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do título de Doutora em Odontologia

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Paula Aboud Barbugli

3º Examinador: Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa

4º Examinador: Prof^a. Dr^a. Juliana Campos Junqueira

Araraquara, 08 de agosto de 2022

DADOS CURRICULARES

Yuliana Del Pilar Vega Chacón

- NASCIMENTO:** 04/02/1989 – Lima, Peru
- FILIAÇÃO:** Benjamín Vicente Vega Avellaneda
Nidia Fanny Chacón Hinostrosa
- 2007 a 2013:** Curso de Graduação pela Faculdade de Odontologia Universidade Alas Peruanas (Peru)
- 2016 a 2018:** Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
- 2018 a 2022:** Curso de Pós-graduação em Odontologia, Área de concentração em Prótese, nível Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – Unesp.

Dedico este trabalho a **Deus**, e agradeço ele por me dar a força necessária para seguir em frente nos momentos de angústia, por ser meu guia, desde o princípio. Gratidão a Deus pela conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, **Benjamín Vega** e **Nidia Chacón**, meus maiores incentivadores, pela dedicação nos cuidados, e por que sempre acreditarem em mim. É com muito amor que lhes dedico este trabalho.

Ao meu irmão, **Jaime Vega**, por ser um exemplo de respeito, amizade e conduta. Gratidão por ser a pessoa que admiro e amo nesta vida.

A minha cachorra **Saza**, você era minha força, por mais que você tenha partido, sempre lembro daqueles momentos de felicidade. Algum dia nos encontraremos de novo, te amo para sempre.

Aos meus cachorros **Bronco** e **Pelusa** a saudade é grande, gratidão pela felicidade e ternura que sinto só de tê-los por perto, vocês são a definição perfeita de alegria.

AGRADECIMENTOS

Ao Brasil e à Faculdade de Odontologia de Araraquara, por me dar a oportunidade de fazer o mestrado.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, pela sua orientação, paciência, dedicação, profissionalismo e pela motivação. Todo o apoio dedicado a mim foi imprescindível para a conclusão deste trabalho.

À **banca avaliadora**, que participaram ativamente no desenvolvimento desse trabalho de conclusão de curso com suas sugestões e compartilhamento de ideias.

Ao antigo grupo de pesquisa, **Jefferson, Vinicius, Thaís e Amanda**, obrigada por toda a paciência, todos os ensinamentos e disposição em me ajudarem com as pesquisas.

À CAPES: o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

A **Maria Carolina de Albuquerque**, agradeço pela amizade, conquistas, trocas de experiências, esclarecimento de dúvidas e todas as vezes que eu não acreditava que seria possível continuar neste caminho.

A **Leticia Rosa**, aquela amiga que ganhei durante ao longo desses anos de pós graduação, gratidão pelo companheirismo e amizade.

Abraão Bonani, agradeço por todos os momentos de alegria, paciência, parceria e companhia.

A **Prof^a. Dr^a. Marlise Inêz Klein** e **Prof^a. Dr^a. Livia Dovigo Nordi**, pelas sugestões e contribuições feitas que ajudaram a melhorar este trabalho.

Vega Chacón YDP. Identificação de *Candida* spp. de usuários de próteses removíveis por Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa (qPCR) combinada com a análise das curvas de dissociação [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

Atualmente, o diagnóstico da candidíase oral (CO) associada ao uso de próteses dentária é realizado clinicamente, observando-se o grau de inflamação do palato. Os avanços da tecnologia molecular têm permitido realizar a identificação fúngica de maneira mais precisa por reação em cadeia de polimerase (PCR). A PCR combinada com a curva de dissociação têm sido reportadas para identificação fúngica de forma rápida e econômica. Entretanto, a utilização desse método para identificação fúngica em usuários de próteses não é conhecida. O objetivo deste estudo foi validar o método de qPCR com análise da curva de dissociação para a identificação de espécies de *Candida* isoladas de pacientes usuários de próteses. Para isso, foram utilizadas cepas padrão de *C. albicans* (Ca), *C. glabrata* (Cg), *C. tropicalis* (Ct), *C. dubliniensis* (Cd), *C. krusei* (Ck), *C. guilliermondii* (Cgl) e *C. parapsilosis* (Cp) e isolados clínicos de Ca (n = 13), Cg (n = 12) e Ct (n = 10) de pacientes com estomatite protética (EP). As cepas de *Candida* spp. foram cultivadas em CHROMAgar *Candida*, submetidas a extração de DNA e qPCR com análise das curvas de dissociação. Posteriormente, amostras clínicas foram coletadas de pacientes usuários de próteses com e sem EP (n = 20 cada) e submetidas aos mesmos procedimentos. Quando a identificação das amostras das próteses dos pacientes, não foi possível, essas foram cultivadas e submetidas à extração de DNA e qPCR com curva de dissociação. Os resultados foram analisados descritivamente, a concordância entre CHROMAgar *Candida* e qPCR-curva de dissociação foi avaliada pelo índice de kappa de Cohen (k) e os valores de sensibilidade, especificidade, preditivos positivos e negativos foram calculados para o CHROMAgar *Candida*. Entre os resultados, foi realizada a identificação por qPCR-curva de dissociação de 11, 10 e 4 isolados clínicos de Ca, Cg e Ct, verificando-se sensibilidade de 100% para Ca e Ct e especificidade de 100% para Cg. Com relação às amostras dos usuários de próteses, a identificação presuntiva demonstrou que em 35% de cada grupo a espécie isolada foi Ca. A identificação por qPCR-curva de dissociação foi possível em 11 amostras dos usuários de próteses de ambos os grupos (9 Ca e 2 Ct) sem cultivo prévio. Porém, não foi possível identificar as amostras de 5 e 4 pacientes com identificação presuntiva de Ca e Cg, além dos pacientes que apresentaram colonização mista. Com isso, as colônias desses pacientes foram cultivadas e identificadas por qPCR-curva de dissociação, sendo que 22 amostras foram identificadas como Ca, Cg, Ct e Cd. Entretanto, não foi possível identificar 7 amostras (1 uma espécie e 6 espécies mistas). Com isso, a concordância entre os dois métodos substancial (k=0,826), a sensibilidade de identificação por CHROMAgar *Candida* foi de 100% para Ca e a especificidade foi de 97% e 100% para Cg e Ct, respectivamente. Conclui-se que, com a metodologia utilizada, a qPCR-curva de dissociação permitiu a identificação de Ca e Ct de pacientes colonizados com uma espécie de *Candida* sem cultivo prévio, ao passo que, para identificação de Cg, Cd e espécies mistas, este método permitiu a identificação somente após o cultivo.

Palavras chave: Candidíase. Reação em Cadeia da Polimerase. Estomatite sob Prótese. DNA. *Candida albicans*.

Vega Chacón YDP. Identification of *Candida* spp. of removable denture wearers by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) combined with melting curves analysis [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Currently, the diagnosis of oral candidiasis (OC) associated with the use of dental prostheses is performed clinically, observing the degree of inflammation of the palate. Advances in molecular technology have made it possible to perform fungal identification more accurately by polymerase chain reaction (PCR). PCR combined with the melting curve has been reported for fast and cost-effective fungal identification. However, the use of this method for fungal identification in denture wearers is not known. The aim of this study was to validate the qPCR method with analysis of the melting curve for the identification of *Candida* species isolated from patients using dentures. For this, standard strains of *C. albicans* (Ca), *C. glabrata* (Cg), *C. tropicalis* (Ct), *C. dubliniensis* (Cd), *C. krusei* (Ck), *C. guilliermondii* (Cgl) and *C. parapsilosis* (Cp) and clinical isolates of Ca (n = 13), Cg (n = 12) and Ct (n = 10) from patients with denture stomatitis (SD). *Candida* spp. were grown on CHROMAgar *Candida*, subjected to DNA extraction and qPCR with analysis of melting curves. Subsequently, clinical samples were collected from denture wearers with and without SD (n = 20 each) submitted to the same procedures. When the identification of samples from the patients' prostheses was not possible, they were cultured and submitted to DNA extraction and qPCR with a melting curve. The results were descriptively analyzed, the agreement between CHROMAgar *Candida* and qPCR-melting curve was evaluated by the Cohen kappa index (k) and the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were calculated for CHROMAgar *Candida*. Among the results, the identification by qPCR-melting curve of 11, 10 and 4 clinical isolates of Ca, Cg and Ct was performed, verifying a sensitivity of 100% for Ca and Ct and a specificity of 100% for Cg. Regarding samples from denture users, presumptive identification showed that in 35% of each group, the isolated species was Ca. Identification by qPCR-melting curve was possible in 11 samples from denture wearers of both groups (9 Ca and 2 Ct) without previous culture. However, it was not possible to identify samples from 5 and 4 patients with presumptive identification of Ca and Cg, in addition to patients who presented mixed colonization. Thus, the colonies of these patients were cultured and identified by qPCR-melting curve, and 22 samples were identified as Ca, Cg, Ct and Cd. However, it was not possible to identify 7 samples (1 one species and 6 mixed species). Thus, the agreement between the two methods was substantial (k=0.826), the sensitivity of identification by CHROMAgar *Candida* was 100% for Ca and the specificity was 97% and 100% for Cg and Ct, respectively. It is concluded that, with the methodology used, the qPCR-melting curve allowed the identification of Ca and Ct of patients colonized with a *Candida* species without previous culture, whereas, for the identification of Cg, Cd and mixed species, this method allowed identification only after cultivation.

Keywords: Candidiasis. Polymerase Chain Reaction. Stomatitis, Denture. DNA. *Candida albicans*.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Célsius
µL	Microlitro
Ca	<i>Candida albicans</i>
Cg	<i>Candida glabrata</i>
Ct	<i>Candida tropicalis</i>
Ck	<i>Candida krusei</i>
Cp	<i>Candida parapsilosis</i>
Cd	<i>Candida dubliniensis</i>
Cgl	<i>Candida guilliermondii</i>
cm ²	Centímetro quadrado
EP	Estomatite Protética
mM	Milimolar
mg	Miligramas
mL	Mililitros
nm	Nanômetro
Nok-si	Queratinócitos orais espontaneamente imortalizados
u.a.	Unidades arbitrárias
UFC	Unidades Formadora de Colônias
Log	logarítmico
YNB	Yeast Nitrogen Base

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Candidíase Oral (CO)	17
3.2 Estomatite Protética (EP)	18
3.3 Métodos Fenotípicos	21
3.4 Cadeia de Polimerase (PCR)	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Materiais	28
4.1.1 Materiais de Consumo	28
4.1.2 Instrumentos	30
4.1.3 Equipamentos	31
4.2 Métodos	32
4.2.1 qPCR associada a análise da curva de dissociação X Método fenotípico por CHROMagar <i>Candida</i> para identificação de isolados clínicos de <i>Candida</i> spp	32
4.2.1.1 Micro-organismos e condições de cultivo	33
4.2.1.2 Extração de DNA	34
4.2.1.3 Extração do DNA de <i>S. mutans</i> e Queratinócitos	36
4.2.1.4 qPCR e análise das curvas de dissociação	36
4.2.2 qPCR associada a curva de dissociação para identificação de amostras de <i>Candida</i> spp. de usuários de próteses removíveis	37
4.2.2.1 Amostras de pacientes usuários de prótese	37
4.2.2.2 Extração de DNA e qPCR	38
4.3 Análise Estatística	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Curva de Crescimento de <i>Candida</i> spp	40
5.1.1 Cepa padrão de <i>Candida</i> spp	40
5.1.2 Isolados clínicos de <i>Candida</i> spp	43
5.2 Extração de DNA	43
5.2.1 Extração de DNA de isolados clínicos de <i>Candida</i> spp	45
5.3 qPCR-Curvas de Dissociação	49
5.3.1 Curva de dissociação de cepas padrão	49
5.3.2 Curva de dissociação de isolados clínicos	54
5.4 Coleta das Amostras dos Usuários de Próteses	59
5.4.1 Pacientes e fatores predisponentes	59
5.4.2 UFC/mL e identificação presumtiva das amostras dos pacientes	62
5.4.3 Extração de DNA das amostras das próteses (<i>swab</i> e ultrassom) dos pacientes	65
5.4.4 Curva de dissociação das amostras dos pacientes	69
5.4.5 Extração de DNA das colônias isoladas dos pacientes	72
5.4.6 Curva de dissociação das colônias isoladas dos pacientes	74

6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXOS.....	95
APÊNDICES	104

1 INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Candida* spp. são causas comuns de infecções fúngicas e contém mais de 200 espécies¹, dentre as quais existe pelo menos 15 espécies que causam infecções em humanos mas, mais de 95% das infecções invasivas são causadas por 6 patógenos mais comuns: *Candida albicans* (Ca), *Candida glabrata* (Cg), *Candida krusei* agora conhecido como *Pichia kudriavzevii* (Ck), *Candida tropicalis* (Ct), *Candida parapsilosis* (Cp) e *Candida auris*²⁻⁵. Outras espécies foram também já descritas, como *Candida dubliniensis* (Cd) em 1995, a qual foi isolada em casos de candidíase oral (CO) em pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV+) e apresenta elevada similaridade fenotípica com Ca⁶. Mais recentemente, em 2009, *Candida auris* foi descoberta isolada de uma infecção de ouvido de uma paciente no Japão e apresenta resistência intrínseca múltipla aos antifúngicos atuais⁷⁻⁸.

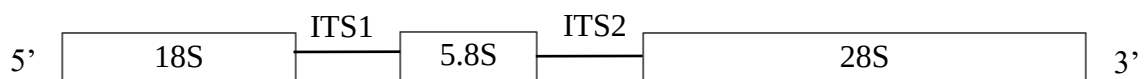
Candida spp. pode estar presentes na microbiota normal, gastrointestinal, cavidade oral e genitourinário de indivíduos saudáveis. No entanto, pode causar infecções oportunistas quando há alterações nas imunidades, diabetes, câncer e fatores externos podem progredir uma infecção. A CO associada ao uso de próteses removíveis, conhecida como estomatite protética (EP, candidíase atrófica crônica), afeta até 75% dos usuários de prótese, com maior prevalência em mulheres⁹⁻¹¹ é na maioria das vezes assintomática e caracterizada por pontos hiperêmicos ou inflamação difusa da mucosa palatina que fica em contato com a prótese removível¹². Ainda hoje, o diagnóstico de EP é realizado clinicamente de acordo com o grau de inflamação do palato com base na classificação de Newton¹².

Candida spp., são micro-organismo responsáveis pelas infecções sistêmica e generalizadas¹³. A fungemia corresponde ao isolamento de fungos na corrente sanguínea, que quando causada por *Candida* spp., é conhecido como candidemia¹⁴. A candidemia é a apresentação clínica mais comum da candidíase invasiva, são a quarta principal causa de infecção nosocomial e a segunda mais comum de infecção da corrente sanguínea com uma alta taxa de mortalidade de 50%⁵. Kayaaslan et al.¹⁵, relataram uma incidência de candidemia em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI) com COVID-19 (2,16, IC 95% 1,77-2,60) em comparação com não COVID-19 (1,06, IC 95% 0,89-0,125), o diagnóstico foi feito com Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2). Embora entre as espécies de *Candida* spp., Ca representava a espécie com maior prevalência de candidemia. Atualmente Ca corresponde apenas metade dos isolados detectados. Além disso, tem sido reportado um incremento das espécies de Cg e Cp, isso pode ser atribuído pelo aumento de resistência aos antifúngicos¹⁶.

Portanto, essas informações enfatizam a importância da detecção e a identificação de forma rápida e econômica das espécies fúngicas em amostras clínicas para o correto diagnóstico de infecções e estabelecimento de um tratamento efetivo. Convencionalmente, a identificação fúngica tem sido realizada por meio de métodos de cultivo, os quais são considerados laboriosos e lentos, pois requerem longo tempo de incubação, além de não serem eficazes para algumas espécies¹⁷. A identificação por cultivo em CHROMAgar *Candida* requer dias de incubação, a identificação é realizada pela cor da colônia. Porém, ela fornece uma identificação apenas presuntiva e não abrange todas as espécies¹⁸. Além disso, esse método apresenta dificuldade para diferenciar espécies emergentes de *Candida*, como *C. auris*¹⁹. Métodos fenotípicos, como os testes bioquímicos de assimilação de carbono e nitrogênio e de fermentação de carboidratos (ID32C, API 20C systems), também não abrangem todas as espécies e são passíveis de erros²⁰. Os métodos antígenos-específicos, apesar de serem considerados superiores aos métodos de cultivos, são muito sensíveis, o que pode acarretar em resultados falso-positivos, além de não serem ainda validados para uso amplo²¹. O método de identificação por hibridização *in situ* fluorescente por ácido nucleico peptídico (PNA-FISH) tem sido utilizado clinicamente para identificação de algumas espécies de *Candida*, como Ca e Cg, porém esse método é restrito somente para algumas espécies e necessita de um cultivo prévio da amostra para aumentar a quantidade fúngica para níveis detectáveis²².

Técnicas moleculares como PCR são utilizadas para diagnosticar e identificar espécies fúngica de maneira mais precisa²³⁻²⁴. Para reduzir a contaminação por DNA ambiental e aumentar a sensibilidade e especificidade do teste, *primers* espécie-específicos são utilizados para amplificar regiões de genes altamente conservadas, como o DNA ribossômico (18S, 5.8S e 28S rDNA, Figura 1)²⁵⁻³¹. Entretanto, como esses *primers* são específicos para espécies únicas, outras espécies fúngicas presentes na amostra não são identificadas, as quais podem ter relevância médica.

Figura 1 - Representação esquemática dos genes (18S, 5.8S e 28S) e dos espaços internos transcritos (ITS: ITS1 e ITS2) do DNA ribossomal eucarioto (rDNA). 5' e 3': direção *forward* (*sense*) da fita molde de DNA



Fonte: Elaboração própria.

Um outro método rápido, confiável e econômico que utiliza *primers* para as regiões dos ITS do rDNA (ITS1 e ITS2, Figura 1) para identificação fúngica é a PCR combinada com a análise em alta resolução das curvas de dissociação ou curva de *melting*³²⁻³⁴. Essa curva apresenta um sinal máximo (“pico”) correspondente à temperatura na qual 50% do produto de PCR está dissociado e a temperatura vai depender principalmente do tamanho do *amplicon* e do conteúdo das bases nitrogenadas guanina e citosina [G e C, respectivamente, as quais apresentam 3 ligações de hidrogênio e, por isso, apresentam uma ligação mais forte do que adenina-timina (A-T)]. A presença de um único sinal máximo permite identificar a especificidade do produto amplificado, a qual também é verificada pela formação de uma única banda no gel de eletroforese. Nesse método, após a PCR quantitativa (qPCR), as espécies fúngicas são identificadas com base na forma das curvas de dissociação, uma vez que os *amplicons* das diferentes espécies apresentam diferentes sequências e podem ser distinguidos com base no seu comportamento de dissociação³²⁻³⁴. Esse método utiliza *pan-fungal primers*, que têm sido empregados para detecção fúngica de cepas padrão e isolados clínicos³²⁻³⁴ e avaliação de microbioma por não serem espécie-específicos (são *primers* específicos para fungos, mas que identificam diferentes gêneros e espécies fúngicas)³⁵. Apesar da análise da curva de dissociação ser um método utilizado para identificação fúngica, alguns autores afirmam que o *pan-fungal-primer* pode se hibridizar em DNA humano na região de ITS1 e, por isso, essa técnica deve ser combinada com outros métodos de detecção²³⁻²⁴. No entanto, um dos estudos que realizaram esse procedimento utilizou DNA de sangue humano e DNA bacteriano como controle e não foi observada amplificação desses DNAs com o *pan-fungal-primer*³⁴.

Entretanto, esses estudos que utilizam a PCR associada à análise da curva de dissociação são direcionados para amostras sistêmicas para aplicação em casos de candidemia^{32-34,36-40}. Assim, apesar de já existirem investigações que demonstrem a identificação das espécies de *Candida* por análise da curva de dissociação (cepas padrão e isolados clínicos), é importante a validação desses métodos para detecção de *Candida* spp. em amostras clínicas de pacientes usuários de próteses dentárias removíveis, o que ainda não é conhecido. Essa validação é fundamental para futuros estudos clínicos de diagnóstico e tratamento de EP ou de outros tipos de CO. Adicionalmente, esses métodos poderão também indicar a prevalência das espécies fúngicas no biofilme da prótese.

7 CONCLUSÕES

- qPCR identificou 11, 10 e 4 isolados clínicos de Ca, Cg e Ct de pacientes com EP, os quais já foram identificados em estudos prévios. Mas, não foi possível a identificação de 2 e 1 isolados clínicos de Cg e Ct, respectivamente;
- qPCR-curva de dissociação permitiu a identificação de amostras de pacientes com identificação presuntiva de Ca e Ct sem cultivo prévio;
- Não foi possível a identificação de amostras das próteses dentárias presuntivas de Cg e espécies mistas de Ca + Cg pelo método da curva de dissociação sem cultivo prévio;
- qPCR combinada com a análise em alta resolução das curvas de dissociação foi um método mais vantajoso em comparação com o CHROMAgar *Candida* em termos de rapidez e sensibilidade para identificar espécies de *Candida* spp., das próteses dos pacientes. Entretanto, seu custo é mais elevado em comparação com o CHROMAgar *Candida*;
- A espécie mais prevalente dentro dos pacientes com ou sem EP foi Ca seguida de Cg e Ct;
- Não foi possível determinar um valor de corte quantitativo de *Candida* spp. baseado no UFC/mL para o diagnóstico de estomatite protética.

REFERÊNCIAS*

1. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36(2): 288-305. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x.
2. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent publichealth problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(1): 133-63.
3. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013; 62(1): 10-24.
4. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2019; 25(7):792-8.
5. McCarty TP, White CM, Pappas PG. Candidemia and invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2021; 35(2): 389-413.
6. Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 253(1): 9-17.
7. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyzes. *Clin Infect Dis.* 2017; 64(2): 134–40.
8. Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. *Candida auris*: a fungus with identity crisis. *Pathog Dis.* 2020; 78(4): 1-8. doi: 10.1093/femspd/ftaa034.
9. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011; 20(4): 251-60.
10. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, et al. The oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural dentition. *PLoS One.* 2015; 10(9): e0137717.
11. Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral Candidiasis: A disease of opportunity. *J Fungi (Basel).* 2020; 6(1):15. doi: 10.3390/jof6010015.
12. Newton A. Denture sore mouth, a possible etiology. *Br Dent J* 1962; 112: 357-360.
13. Ohshima T, Ikawa S, Kitano K, Maeda N. A proposal of remedies for oral diseases caused by *Candida*: A Mini Review. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1522.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

14. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol.* 2011; 49(2): 171-7.
15. Kayaaslan B, Eser F, Kaya Kalem A, Bilgic Z, Asilturk D, Hasanoglu I et al. Characteristics of candidemia in COVID-19 patients; increased incidence, earlier occurrence and higher mortality rates compared to non-COVID-19 patients. *Mycoses.* 2021; 64(9): 1083-91. doi: 10.1111/myc.13332.
16. Bassetti M, Peghin M, Timsit JF. The current treatment landscape: candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 7: ii13-ii22. doi: 10.1093/jac/dkw392.
17. Arendrup MC, Chryssanthou E, Gaustad P, Koskela M, Sandven P, Fernandez V. Diagnostics of fungal infections in the nordic countries: we still need to improve! *Scand J Infect Dis.* 2007; 39(4): 337-43.
18. Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *Br Dent J.* 2017; 223(9): 675-81. doi: 10.1038/sj.bdj.2017.886.
19. Mendonça A, Santos H, Franco-Duarte R, Sampaio P. Fungal infections diagnosis - past, present and future. *Res Microbiol.* 2022; 173(3): 103915. doi: 10.1016/j.resmic.2021.103915.
20. Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis.* 2014; 20(4): 329-44.
21. Wheat LJ. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. *Transpl Infect Dis.* 2006; 8(3): 128–39.
22. Forrest GN, Mankes K, Jabra-Rizk MA, Weekes E, Johnson JK, Lincalis DP, et al. Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization-based identification of *Candida albicans* and its impact on mortality and antifungal therapy costs. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(9): 3381–3.
23. White PL, Perry MD, Barnes RA. An update on the molecular diagnosis of invasive fungal disease. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 296(1): 1-10.
24. Alanio A, Bretagne S. Difficulties with molecular diagnostic tests for mould and yeast infections: where do we stand? *Clin Microbiol Infect.* 2014; 6: 36-41.
25. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(6): 1353-60.
26. Klingspor L, Jalal S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12(8): 745- 53.
27. Löffler J, Hebart H, Sepe S, Schumcher U, Klingebiel T, Einsele H. Detection of PCR- amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system. *Med Mycol.* 1998; 36: 275–9.

28. Widjojoatmodjo MN, Borst A, Schukkink RA, Box AT, Tacken NM, Van Gemen B, et al. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) detection of medically important *Candida* species. *J Microbiol Meth.* 1999; 38:81–90.
29. White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(5): 2181-7.
30. Basková L, Landlinger C, Preuner S, Lion T. The Pan-AC assay: a single-reaction real- time PCR test for quantitative detection of a broad range of *Aspergillus* and *Candida* species. *J Med Microbiol.* 2007; 56(9): 1167-73.
31. McMullan R, Metwally L, Coyle PV, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, et al. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(6): 890-6.
32. Mandviwala T, Shinde R, Kalra A. High-throughput identification and quantification of *Candida* species using high resolution derivative melt analysis of panfungal amplicons. *J Mol Diagn.* 2010; 12(1): 91-101.
33. Alnuaimi AD, Wiesenfeld D, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, Peng B, McCullough MJ. The development and validation of a rapid genetic method for species identification and genotyping of medically important fungal pathogens using high-resolution melting curve analysis. *Mol Oral Microbiol.* 2014; 29(3): 117-30.
34. Zhang J, Hung GC, Nagamine K, Li B, Tsai S, Lo SC. Development of *Candida* specific real-time PCR assays for the detection and identification of eight medically important *Candida* species. *Microbiol Insights.* 2016; 18(9): 21-8.
35. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* 2010; 6(1): e1000713.
36. Trost A, Graf B, Eucker J, Sezer O, Possinger K, Göbel UB, et al. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. *J Microbiol Methods.* 2004; 56(2): 201-11.
37. Barbedo LS, Figueiredo-Carvalho MH, Muniz MdeM, Zancopé-Oliveira RM. The identification and differentiation of the *Candida* parapsilosis complex species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region of the rDNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016; 111(4): 267-70.
38. Jafari Z, Motamedi M, Jalalizand N, Shokoohi GR, Charsizadeh A, Mirhendi H. Comparison of CHROMagar, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, and polymerase chain reaction-fragment size for the identification of *Candida* species. *Curr Med Mycol.* 2017; 3(3): 10-5.
39. Rezazadeh E, Moazeni M, Sabokbar A. Use of cost effective and rapid molecular tools for identification of *Candida* species, opportunistic pathogens. *Curr Med Mycol.* 2016; 2(3): 1-4.

40. Khodadadi H, Karimi L, Jalalizand N, Adin H, Mirhendi H. Utilization of size polymorphism in ITS1 and ITS2 regions for identification of pathogenic yeast species. *J Med Microbiol.* 2017; 66(2): 126-33.
41. Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG, et al. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 111(6): 726-33.
42. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of photodynamic therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(10): E380-8.
43. Hu L, He C, Zhao C, Chen X, Hua H, Yan Z. Characterization of oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases. *Microb Pathog.* 2019;134: 103575
44. Riad A, Gomaa E, Hockova B, Klugar M. Oral candidiasis of COVID-19 patients: case report and review of evidence. *J Cosmet Dermatol.* 2021; 20(6): 1580-4. doi: 10.1111/jocd.14066.
45. McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 25(2): 136-44.
46. Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol* 2000. 2011; 55(1): 250-65.
47. Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence.* 2015; 6(4): 338-46.
48. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis--clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol.* 2011; 37(4): 328-36.
49. Zuza-Alves DL, Silva-Rocha WP, Chaves GM. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1927. doi: 10.3389/fmicb.2017.01927.
50. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002; 78(922): 455-9.
51. Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: red and White manifestations in the oral cavity. *Head Neck Pathol.* 2019; 13(1): 25-32. doi: 10.1007/s12105-019-01004-6.
52. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9(2): 109-18.
53. Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2016; 10: 1161-71. doi: 10.2147/DDDT.S100795.

54. Perić M, Radunović M, Pekmezović M, Marinković J, Živković R, et al. Laboratory-based investigation of denture sonication method in patients with *Candida*-associated denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2019; 28(5): 580-6.
55. Yarborough A, Cooper L, Duqum I, Mendonça G, McGraw K, Stoner L. Evidence regarding the treatment of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2016; 25(4): 288-301. doi: 10.1111/jopr.12454.
56. Gleiznys A, Zdanavičienė E, Žilinskas J. *Candida albicans* importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija*. 2015; 17(2): 54-66.
57. Garbacz K, Kwapisz E, Wierzbowska M. Denture stomatitis associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: a case report. *BMC Oral Health*. 2019; 19(1): 219.
58. Gauch LMR, Pedrosa SS, Silveira-Gomes F, Esteves RA, Marques-da-Silva SH. Isolation of *Candida* spp. from denture-related stomatitis in Pará, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2018; 49(1): 148-51.
59. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(2): 139-43. doi: 10.4317/medoral.16.e139.
60. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(5): 377-83.
61. Altarawneh S, Bencharit S, Mendoza L, Curran A, Barrow D, Barros S, et al. Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of *Candida albicans*, salivary flow, and dry mouth. *J Prosthodont*. 2013; 22(1): 13-22.
62. Taebunpakul P, Jirawechwongsakul P. Palatal inflammation and the presence of *Candida* in denture-wearing patients. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2021; 11(3): 272-80. doi: 10.4103/jispcd.JISPCD_368_20.
63. Campanha NH, Neppelenbroek KH, Spolidorio DM, Spolidorio LC, Pavarina AC. Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis*. 2005; 11(6): 392-8. doi: 10.1111/j.1601-0825.2005.01135.x.
64. Heil EL, Daniels LM, Long DM, Rodino KG, Weber DJ, Miller MB. Impact of a rapid peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization assay on treatment of *Candida* infections. *Am J Health Syst Pharm*. 2012; 69(21): 1910-4. doi: 10.2146/ajhp110604.
65. Eghtedar Nejad E, Ghasemi Nejad Almani P, Mohammadi MA, Salari S. Molecular identification of *Candida* isolates by Real-time PCR-high-resolution melting analysis and investigation of the genetic diversity of *Candida* species. *J Clin Lab Anal*. 2020; 34(10): e23444. doi: 10.1002/jcla.23444.

66. Ye J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden, T.L. Primer-BLAST: A tool to design target specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*. 2012; 12: 134.
67. Cha RS, Thilly WG. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods Appl*. 1993; 3(3): 18-29.
68. Valero C, de la Cruz-Villar L, Zaragoza Ó, Buitrago MJ. New panfungal real-time PCR Assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*. 2016; 54(12): 2910-8. doi: 10.1128/JCM.01580-16.
69. Vahidnia A, Bekers W, Bliedendaal H, Spaargaren J. High throughput multiplex-PCR for direct detection and diagnosis of dermatophyte species, *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* in clinical specimen. *J Microbiol Methods*. 2015; 113: 38-40.
70. Sampath A, Weerasekera M, Gunasekara C, Dilhari A, Bulugahapitiya U, Fernando N. A sensitive and a rapid multiplex polymerase chain reaction for the identification of *Candida* species in concentrated oral rinse specimens in patients with diabetes. *Acta Odontol Scand*. 2017; 75(2): 113-22.
71. Arastehfar A, Fang W, Pan W, Liao W, Yan L, Boekhout T. Identification of nine cryptic species of *Candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis* complexes using one-step multiplex PCR. *BMC Infect Dis*. 2018; 18(1): 480.
72. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74(12): 5463-7.
73. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods*. 2008; 5(1): 16-8.
74. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010; 192(19): 5002-17.
75. Kurkela S, Brown DWG. Molecular diagnostic techniques. *Medicine (Abingdon)*. 2009; 37(10): 535-40. doi: 10.1016/j.mpmed.2009.07.012.
76. Bezdicek M, Lengerova M, Ricna D, Weinbergerova B, Kocmanova I, Volfova P, et al. Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis. *Med Mycol*. 2016; 54(7): 714-24. doi: 10.1093/mmy/myw032.
77. Duyvejonck H, Cools P, Decruyenaere J, Roelens K, Noens L, Vermeulen S, et al. Validation of high resolution melting analysis (HRM) of the amplified ITS2 region for the detection and identification of yeasts from clinical samples: comparison with culture and MALDI-TOF based identification. *PLoS One*. 2015; 10(8): e0132149. doi: 10.1371/journal.pone.0132149.
78. Lau A, Sorrell TC, Chen S, Stanley K, Iredell J, Halliday C. Multiplex tandem PCR: a novel platform for rapid detection and identification of fungal pathogens from blood culture specimens. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(9): 3021-7. doi: 10.1128/JCM.00689-08.

79. Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(12): 3249-54.
80. Hilgert JB, Giordani JM, de Souza RF, Wendland EM, D'Avila OP, Hugo FN. Interventions for the management of denture stomatitis: a systematic review and meta-analysis. *J Am Geriatr Soc.* 2016; 64(12): 2539-45.
81. Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil.* 2007; 34(6): 448-55. doi: 10.1111/j.1365-2842.2007.01709.
82. Hannah VE, O'Donnell L, Robertson D, Ramage G. Denture stomatitis: causes, cures and prevention. *Prim Dent J.* 2017; 6(4): 46-51. doi: 10.1308/205016817822230175.
83. Williams DW, Lewis MA. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis.* 2000; 6(1): 3-11. doi: 10.1111/j.16010825.2000.tb00314.x