



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DA CIÊNCIA DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA E ORTODONTIA

**ESTUDO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida* spp.
ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES PEDIÁTRICOS
EM UTI**

LARISSA SOARES LIMA DA SILVA

Rio de Janeiro, 2020.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DA CIÊNCIA DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA E ORTODONTIA

**ESTUDO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida spp.*
ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES PEDIÁTRICOS
EM UTI**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria).

Orientadoras:

Dra. Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro

Dra. Maristela Barbosa Portela

Rio de Janeiro, 2020.

Ficha catalográfica

Silva, Larissa Soares Lima da.

Estudo dos fatores de virulência de *Cândida* spp. isoladas da cavidade bucal de pacientes pediátricos em UTI. / Larissa Soares Lima da Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Odontologia, 2020.

75 f.: il.; 30 cm.

Orientadoras: Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro; Maristela Barbosa Portela.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Mestrado em Odontologia, 2020.

Referências: f. 57-62.

1. Criança. 2. Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica. 3. Candida. 4. Biofilmes. 5. Fluconazol. 6. Fatores de Virulência. Odontopediatria - Tese. I. Castro, Gloria Fernanda Barbosa de Araujo. II. Portela, Maristela Barbosa. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe do Setor de Referência da Biblioteca Central do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).



FOLHA DE APROVAÇÃO

DA SILVA, LARISSA SOARES LIMA

**“ATRIBUTOS DE VIRULÊNCIA DE CANDIDA SPP. ISOLADAS
DA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES PEDIÁTRICOS EM UTI”**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, com parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Odontopediatria).

Rio de Janeiro, 12 de março de 2020.

Prof. Dra. Andrea Fonseca Gonçalves

DO-Prof. Adjunto do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da FO. UFRJ

Prof. Dra. Dra. Laura Salignac de Souza Guimarães Primo

DO-Prof. Associado do Departamento Departamento de Odontopediatria e Ortodontia
FO. UFRJ

Prof. Dr. Antonio Ferreira Pereira

DO-Prof. Titular do Instituto de Microbiologia da UFRJ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cilaelson e Jacirema,
Que mesmo distantes me apoiam e sonham junto comigo.

À minha irmã, Raíssa
Que me apoia, me dá força e arranca minhas risadas quando eu mais preciso e, talvez, não
saiba o quanto me faz bem.

As minhas avós (*in memoriam*)
Que mesmo longe sempre apoiou, amou e mimou os netos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Jacirema e Cilaelson, porque sem eles nada disso seria possível. Acredito que ver o sonho de um filho se tornar realidade é algo digno de gratidão. Não há nada que eu possa fazer ou dizer vai suprir o amor, o esforço e a saudade. Esse trabalho não seria possível sem vocês. Obrigada por acreditarem no meu potencial e viver tudo isso comigo, mesmo que a distância.

À minha irmã, Raíssa, que apesar da distância, se tornou uma parceira que jamais pude imaginar. Hoje somos parceiras. Eu te amo e sinto muito orgulho da pessoa que você vem se tonado. Obrigada por aguentar minhas poucas reclamações e me fazer rir quando as coisas não estavam caminhando como gostaria.

Às minhas orientadoras, Gloria Castro e Maristela Portela, por me apresentarem uma coisa inédita na minha recente carreira, a microbiologia. Obrigada pelo apoio e muito aprendizado nesses dois anos. Em especial a Glorinha, que com sua leveza e alto astral, tornou essa caminhada mais leve mesmo com tanto trabalho. Como você bem sabe, é adorada pelos seus alunos. Eu pude ver em você além de professora e orientadora, uma amiga e mãe que defende seus alunos e briga quando necessário. Eu sou muito grata por ter você comigo nesses dois anos, obrigada pela autonomia e liberdade nos trabalhos que desenvolvemos e iremos desenvolver. Obrigada! Me desculpe pelos possíveis erros quero que saiba que sempre tentei dar o meu melhor.

À minha banca, Profa. Laura Primo, Andrea Gonçalves, Prof. Antonio Pereira e suplentes Profa. Ivete Pomarico e Prof. Alexandre Curvelo por aceitarem o convite de participar de um momento importante como este. Vocês foram escolhidos por mim com muito carinho.

Aos professores do Departamento de Odontopediatria, Ivete Pomarico, Laura Primo, Aline Neves, Marcelo Costa, Rogério Gleiser, Andrea Gonçalves, Lucianne Cople Maia, Luciana Pomarico, Claudia Tavares, Andrea Quirino, Tomaz Chianca, Andrea Pintor por todo o aprendizado. Vocês não imaginam, nem nós, próprios alunos, a grandeza do que é ter vocês ali no dia a dia.

Aos funcionários Robson, João, Luisa, Rose, Bebel, Kátia, Mere e Dedeia, pela convivência diária. Obrigada por nos deixar fazer aquilo o que sabemos de melhor, a Odontopediatria. Obrigada por serem tão pacientes e parceiros.

Aos alunos de doutorado, mestrado, pós doc e ICs pela convivência. Em especial a Marcela Magno, Luciana Pereira, Fernanda Mafei, Maysa Lannes, Natalia Bedran, Amanda Monteiro, Patrícia Nadelman.

Ao Lucas Jural, pessoa grande, literalmente, de tamanho e de coração. Você foi extensão dessa turma bem doidinha e única. Tens um futuro grandioso pela frente. Obrigada por tanto.

A professora Lucianne Cople Maia que nos inspira todos, TODOS os dias. Obrigada por extrair de nós o nosso melhor mesmo quando achamos que não se pode mais. Obrigada por acreditar na gente, como turma, e mim. Tenho uma admiração sem tamanho por você! E não podes imaginar o quanto. Obrigada por sem que é. Só quem é seu aluno sabe da grandeza desse coração. Obrigada por não largar a minha mão. Obrigada pelas broncas também por que elas fazem parte do processo. Obrigada.

Ao Prof. Antonio Pereira, que permitiu a execução desse trabalho em seu laboratório. Obrigada por abrir as portas. Eu me senti tão acolhida que dizer um até logo será difícil. Ali, eu aprendi que trabalhar no laboratório não é só trabalhar no laboratório, vai muito além disso. Acredito que, mais do lado pessoal do que profissional, cresci, amadureci. Na rotina dupla, apesar de ser aluna da professora Maristela eu me senti um pouco sua também. Obrigada.

Aos amigos e parceiros de laboratório Gabi, Yas, Daniel, Levy e Bryan. Vocês tornaram os meus dias mais leves e felizes, podem acreditar. Esse trabalho tem um muito de vocês. Obrigada por me acolherem, serem tão abertos e cúmplices. Obrigada por me ensinarem o pouco do que eu sei a microbiologia está sendo algo bem inédito na minha vida. Vou levar vocês comigo pra sempre. A Sabrina, Raissa, Athayde e Felipe por serem tão bacanas, dispostos e prestativos. Esse trabalho tem um pouco de vocês também. E eu desejo pra vocês toda a felicidade e sucesso! Porque talento vocês têm de sobra. Muito obrigada por tudo!!!!

Aos meus alunos de graduação, Odontopediatria I e APO, que nesse turbilhão de obrigações e emoções me permitiram ensinar o pouco que sei. Mas não se enganem nós que estamos na função de ensinar, aprendemos muito quando estamos com vocês. Obrigada por serem tão gentis. Se dediquem porque vocês brilham.

A minha IC Flavia Medina, por acreditar em mim nesse processo chamado orientação. Não é uma tarefa fácil mas acredito que nossa parceria deu certo e está rendendo bons frutos. Você tem um futuro brilhante. Obrigada

As minhas amigas, Giselle, Larissa e Yasmin, que entendem a ausência presente. Presentes que ganhei na faculdade e que levei pra vida. Cada uma em um canto desse Brasil, mas sempre juntas torcendo pelo sucesso uma das outras.

Ao meu M2, Kris, Gabs, Amanda, Mari e Fê Canto, por nos acolherem de braços abertos. Fomos um “M” só. Obrigada pelos momentos felizes e tristes, porque eles também fazem parte.

À minha dupla, Fernanda Vieira. Não podia ser outra pessoa. Professora Lucianne caprichou. Obrigada pela amizade, cumplicidade, por fazer tanto por nós. Sem dúvida alguma, és uma pessoa de talento, de alma grande e iluminada. Ligada no 220 (não sei como, principalmente nas manhas de segunda feira - risos). Você foi o meu equilíbrio. Querida e amada não só por mim, mas por todos que a rodeiam. Fefa, eu aprendi tanto como você, mas tanto que só posso agradecer mesmo. A gente se entende só na troca de olhar, cumplicidade que fala né. Sentirei muitas saudades. Pra onde você for tenho certeza de que não passará despercebida. Amo você!

A minha turma, Gabi, Rafa, Camila, Fernanda e Karla, como é difícil e bom falar de vocês. Nada vai explicar a nossa conexão, o nosso jeitinho. Vimos os melhores e piores momentos de cada um, rimos, choramos, curtimos, nos apoiamos... fizemos tudo que temos direito. Soubemos respeitar o momento de cada um, o cada “não”, o “hoje não posso”, “vou para o laboratório” até, ”avisa quando chegar em casa” isso é amor, e quem ama cuida. E nós, cuidamos uns dos outros. Passamos tanto tempo juntos que nos tornamos uma família, já que a nossa mesmo vimos tão pouco. Não podia ser de outro jeito, não podia ser de outra forma. Tinha que ser VOCÊS! Como palavras são sementes, vocês são os melhores e de sucesso! Amo vocês e do fundo do meu coração desejo todo a felicidade, sejam felizes.

EPIGRAFE

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

RESUMO

SILVA, Larissa Soares Lima da Silva. Estudo dos Fatores de Virulência de *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal de pacientes pediátricos em UTI. Rio de Janeiro, 2020. Dissertação de Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

O presente estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, fatores de virulência e susceptibilidade ao fluconazol, associado ou não a Clorexidina, de *Candida* spp. isoladas de diferentes sítios da cavidade bucal de crianças hospitalizadas em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) comparando com isolados de crianças não hospitalizadas. Para isso, foram utilizados isolados de *Candida* spp., previamente identificados e estocados, oriundos de 30 pacientes de UTI (G1) e 30 pacientes saudáveis (G2), com idade entre 01 e 13 anos, pareados por sexo e idade. A coleta dos espécimes clínicos foi realizada através de esfregaço de mucosa (swab) e raspagem de biofilme dental supragengival, e a identificação das espécies de *Candida* se deu por espectrometria de massa (MALDI-TOF). Todos os isolados de *Candida* (n=60, sendo 46 G1 e 14 G2 (*C.albicans* n=15, *C. tropicalis* n=5, *C. guilliermondii* n=32, *C. parapsilosis* n=5, *C. glabrata* n=2, *C. kefyr* n=1) foram então selecionados para a avaliação de fatores de virulência como, formação de biofilme, produção de fosfolipase e protease, susceptibilidade ao fluconazol (FLZ) e clorexidina (CHX); e, verificação de sinergismo, *checkerboard*, entre as duas drogas. Os resultados foram analisados através do SPSS versão 20 e comparados por meio dos testes Qui-quadrado, Fisher e Razão de chance (95% IC), com nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$). Tanto os isolados de G1 (97,8%) quanto os de G2 (100%) produziram biofilme (χ^2 , $p=0,76$). Quanto a produção de fosfolipase, somente 3 (6,5%) isolados do G1 (todos de *C. albicans*) foram produtores, sendo um isolado de mucosa (16,7%) e dois em biofilme (40%); No G2, isso aconteceu de modo similar (1 isolado produtor) (χ^2 , $p=0,66$). Já em relação a produção de protease, 42 isolados (91,3%), dos quais 100% dos isolados de *C. guilliermondii*, seguida de *C. albicans* (81,8%), produziram esta enzima em G1, sendo esta frequência significativamente maior do que a encontrada no G2 com 9 isolados (64,3%) (χ^2 , $p=0,025$). Não houve diferença significativa quando comparamos os fatores de virulência entre os isolados oriundos de diferentes sítios, nos dois grupos. Cinquenta e um (85%) isolados foram resistentes ao FLZ, sendo 38 (82,6%) no G1 e 13 (92,9%) no G2 (χ^2 , $p=0,47$), sendo a frequência de isolados resistentes similar entre os sítios (mucosa x biofilme dental) (χ^2 , $p=0,40$). Foi observado que os poucos isolados resistentes a Clorexidina (n=2; 1 *C. tropicalis* do G1 e 1 *C. albicans* do G2), foram sensíveis a combinação FLZ e CHX, mostrando um sinergismo entre as duas drogas. Conclui-se que os pacientes internados em UTI apresentam maior frequência de isolados de *Candida* spp. produtores de protease e que isolados de biofilme dental são tão virulentos quanto os de mucosa nesses pacientes. Ainda, a combinação de fluconazol e clorexidina foi eficiente no controle do crescimento de *Candida* spp.

Palavras chave: Criança, Unidade de Terapia Intensiva, *Candida*, Biofilme, Fluconazol, Fatores de virulência

ABSTRACT

SILVA, Larissa Soares Lima da Silva. Study of the Virulence Factors of *Candida* spp. isolated from the oral cavity of pediatric patients in the ICU. Rio de Janeiro, 2020. Dissertação de Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

The present study aimed to evaluate, in vitro, virulence and susceptibility factors to fluconazole, associated or not with Chlorhexidine, from *Candida* spp. isolated from different sites in the oral cavity of children hospitalized in an Intensive Care Unit (ICU) compared with isolates from children not hospitalized. For this, *Candida* spp. Isolates, previously identified and stored, were used, coming from 30 ICU patients (G1) and 30 healthy patients (G2), aged between 01 and 13 years, matched by sex and age. The collection of clinical specimens was carried out through mucosa smear (swab) and scraping of supragingival dental biofilm, and *Candida* species were identified by mass spectrometry (MALDI-TOF). All *Candida* isolates (n = 60, 46 G1 and 14 G2 (*C.albicans* n = 15, *C. tropicalis* n = 5, *C. guilliermondii* n = 32, *C. parapsilosis* n = 5, *C. glabrata* n = 2, *C. kefyr* n = 1) were then selected for the evaluation of virulence factors such as biofilm formation, phospholipase and protease production, susceptibility to fluconazole (FLZ) and chlorhexidine (CHX); and, synergism check, checkerboard, between the two drugs. The results were analyzed using SPSS version 20 and compared using the Chi-square, Fisher and odds ratio tests (95% CI), with a 95% significance level ($p \leq 0.05$) Both G1 (97.8%) and G2 isolates (100%) produced biofilm (χ^2 , $p = 0.76$). Regarding the production of phospholipase, only 3 (6.5%) isolates from G1 (all of *C. albicans*) were producers, one isolated from the mucosa (16.7%) and two in biofilm (40%); In G2, this happened in a similar way (1 producer isolate) (χ^2 , $p = 0.66$). Regarding protease production, 42 isolates (91.3%), of which 100% of the isolates of *C. guilliermondii*, followed by *C. albicans* (81.8%), produced this enzyme in G1, this frequency being significantly greater than that found in G2 with 9 isolates (64.3%) (χ^2 , $p = 0.025$). There was no significant difference when comparing the virulence factors between the isolates from different sites, in the two groups. Fifty-one (85%) isolates were resistant to FLZ, 38 (82.6%) in G1 and 13 (92.9%) in G2 (χ^2 , $p = 0.47$), the frequency of resistant isolates being similar between sites (mucosa x dental biofilm) (χ^2 , $p = 0.40$). It was observed that the few isolates resistant to chlorhexidine (n = 2; 1 *C. tropicalis* from G1 and 1 *C. albicans* from G2), were sensitive to the combination of FLZ and CHX, showing a synergism between the two drugs. It is concluded that patients admitted to the ICU have a higher frequency of *Candida* spp. protease producers and that dental biofilm isolates are as virulent as mucosal ones in these patients. Also, the combination of fluconazole and chlorhexidine was effective in controlling the growth of *Candida* spp.

Keywords: Child, Intensive Care Unit, Candida, Biofilm, Fluconazole, Virulence factors

LISTA DE FIGURAS

Graphic 1: Result of sensibility test with chlorhexidine between G1 (n=46) and G2 (14) after 24 h.	53
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição de isolados de *Candida* da cavidade oral de pacientes pediátricos hospitalizados em UTI (G1) (n=46 isolados) e controle (G2)(n=14 isolados)..... 25

ARTIGO

Table 1: Distribution of *Candida* isolates from oral cavity of ICU hospitalized pediatric patients (G1)(46 isolates) and control (G2) (14 isolates) 49

Table 2: Distribution among groups of *Candida* spp in relation to biofilm formation capacity, phospholipase and protease production 50

Table 3: Distribution and characterization of biofilm formation by site (oral mucosa or dental biofilm) and by species of *Candida* spp isolates from children hospitalized in ICU (G1)..... 51

Table 4: Distribution and characterization of production to phospholipase and protease by site (oral mucosa or dental biofilm) and by species of *Candida* spp isolates from children (n=30) hospitalized in ICU (G1) 52

Table 5: Checkerboard assay of *Candida tropicalis* (G1) and *Candida albicans* (G2) with FZL and CHX..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	do inglês <i>ATP-binding-cassette</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	do inglês Brain Heart Infusion
ceo	cariado, extraído e obturado
CPOD	cariado, perdido e obturado
CLSI	do inglês Clinical and Laboratory Standards Institute
CHX	Clorexidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
FLZ	Fluconazol
FO	Faculdade de Odontologia
HM Jesus	Hospital Municipal Jesus
mg	miligrama
ml	mililitro
MDR	do inglês <i>multidrug resistance</i>
MFS	do inglês <i>major facilitator Superfamily</i>
MIC	do inglês <i>minimal inhibitory concentration</i>
MTT	do inglês <i>methyl tetrazolium</i>
PBS	do inglês <i>phosphate buffer saline</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RPMI	do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
spp.	espécies
SPE	Substâncias poliméricas extracelulares
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
YCB	do inglês <i>Yeast Carbon Base</i>
YPD	meio de cultura contendo extrato de levedura, peptona e dextrose (do inglês <i>Yeast Peptone Dextrose</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
=	Igual
®	Marca Registrada
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
°C	Graus Celsius

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
2	PROPOSIÇÃO	21
2.1	Objetivo Geral.....	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	DELINEAMENTO DA PESQUISA	22
3.1	Desenho do estudo	22
3.2	População e amostra do estudo	22
3.2.1	Coletas de espécimes clínicos.....	23
3.3	Análises laboratoriais.....	24
3.3.1	Identificação fúngica	24
3.3.2	Análises dos Fatores de virulência	26
3.4	Análise Estatística.....	29
4	DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	31
4.1	Study of the Virulence Factors of <i>Candida</i> spp. isolated from the oral cavity of pediatric patients in the ICU.	31
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
6	CONCLUSÃO	57
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8	Anexos.....	64
	ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	65

1 INTRODUÇÃO

Pacientes pediátricos internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) estão expostos a um amplo espectro de microrganismos patogênicos e, por isso, apresentam maior risco as infecções hospitalares, quando comparados a adultos. Estas infecções podem ser ocasionadas por bactérias, vírus e fungos e se desenvolvem durante o período de internação do paciente. (AKTAR; TEKIN; GÜNEŞ; ÜLGEN *et al.*, 2016; CORREIA; SIMÃO; LITO; CABEÇADAS *et al.*, 1997)

As infecções hospitalares vêm se tornando ainda mais prevalentes nas unidades de terapia intensiva devido as modificações genéticas e superexpressão de genes que codificam resistência microbiana nos microrganismos nos últimos anos. Concomitante, tem-se as terapias utilizadas e a imunossupressão presente nesses pacientes, e que apesar dos avanços tecnológicos no que diz respeito as intervenções diagnósticas, estas infecções ainda são responsáveis por uma grande taxa de morbidade e mortalidade (EPELBAUM; CHASAN, 2017).

Durante a permanência na UTI, é comum que ocorram alterações bucais relacionadas a doenças sistêmicas ou decorrentes do uso de medicamentos, de equipamentos de respiração artificial e tratamentos quimioterápicos (GUERRA; DO SANTOS, 2018). De acordo com Manual de Odontologia Hospitalar (2012) a higiene bucal deficiente em pacientes internados em UTI propicia o desenvolvimento de um biofilme bucal com microrganismos patogênicos (QUEIROZ; EDUARDO; NAVARRO; EDUARDO *et al.*, 2012).

As infecções bucais oportunistas podem ocorrer com mais frequência em pacientes imunocomprometidos, sendo essas em sua maioria de origem fúngica, podendo ainda se manifestar com padrões não-usuais, serem resistentes aos tratamentos convencionais e causar alta morbidade nos pacientes, devendo-se a demora no diagnóstico e aplicabilidade da terapia adequada. O microrganismo mais comum das infecções fúngicas na mucosa bucal é a *Candida albicans* porém a incidência de infecções por *Candida não-albicans* é cada vez mais frequente nos pacientes com comprometimento imunológico (DE SOUZA PAZ; TEIXEIRA; JACOBI; SANTOS *et al.*, 2019; PANA; ROILIDES; WARRIS; GROLL *et al.*, 2017; QUEIROZ; EDUARDO; NAVARRO; EDUARDO *et al.*, 2012).

Dentre as diversas espécies do gênero *Candida*, existem 6 que se destacam por serem as mais comuns nas infecções fúngicas, e são elas: *Candida albicans*, complexo *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, complexo *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis* e *Candida krusei* (COLOMBO; DE ALMEIDA JÚNIOR; SLAVIN; CHEN *et al.*, 2017; NGUYEN; MATANGKASOMBUT; RITPRAJAK, 2018; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS- FLÖRL, 2015), sendo que *C. albicans* é a espécie mais isolada, representando cerca de 40-60% dos casos (EPELBAUM; CHASAN, 2017). Adicionalmente, descrita pela primeira vez em 2009, *Candida auris* tem recebido uma atenção por ser reportada como o fungo altamente resistente as terapias antifúngicas (WARRIS, 2018).

Atualmente, *C. albicans* é a nível mundial, a causa maioritária de candidemia. Contudo, esta prevalência tem sofrido um decréscimo por conta do aparecimento de candidemias ocasionadas por espécies não-*albicans*, o que vem aumentando progressivamente (CANELA; CARDOSO; VITALI; COELHO *et al.*, 2018; PAPPAS; KAUFFMAN; ANDES; CLANCY *et al.*, 2016).

A patogenicidade de um microrganismo é definida como a capacidade deste causar a doença e se inicia com a exposição e aderência dos microrganismos as células hospedeiras, seguida pela invasão, infecção e a doença (MADIGAN; MARTINKO; BENDER; BUCKLEY *et al.*, 2016). A prevenção ou a ocorrência da infecção irá depender da interação entre o agente causador e o hospedeiro. Enfatiza-se que a virulência não pode ser considerada como algo isolado de um microrganismo, mas sim um processo dinâmico e com frequência de troca envolvendo patógeno, hospedeiro e ambiente (MADIGAN; MARTINKO; BENDER; BUCKLEY *et al.*, 2016; PORTELA, 2006). No entanto, é através dos seus atributos de virulência que microrganismos aprimoram sua a capacidade de invasão promovendo uma infecção. A expressão desses atributos de virulência varia para cada espécie, local de colonização, estágio de desenvolvimento e o tipo de infecção, assim como a resposta do hospedeiro (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014; MADIGAN; MARTINKO; BENDER; BUCKLEY *et al.*, 2016).

Já é sabido que a capacidade de causar doença por espécies de *Candida* é facilitado pela expressão de fatores associados à virulência como a capacidade de formar biofilme e a capacidade de produzir e secretar enzimas hidrolíticas, em particular proteases e fosfolípases (FIGUEIREDO-CARVALHO; RAMOS; BARBEDO; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Biofilme é definido como uma estrutura complexa e dinâmica, composta por microrganismos, como

bactérias e fungos, permeadas por uma matriz extra-celular capaz de proporcionar uma proteção e auto defesa contra os agentes medicamentosos e ao sistema imune do hospedeiro (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; LI; CHEN; KUO; CHEN *et al.*, 2018). A produção e a secreção de enzimas hidrolíticas, como proteases e fosfolipases, por espécies de *Candida* facilitam a sua nutrição, adesão, colonização, invasão no epitélio humano e degradação de proteínas relacionadas ao sistema imunológico (anticorpos, sistema complemento e citocinas), disseminação e resistência aos medicamentos antifúngicos. (FIGUEIREDO-CARVALHO; RAMOS; BARBEDO; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Embora os antifúngicos disponíveis tenham permitido um progresso contra as infecções ocasionadas por fungos, problemas relacionados a toxicidade e resistência aos medicamentos justificam a necessidade de novas abordagens terapêuticas (KULLBERG; ARENDRUP, 2015; VICTORIA CASTELLI; GABRIEL DERITA; NOELI LOPEZ, 2017). A resistência microbiana envolve mecanismos que podem ser de caráter intrínseco, envolvendo questão fenotípica ao qual o microrganismo possui uma resistência inata, sem exposição previa a medicação; e, adquirida quando há exposição a droga, permitindo mutações, seleção e proliferação dessas espécies (VIEIRA; SANTOS, 2017). Já a resistência múltipla a drogas ou MDR (*Multi Drug Resistance*), é ocasionada pelo surgimento de um fenótipo caracterizado pela resistência cruzada entre fármacos que são funcionalmente e estruturalmente distintos, e é um dos maiores responsáveis pelo insucesso de terapias antifúngicas, acarretando no prolongamento da doença e do tempo de internação (BEYER; SPETTEL; ZELLER; LASS- FLÖRL *et al.*, 2019).

Já nos últimos anos, o desenvolvimento de drogas menos tóxicas ao organismo humano possibilitou algumas aplicabilidades em diversas condições, contribuindo para que houvesse a expansão do uso desses medicamentos tanto para profilaxia, como em pacientes com quadro de imunossupressão, quanto para tratamento, de forma empírica ou terapia dirigida, contudo, as abordagens terapêuticas não impossibilitaram a resistência as drogas (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Dentre os antifúngicos disponíveis para o tratamento contra infecções ocasionadas por *Candida* spp., podemos destacar o Fluconazol (FLZ), um composto da família dos Azóis, fungistático, que possui um amplo espectro de atividade, atuando na inibição da enzima fúngica lanosina-14 α -desmetilase responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, codificado pelo gene ERG11, afetando diretamente a fluidez da membrana e nas enzimas

ligadas a ela. Os diferentes mecanismos de resistência aos azóis podem coexistir de forma simultânea elevando os níveis de resistência (BASSETTI; GARNACHO-MONTERO; CALANDRA; KULLBERG *et al.*, 2017; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; VIEIRA; SANTOS, 2017). A utilização generalizada e inadequada do FLZ como agente profilático conduz ao desenvolvimento dos mecanismos de resistência, selecionando espécies resistentes a esse antifúngico (VIEIRA; NASCIMENTO, 2017).

Os antimicrobianos, como a Clorexidina (CHX), nas últimas décadas têm sido utilizados tanto para fins terapêuticos, quanto profilático, como resultado do aumento do uso de antimicrobianos no ambiente hospitalar. Quando utilizados adequadamente, tendem a diminuir a colonização microbiana cutânea ou da mucosa, reduzindo a microbiota transitória e comensal. Seu benefício clínico no controle de infecções está bem estabelecido (SALVATICO; FEUILLOLAY; JABBOUR; GOUHIER-KODAS *et al.*, 2018).

A Clorexidina é um composto aprovado pela *American Dental Association* (ADA), considerado como excelente agente capaz de controlar quimicamente o biofilme dental, por isso indicado para a higiene bucal de pacientes que estão em Unidade de Terapia Invasiva (UTI), e coadjuvante na terapia com medicamentos antifúngicos. Seu uso na assepsia, especificamente na Odontologia é capaz de reduzir de 75% a 99,9% o número de microrganismos e infecções tanto cirúrgicas quanto por quaisquer outros meios de contaminação (DE LIMA RIBAS; DOS SANTOS; BOTELHO, 2020; SCHEIBLER; DA SILVA; LEITE; CAMPOS *et al.*, 2018).

A CHX tem sido usada como terapia coadjuvante, de uso tópico, aos antimicrobianos utilizados nas Unidades de Terapia Intensiva. É eficaz em baixas concentrações e possui alta substantividade, estendendo seu efeito terapêutico na cavidade oral devido à sua capacidade de adsorção, de modo que possa ser retido na mucosa oral por longos períodos (SALIM; MOORE; SILIKAS; SATTERTHWAITTE *et al.*, 2013; SCHEIBLER; DA SILVA; LEITE; CAMPOS *et al.*, 2018).

O tratamento de infecções fúngicas em UTIs deve seguir o princípio fundamental da identificação precoce com aplicação da terapia mais adequada. Contudo, a falta de sintomas específicos e as dúvidas para o melhor fechamento do diagnóstico tornam-se uma das maiores

dificuldades principalmente na população infantil (PANA; KOTZADAMIS; ROILIDES, 2018).

Na literatura ainda pouco se discute sobre uma abordagem terapêutica adequada contra infecções ocasionadas por fungos em crianças hospitalizadas bem como a prevenção destas. Esta ainda depende de estudos baseados em adultos para que se possa prevenir e instituir um tratamento de infecções ocasionadas por *Candida* spp. de forma segura. (ROILIDES; CARLESSE; LEISTER-TEBBE; CONTE *et al.*, 2019). Atualmente, as infecções ocasionadas por fungos têm se tornado uma questão de saúde pública devido ao ônus gerado no que se diz respeito aos custos com tratamento e tempo de internação desses pacientes. Apesar disso, a literatura consultada apresenta poucos relatos (BATISTA; KREBS; RUIZ; AULER *et al.*, 2014; MOHAMMADI; ATA EI, 2016; YANG; TSANG; POW; LAM *et al.*, 2020) de candidemias na população pediátrica originadas da cavidade bucal. Também pouco sabe da interação desses microrganismos com os fármacos utilizados para o tratamento de infecções fúngicas, bem como o comportamento desses isolados de *Candida* na produção e secreção enzimática que comportem de forma vital a saúde desses pacientes, justificando assim a realização deste estudo.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo foi avaliar, *in vitro*, fatores de virulência e susceptibilidade ao fluconazol e a clorexidina, de *Candida* spp. isoladas de diferentes sítios da cavidade bucal de crianças hospitalizadas em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), comparando com isolados de crianças não hospitalizadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Mensurar a formação de biofilme, produção de fosfolipase e protease de isolados de *Candida* spp. isoladas de biofilme dental supra gengival e mucosa bucal de crianças hospitalizadas em UTI, comparando com isolado de crianças não hospitalizadas (Grupo controle).
- Avaliar a susceptibilidade ao fluconazol e a clorexidina de isolados de *Candida* spp. de biofilme dental supra gengival e mucosa bucal de crianças hospitalizadas em UTI, comparando com isolados de crianças não hospitalizadas (Grupo controle).
- Avaliar nos isolados de *Candida* spp. mais resistentes a clorexidina o possível sinergismo com o uso concomitante de fluconazol.
- Relacionar a expressão dos fatores de virulência (formação de biofilme, produção de fosfolipase e protease) e susceptibilidade ao fluconazol e a clorexidina dos isolados de *Candida* spp. do biofilme dental supra gengival e da mucosa bucal de crianças hospitalizadas com tempo de internação.

3 DELINEAMENTO DA PESQUISA

O estudo foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro de acordo com parecer 54723716.2.3001.5279 (Anexo 1). Todas as informações coletadas neste estudo foram estritamente confidenciais. Somente a pesquisadora e as orientadoras tiveram acesso aos dados, não houve risco de quebra de confidencialidade, e nos casos de desistência do participante os dados foram retirados da pesquisa e descartados.

3.1 Desenho do estudo

Este estudo foi do tipo transversal, laboratorial, *in vitro*, cuja análise foi quantitativa.

3.2 População e amostra do estudo

A população da qual foi coletada a amostra desta pesquisa era composta de dois grupos sendo um de crianças hospitalizadas em UTIs de um Hospital Pediátrico de referência no município do Rio de Janeiro, (Hospital Municipal Jesus) (Grupo 1) e o outro um grupo de crianças não hospitalizadas, que comparecerem à procura de atendimento ambulatorial neste mesmo hospital (Grupo controle). Esse hospital foi selecionado por ser um dos maiores hospitais pediátricos no município do Rio de Janeiro, que atendem as diversas especialidades pediátricas e com maior número de leitos em UTIs pediátrica para atendimento hospitalar de crianças. A participação destes pacientes foi voluntária e todos, juntamente com seus responsáveis legais, receberam esclarecimentos necessários para a realização da pesquisa e assinaram previamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice 1).

O grupo de estudo (Grupo 1) foi formado por 30 pacientes. Essa amostra foi censitária e para isso tomou-se por base a taxa de ocupação mensal desses leitos, sendo 100% no Hospital Municipal Jesus. Diante disso, foram examinados todos os pacientes internados por no mínimo 48h em UTIs nesse hospital desde que atendessem aos seguintes critérios de inclusão:

- Idade entre 01 e 13 anos;

- Tempo mínimo de internação de 48 h;
- Presença do responsável legal quando da realização do exame.

Os pacientes que apresentavam situação clínica muito grave/instável de acordo com a equipe médica, ou seja, caracterizados por estarem entubados ou traqueostomizados, impossibilitando a realização do exame clínico, bem como aqueles internados para a realização de cirurgia eletiva não foram incluídos na pesquisa.

Já os pacientes que cederam as amostras clínicas do grupo controle foram pareados por sexo e idade, sendo a mesma quantidade de crianças do grupo de estudo (n=30). Aquelas com histórico de internação nos últimos 3 meses ou em tratamento médico e em uso de medicamentos antimicrobianos não foram incluídas na pesquisa.

A amostra deste estudo consistiu então de todos os isolados de *Candida* spp. oriundos de dois diferentes sítios da cavidade bucal (mucosa bucal e biofilme dental supra gengival) das 60 crianças, sendo 30 internadas em UTI (Grupo 1) e 30 não hospitalizadas (Grupo 2), previamente coletados, identificados e estocados no Laboratório de Bioquímica Microbiana do Instituto de Microbiologia Paulo Góes, Departamento de Microbiologia Geral, UFRJ.

3.2.1 Coletas de espécimes clínicos

A coleta dos espécimes clínicos foi realizada previamente por um único pesquisador, membro da equipe de pesquisa (MIYAHIRA, 2018).

Em resumo, os espécimes clínicos de mucosa (swab de mucosa) foram coletados através de esfregaços realizados na língua, bochechas, palato, assoalho da boca e mucosas jugal, utilizando um único SWAB® estéril (CB Products Ind. e Com. LTDA, Brazil). Estes foram colocados em tubos de plástico de rosca tipo *falcon* contendo 1ml de solução de PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7.2 estéreis que foram identificados com o código e idade da criança. Para coleta do biofilme dental, foram utilizadas curetas dentinárias nº 20 (Duflex®, Nova Era- Juiz de Fora, Brazil) estéreis, sobre a superfície dentária vestibular (região cervical) do dente mais facilmente acessado e com maior quantidade de biofilme, até que a mesma estivesse completamente preenchida (CHARONE; PORTELA; MARTINS; SOARES *et al.*, 2017). Em seguida, esse material coletado foi transferido para microtubos tipo *ependorffs* estéreis, contendo 1 ml de PBS pH 7,2 estéril. Todos os espécimes clínicos coletados foram mantidos sob refrigeração em um isopor com gelo e transportados para o laboratório em um intervalo máximo de 2 h para semeadura e subsequentes análises. As

análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Microbiana do Instituto de Microbiologia Paulo Góes, Departamento de Microbiologia Geral, UFRJ.

3.3 Análises laboratoriais

3.3.1 Identificação fúngica

Os isolados clínicos de *Candida* spp. da presente pesquisa foram previamente identificados e quantificados em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (MIYAHIRA, 2018). Esses isolados identificados de *Candida* spp. vem sendo armazenadas em nitrogênio líquido e fazem parte do acervo do Laboratório de Bioquímica Microbiana do Instituto de Microbiologia Paulo Góes, Departamento de Microbiologia Geral da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Em resumo, os tubos contendo os espécimes clínicos coletados foram levados ao vórtex por 1 minuto a fim de soltar as células aderidas ao swab e solubilização do biofilme, respectivamente. Inicialmente, realizou-se a identificação e quantificação de *Candida* spp. através da semeadura de 100 µl destas suspensões celulares em placas de Petri contendo meio de cultura cromogênico Agar - CHROMagar *Candida*® (CHROMagar Microbiology, Paris, França), seguindo metodologia descrita por Alves *et al.* (2014). Após 72h de incubação em estufa à 37°C, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC), bem como registrado a cor das mesmas, segundo o fabricante. O crescimento foi classificado em leve, moderado e forte de acordo com a escala descrita por Samaranayake *et al.* (SAMARANAYAKE; LAMEY, 1988).

A identificação das espécies de *Candida* foi feita de forma presuntiva através da coloração das colônias reveladas no meio de cultura CHROMagar *Candida*®, de acordo com as instruções do fabricante e as de Odds & Bernaerts *et al.* (1994). As diferentes cores de colônias foram transferidas individualmente para tubos Falcon contendo o meio sólido Brain Heart Infusion (BHI – BD Difco, Maryland, United States of America), permanecendo em estufa a 37° C por 48h. Após esse período os tubos foram armazenados a -20° C para posterior análise.

As espécies de *Candida*, previamente identificadas pelo sistema de cores de acordo com o fabricante, foram colocadas em meio de cultura *Sabouraud* dextrose durante 48 h para crescimento e posterior identificação definitiva utilizando o sistema Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS).

A amostra final dos isolados de *Candida* spp utilizados neste estudo está demonstrado na tabela a seguir.

Tabela 1: Distribuição de isolados de *Candida* da cavidade oral de pacientes pediátricos hospitalizados em UTI (G1) (n=46 isolados) e controle (G2)(n=14 isolados).

	Grupos	Sítio		
		Mucosa oral n=40	Biofilme dental n=20	
<i>Candida</i> spp (n=60)	<i>C. albicans</i>	G1 (n=11)	6 (54,5%)	5 (45,5%)
		G2 (n=4)	2 (50%)	2 (50%)
	<i>C. tropicalis</i>	G1 (n=5)	5 (100%)	–
		G2	–	–
	<i>C. guilliermondii</i>	G1 (n=27)	18 (66,7%)	9 (33,3%)
		G2 (n=5)	3 (60%)	2 (40%)
	<i>C. parapsilosis</i>	G1	–	–
		G2 (n=5)	3 (60%)	2 (40%)
	<i>C. glabrata</i>	G1 (n=2)	2 (100%)	–
		G2	–	–
	<i>C. kefyr</i>	G1 (n=1)	1 (100%)	–
		G2	–	–

Fonte: MIYAHIRA, K. M. **Análise clínica e fúngica da cavidade bucal de pacientes pediátricos hospitalizados em UTI.** Dissertação de mestrado - UFRJ, Faculdade de Odontologia. 2018.

3.3.2 Análises dos Fatores de virulência

3.3.2.1 Formação de Biofilme

A formação de biofilme foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Thein *et al.* (THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007). Após o crescimento dos isolados clínicos de *Candida* spp. em YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%) por 48 h a 37° C sob agitação, foi ajustado uma suspensão celular com 10⁷ células/ml em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 100 µl da suspensão foi adicionado em placa de cultura de célula com 96 poços, que permaneceu por 90 minutos a 37° C em suave agitação (75 rpm). Após este período, o sobrenadante foi removido, e seguido por duas lavagens suaves com PBS pH 7,2 estéril para remoção das células não aderidas. Após a lavagem foram adicionados 100 µl de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e as placas foram incubadas a 37° C por 48 h, sem agitação. Após este período, foi feita a remoção do sobrenadante e duas lavagens suaves com PBS pH 7,2 estéril, sob temperatura ambiente, para retirada das células não aderidas ao biofilme formado. A quantificação do biofilme foi realizada pela adição de 20 µl da solução de MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) acrescida de menadiona. A reação de redução do MTT se deu a 37° C por 3 h na ausência de luz. Após esta incubação, foi adicionado 180 µl DMSO (Dimetilsulfóxido) P.A (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil), sob agitação durante 30 minutos e a leitura das placas realizada em um comprimento de onda de 600 nm.

3.3.2.2 Atividade de Fosfolipase

A metodologia empregada foi descrita por Price *et al.* e Ibrahim *et al.* (IBRAHIM; MIRBOD; FILLER; BANNO *et al.*, 1995; PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982). Para cada 184 ml de água destilada foram acrescentados 13 g de ágar *Sabouraud* dextrose modificado (*Sabouraud* Dextrose Agar, BD Difco™, EUA), 11,7 g de NaCl, 0,111 g de CaCl₂. Gemas de ovos foram centrifugadas a 500 rpm durante 5 minutos em temperatura ambiente e 20 ml do sobrenadante foi adicionado ao meio esterilizado. O meio foi dispensado em placas de *Petri* estéreis descartáveis de 90 mm com um volume aproximado de 20 ml por placa. Os isolados de *Candida* spp. foram previamente crescidos em YPD (extrato de levedura 1 %, peptona 2 % e dextrose 2 %) por 24 h e ajustados para aproximadamente 10⁷ células/ml em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Desta suspensão celular, 10 µl

foram adicionados de forma pontual na superfície da placa. Cada isolado foi inoculado em triplicata. As placas foram incubadas entre 5-7 dias a 37° C em atmosfera úmida. A leitura foi realizada após os dias de incubação. A atividade de fosfolipase foi medida pela relação entre o diâmetro da colônia e a zona de precipitação (P_z). De acordo com este método um valor de $P_z = 1,00$ significa que a cepa é negativa para a produção de fosfolipase, enquanto que um valor de P_z entre 0,99 - 0,90, fraco produtor; P_z entre 0,89 - 0,80, produtor moderado; P_z entre 0,79 - 0,70, produtor relativamente forte; e, P_z menor que 0,69, forte produtor de fosfolipase (DAGDEVIREN; CERIKCIOGLU; KARAVUS, 2005; KANTARCIOĞLU; YÜCEL, 2002; PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982).

3.3.2.3 Atividade de Protease

A metodologia empregada se baseou no método de Ruchel *et al.* (1982) (OLIVEIRA; SILVA; SOARES; ATTUX *et al.*, 1998; RÜCHEL; TEGELER; TROST, 1982), que utiliza o meio de cultura YCB (Yeastcarbon base - BD Difco™, Maryland, Estados Unidos da América), albumina sérica bovina (BSA) fração V (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Este meio foi esterilizado em filtros de Milipore de 0,22 μm e adicionado ágar e água destilada (previamente esterilizados). O meio foi vertido em placas de *Petri* estéreis descartáveis de 90 mm, perfazendo um volume aproximado de 20 ml por placa. O inóculo de cada isolado de *Candida* foi preparado de forma semelhante ao usado para os experimentos de fosfolipase. As placas foram incubadas durante 5-7 dias a 37° C em atmosfera úmida. A atividade proteolítica foi medida pela relação entre o diâmetro da colônia e a zona de hidrólise, de forma semelhante a medição da produção de fosfolipase (D'EÇA JÚNIOR; SILVA; ROSA; MONTEIRO *et al.*, 2011; KANTARCIOĞLU; YÜCEL, 2002).

3.3.2.4 Susceptibilidade ao Fluconazol

Concentração Mínima Inibitória (MIC): A determinação do MIC de Fluconazol seguiu os critérios do CLSI/NCCLS, documento M60 (CLSI, 2017), que descreve um teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica, podendo ser classificadas em sensível, suscetível e resistente ao medicamento testado. O ensaio utilizou o método padrão de microdiluição com diferentes concentrações de fluconazol e inóculo devidamente ajustados em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), em placas estéreis e descartáveis de 96 poços. O meio de cultura utilizado no experimento foi o meio sintético RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) com glutamina e sem

bicarbonato, tamponado a pH 7,2. Os isolados de *Candida* spp. cresceram no meio YPD (extrato de levedura 1 %, peptona 2 % e dextrose 2 %) por 24 h a 37° C sob agitação. Suspensões de 5×10^3 células/ml foram ajustadas no meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Alíquotas de 100 µl da suspensão foram transferidas para cada poço da placa de 96 poços contendo 100 µl de fluconazol em diferentes concentrações. A leitura das placas foi realizada no SpectraMax® i3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA) com comprimento de onda de 600 nm, após 24 h de incubação a 37° C sob agitação. As concentrações de fluconazol testados foram 0,5 – 1,0 – 2,0 – 4,0 – 8,0 – 16,0 – 32,0 – 64,0 – 128,0 – 256,0 µg/ml.

De acordo com CLSI (CLSI, 2017), são considerados resistentes as espécies de *Candida* que cresceram igual e/ou acima de 8 µg/ml exceto *Candida glabrata*, igual e/ou acima de 64 µg/ml.

3.3.2.5 Susceptibilidade a Clorexidina

Concentração Mínima Inibitória (MIC): A determinação do MIC de Clorexidina seguiu os critérios do CLSI/NCCLS, documento M60 (CLSI, 2017), sob modificação, que descreve um teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. O ensaio utilizou o método padrão de microdiluição com diferentes concentrações de Clorexidina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e inóculo devidamente ajustados em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), em placas estéreis e descartáveis de 96 poços. O meio de cultura utilizado no experimento foi o meio sintético RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) com glutamina e sem bicarbonato, tamponado a pH 7,2. Os isolados de *Candida* spp. cresceram no meio YPD (Difco™, Maryland, EUA) por 24 h a 37° C sob agitação. Suspensões de 5×10^3 células/ml foram ajustadas no meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Alíquotas de 100 µl da suspensão foram transferidas para cada poço da placa de 96 poços contendo 100 µl de clorexidina em diferentes concentrações. A leitura das placas foi realizada no SpectraMax® i3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA) com comprimento de onda de 600 nm, após 24 h de incubação a 37° C sob agitação. As concentrações de clorexidina testadas foram 0,005 – 0,011 – 0,023 – 0,046 – 0,093 – 0,18 – 0,37 – 0,75 – 1,5 – 3 µg/ml.

3.3.2.6 *Ensaio de Checkerboard*

Esse ensaio foi realizado conforme descrito por Reis de Sá em 2017 (REIS DE SÁ; TOLEDO; GONÇALVES; SOUSA *et al.*, 2017). O ensaio foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços. Os isolados de *Candida* spp. foram previamente crescidos em YPD (extrato de levedura 1 %, peptona 2 % e dextrose 2 %) por 24 h e ajustados para 5×10^3 células de *Candida* spp. em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) com glutamina e sem bicarbonato, tamponado a pH 7,2. Para a preparação das placas, foi adicionado 100 µl de fluconazol na linha dois a onze e, em seguida, 50 µl de clorexidina foram adicionados à coluna B a G. A linha 2 da coluna B foi o poço sem drogas que serviu como controle de crescimento. A leitura das placas foi realizada no SpectraMax® i3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA) com comprimento de onda de 600 nm, após 24 h de incubação a 37° C sob agitação. O resultado foi obtido através do índice de concentração inibitória fracionada (FICI), calculado da seguinte forma:

$$\text{FICI} = \text{FIC da clorexidina} + \text{FIC do fluconazol}$$

O primeiro FIC é definido como o MIC do fluconazol em combinação com o MIC do fluconazol dividido pela MIC da clorexidina sozinha. O segundo FIC é definido como o MIC clorexidina combinado com o MIC de fluconazol, dividido pelo CIM do fluconazol somente. Os valores calculados pela equação do FICI definem as interações como sinérgica quando os valores obtidos forem menores ou iguais a 0,5; antagônica quando os valores estiverem acima de 4, e sem interação quando os valores se mantiverem entre 0,5 e 4.

3.4 **Análise Estatística**

Os dados obtidos foram tabulados no Excel 2013 e depois inseridos no software estatístico SPSS 21.0 (IBM, Chicago, Il). Após determinação de normalidade da amostra pelo Teste de Shapiro-Wilk, testes paramétricos foram aplicados para verificar as associações entre as variáveis de análises.

A frequência de isolados que expressam os fatores de virulência investigados neste estudo foi comparada entre os grupos (Grupo 1 x Grupo 2) nas diferentes espécies de *Candida*, bem como de acordo com o sítio de coleta (mucosa bucal x biofilme supragengival), através do teste do Qui-quadrado, Teste de Fisher e os Odds Ratios (OR) com seus respectivos

95% de intervalos de confiança (IC) foram estimados. Para comparar os valores médios de produção de fosfolipase e protease foi utilizado Teste T-Student. De modo similar, foram verificadas as relações entre os atributos de virulência dos isolado e dados médicos dentro do Grupo 1. Um nível de significância de 5% foi considerado para as análises realizadas.

4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

4.1 Study of the Virulence Factors of *Candida* spp. isolated from the oral cavity of pediatric patients in the ICU.

Study of the Virulence Factors of *Candida* spp. isolated from the oral cavity of pediatric patients in the ICU.

Larissa Soares-Silva¹, Flávia Medina¹, Karla Miyahira¹, José Alexandre Curvelo², Daniel Clemente de Moraes², Antônio Ferreira-Pereira², Julianne Cuccinielo³, Maristela Portela³, Gloria Fernanda Castro¹

¹Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

²Institute of Microbiology Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

³Department of Clinic and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal Fluminense, Brazil.

ABSTRACT

PORPOSE: The aim of this study was to determine, in vitro, the attributes of virulence and possible resistance to *Candida* spp. isolated from the oral cavity of children admitted to the intensive care unit (ICU).

METHODS: The collection of clinical specimens from 30 ICU pediatric patients (G1) and 30 health children (G2) was carried out through mucosa smear (swab) and scraping of supragingival dental biofilm, and *Candida* species were identified by mass spectrometry (MALDI-TOF). All *Candida* isolates (n=60; 46 G1, 14 G2) were then selected for the evaluation of virulence factors such as biofilm formation, phospholipase and protease production, susceptibility to fluconazole (FLZ) and chlorhexidine (CHX); and, synergism check, checkerboard, between the two drugs.

RESULTS: Both G1 (97.8%) and G2 isolates (100%) produced biofilm (χ^2 , p = 0.76). Regarding the production of phospholipase, only 3 (6.5%) isolates from the G1 (all of them *C. albicans*) were producers, being one isolated from the mucosa (16.7%) and two from biofilm (40%); In G2, this happened in a similar way (1 producer isolate) (χ^2 , p = 0.66). Regarding the production of protease, 42 isolates (91.3%), of which 100% of the isolates of *C. guilliermondii*, followed by *C. albicans* (81.8%), produced this enzyme in G1, this frequency being significantly greater than that found in G2 9 isolates (64.3%) (χ^2 , p = 0.025). In G1, 38 (82.6%) of the isolates showed resistance to FZL comparing to 13 (92.9%) in G2. After the CHX sensitivity test, we observed the growth of the isolates in low concentrations but there

was an inhibition when the concentration exceeded 0.018 mg/ml. In the checkerboard test, synergism between the two drugs was observed (FICI = 0.12).

CONCLUSION: *Candida* spp isolates from the oral cavity of ICU pediatric patients are more virulent with regard to the protease production although isolates from dental biofilm are as virulent as mucosal ones. Also, the combination of fluconazole and chlorhexidine was effective in controlling the growth of *Candida* spp.

INTRODUCTION

Candida spp infections have emerged as an important cause of medical care due to a large number of opportunistic infections diagnosed in hospital settings (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). Invasive candidiasis (IC) or candidemia when affects Pediatric Intensive Care Units (PICU) hospitalized patients is a serious infection and is associated with increased morbidity, mortality and hospital costs of these patients (AKTAR; TEKIN; GÜNEŞ; ÜLGEN *et al.*, 2016; BALDESI; BAILLY; RUCKLY; LEPAPE *et al.*, 2017; PANA; KOTZADAMIS; ROILIDES, 2018), with an estimated 30% to 40% mortality attributed to IC (PAPPAS; KAUFFMAN; ANDES; CLANCY *et al.*, 2015). Within the *Candida* species associated with infections in PICU patients, *Candida albicans* is the most prevalent, accounting for 37% to 55% of diagnosed cases. *Candida parapsilosis* is the second most prevalent species, reaching 20% of reported cases (PANA; KOTZADAMIS; ROILIDES, 2018; TURE; ALP, 2018).

The identification of risk factors that may increase the risk of developing infections caused by these fungi in hospitalized pediatric patients, especially those who are in the ICU, is extremely important to establish prevention protocols. Among the risk factors, the following can be mentioned: patients who received prophylaxis previous to antifungal treatment; presence of central venous catheters (CVC) and/or; endotracheal tubes; prolonged use of broad-spectrum antibiotics; prolonged hospitalization in the ICU; parenteral nutrition and underlying malignancy associated with previous *Candida* colonization in various locations (LI; CHEN; KUO; CHEN *et al.*, 2018; PANA; KOTZADAMIS; ROILIDES, 2018; TURE; ALP, 2018). It is noteworthy that colonization of the oral cavity by *Candida* spp, both in the mucosa and in dental biofilm, in patients with immunosuppression, such as those in the ICU is elevated (PANA; KOTZADAMIS; ROILIDES, 2018). Therefore, it is essential to control these oral yeasts to prevent their systemic carrying and the possible development of morbidities that can prolong the hospital stay or even lead the patient to death.

The virulence factors expressed by *Candida* species to cause infections may vary, depending on the type of infection, the location and stage of the infection and the nature of the host's response (MUSHI; BADER; BII; GROß *et al.*, 2018). The expression of virulence factors such as the formation of germ tubes, adhesins, phenotypic exchange and formation of biofilms, production of hydrolytic enzymes and resistance to antifungals contribute to the pathogenesis of candidiasis (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). Also, the status of the host's immune system, the virulence of the isolate, location and stage of infection can interfere with its pathogenicity (MUSHI; BADER; BII; GROß *et al.*, 2018). To know these virulence factors associated with strains of *Candida* spp. isolated from hospitalized pediatric patients may favor the implementation of more effective methods of controlling these fungi.

Although the risk of pediatric ICU patients developing candidiasis from infection with *Candida* spp isolates from the oral cavity is real (DE SOUZA PAZ; TEIXEIRA; JACOBI; SANTOS *et al.*, 2019; RODRIGUES; GOMES; RODRIGUES, 2020), there are no studies in this literature nature, making it essential for new research to be carried out. We hypothesize that *Candida* spp isolated from oral cavity of PICU hospitalized patients for long periods, receiving various therapies resulting from their reality in the Intensive Care Unit, have an enhanced virulence factors, even when isolated from dental biofilm. Therefore, the objective of this study was to determine, *in vitro*, the virulence factors and possible resistance to *Candida* spp. isolated from the oral cavity (oral mucosa and dental biofilm) of children admitted to the intensive care unit (ICU).

MATERIAL AND METHODS

Ethics aspects

This study was approved by the Clementino Fraga Filho Hospital Ethics Committee, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil (CAAE: 54723716.2.3001.5279) and informed consent was obtained for each child from their legal guardians.

Study design and study population

This research was designed as a transversal, laboratory, *in vitro* type, whose analysis was quantitative. Patient recruitment, clinical examination, isolation and quantification of *Candida* species were performed during a previous study (MIYAHIRA, 2018). Briefly,

clinical specimens were collected from 30 UCI hospitalized patients (Group 1) and 30 healthy children (Control group - Group 2) by a single researcher previously trained. The specimens were collected from oral mucosal by scrubbing on the tongue, cheeks, palate, floor of the mouth and jugal mucosa, using a single SWAB® (CB Products Ind. and Com. LTDA, São Paulo, Brasil) and then was placed in sterilized falcon tubes (Labor Import, São Paulo, Brazil) containing 1 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2. To collect the specimens of supragingival dental biofilm, sterile denture curette # 20 (Duflex®, Nova Era- Juiz de Fora, Brazil) was used on the dental surface from the easiest accessible cervical region according to Charone (2017) (CHARONE; PORTELA; MARTINS; SOARES *et al.*, 2017). The biofilm was then transferred to sterile microtubes containing 1 ml sterile PBS. The *Candida* species were identified by Matrix-Assisted Desorption/ionization System Flight Time Mass Spectrometry (MALDI TOF MS). The isolated have been kept in liquid nitrogen.

To verify virulence factors (susceptibility of antifungal agents, dental biofilm, phospholipase and protease assays) of *Candida* spp, all isolates found in the pediatric patients of both groups were used for this study, being a total of 60 isolates, where 46 (76.6%) were from ICU hospitalized patients group (G1) and 14 (23.3%) from the control group (G2). All isolates are from the oral cavity and are divided into 40 (66.7%) isolates from oral mucosal and 20 (33.3%) from the dental biofilm. The distribution according to group, site and species is in table 1.

Biofilm formation and metabolic assay

The biofilm formation was performed according to the methodology described by Thein *et. al.* (THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007) with some modifications. The biofilm was measured by the cell metabolic assay using the MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) reduction reaction. Briefly, the microorganisms were grown in YPD (Difco™, Maryland, United States of America) (yeast extract 1%, peptone 2% and dextrose 2%) for 48 h at 37°C under agitation and suspensions of each strain were prepared using RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Each strain had 100 µl of cell suspension (10⁷ cell/ml) added to each well in 96 wells plate in triplicate. The system was kept under agitation (75 rpm) at 37°C for 1½ hours. After this time, the supernatant was removed and washed twice with PBS pH 7.2 in order to remove the loosely adherent cells. Then 100 µL of fresh RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) was added to each well and incubated at 37°C for 48h without agitation.

The supernatant was removed and washed once with PBS pH 7.2 in order to remove the loosely adherent cells and replaced with 20 μ l of 0.5mg/ml MTT solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) menadione (1:20 proportion) and incubated for 3h at 37°C. After this, 180 μ l was added DMSO (Dimethylsulfoxide) P.A (Vetec®, Rio de Janeiro, Brazil), stirred for 30 min. The absorbance was then measured using a spectrophotometer at 660 nm.

The values from the MTT reduction technique were categorized into weak when 0.11-0.40, moderate 0.41-0.75 and strong producers >0.75 , according to Sanchez-Vargas et al. (SÁNCHEZ-VARGAS; ESTRADA-BARRAZA; POZOS-GUILLEN; RIVAS-CACERES, 2013).

Phospholipase assay

Phospholipase detection was performed according to the methodology described by Price et al.(PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982) and Ibrahim et al.(IBRAHIM; MIRBOD; FILLER; BANNO *et al.*, 1995)that used an egg yolk agar plate (1 M NaCl, 5 mM CaCl₂ and 8% sterile egg yolk emulsion, pH 7.0).

Candida isolates were previously grown in YPD (yeast extract 1%, peptone 2% and dextrose 2%) for 48h at 37°C under agitation. Ten microliters of standardized suspensions of each strain containing 10⁷ cells/ml were pipetted onto the surface of petri dishes containing the culture media previously described. After the incubation (for 5-7 days at 37°C in a humidified atmosphere), the phospholipase activity was determined by the ratio between the colony diameter and the precipitation zone (Pz). According to this definition, the Pz value of the strains was classified as: Pz = 1.00 means that the strain is negative for phospholipase production, while it is a weak producer when $0.99 \leq Pz \leq 0.90$, mild when $0.89 \leq Pz \leq 0.80$, relatively strong when $0.79 \leq Pz \leq 0.70$ and a very strong producer when $Pz \leq 0.69$.

Protease assay

The method used to detect the protease activity was based on Ruchel et al., 1982 (RÜCHEL; TEGELER; TROST, 1982) who used the albumin agar plate 1.17% yeast carbon base (YCB - BD Difco™, Maryland, USA) medium supplemented with 0.2% BSA (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). The suspension of *Candida* isolates was prepared and inoculated as described in the phospholipase assay. The dishes were incubated for 5-7 days and the clear zone around the colonies (protease activity) was determined by the precipitation zone (Pz) as in the phospholipase activity. The Pz value of the strains was classified as: Pz = 1.00 means

that the strain is negative for phospholipase production, while it is a weak producer when $0.99 \leq Pz \leq 0.90$, mild when $0.89 \leq Pz \leq 0.80$, relatively strong when $0.79 \leq Pz \leq 0.70$ and a very strong producer when $Pz \leq 0.69$.

Susceptibility testing and antifungal agents

The broth microdilution method as described in Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M60 (CLSI, 2017) was used to determine susceptibility. Fluconazole (FLZ) (Farmacopa, Rio de Janeiro, Brazil) and aqueous solution Chlorhexidine 20% (CHX) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Briefly, a dilution series of FLZ (256 – 0.5 mg/ml) and CHX (3 – 0.005 mg/ml) was prepared in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) and sterile water, respectively, and an inoculum of 5×10^3 organisms/ml was used. Following incubation at 37°C during 24h, growth in each well was determined by measuring the optical density at 600nm with a spectrophotometer. For FLZ, the minimum inhibitory concentration (MIC) was the lowest drug concentration that reduced the OD₆₀₀ by 50% at 24h compared with the drug-free control. CLSI standard breakpoints for FLZ were used for susceptibility interpretation. Isolates were designated susceptible, susceptible dose-dependent or resistant based on their MICs and according to CLSI standards.

Checkerboard assays

To evaluate if FZL exhibits synergy or indifference in combination with CHX against *Candida*, checkerboard tests were performed. The individual wells of a 96-well microtiter plate containing RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) with various concentrations of FZL in combination with various concentrations of CHX were inoculated with 5×10^5 cells of *Candida* spp. grown previously in YPD, followed by incubation at 37°C for 24h. The MIC of a compound was defined as the lowest concentration that caused a 50% reduction in cell growth (MIC₅₀). The synergy between FZL and CHX was determined by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI). FICI values of 0.5, 0.5 to 4.0 and 4.0 indicate synergy, indifference or antagonistic interactions for different drug combinations (REIS DE SÁ; TOLEDO; GONÇALVES; SOUSA *et al.*, 2017).

Statistical analysis

The data were analyzed by the statistical program SPSS 21.0 (IBM, Chicago, IL) and after determining the normality of the sample by the Shapiro-Wilk test, parametric tests were applied to verify the associations between the analysis variables.

The frequency of isolates that express the virulence attributes investigated in this study was compared between groups (Group 1 x Control group) in the different *Candida* species, as well as according to the collection site (oral mucosa x dental biofilm) using the Chi-square test, Fisher's test and the crude odds ratios (OR) with their respective 95% confidence intervals (CI) were estimated. T Student test was used to compare means variables as fosfolipase and protease production. The relationships between the virulence attributes of the isolates and medical data in Group 1 were also verified by Chi-square and Fisher. A significance level of 5% was considered for the analyses performed.

RESULTS

The distribution of *Candida* spp. about biofilm formation capacity, phospholipase and protease production according to groups and different species is demonstrated in table 2. Biofilm formation was observed in 45 (97.8%) of G1 isolates and 14 (100%) of G2, with no statistical difference between groups ($p=0.76$). As for the frequency of strains producing phospholipase, we observed few isolates in both groups, with 3 isolates (6.5%) in G1 and 1 (7.1%) in the G2 group ($p=0.66$). Regarding the frequency of protease-producers strains, it was observed that *Candida* spp. isolates from G1 (42, 91.3%) had almost 6 times more chance to be protease producers (OR=5.83; IC 1.30-26.11) than those for G2 (9, 64.3%) ($p=0.025$) being 100% (27) of the *C.guilliermodii* isolates from G1 protease producers, comparing to 40% (2) of this specie form G2 ($p=0.002$). For the others virulence factors, no significant difference were observed considering the different species between groups (Table 2). The mean value of phospholipase (0.72 G1 x 0.47 G2) and protease (0.44 G1 x 0.61) production were similar between groups ($p>0.05$).

Considering only the strains isolated from G1 ($n=46$), the relationship between the site oral mucosa ($n=32$) or dental biofilm ($n=14$) and virulence factors was verified. Regarding the frequency of biofilm-forming strains, this was high among both mucosal isolates ($n=31$, 96.9%) and dental biofilm isolates ($n=14$, 100%) ($p=0.69$). Also, 13 (37.5%) isolates from the

oral mucosa had a formation considered strong, followed by 19 (47.5%) with moderate formation, according Sanchez (2013). Within the isolates from dental biofilm, only 3 (20%) had a strong formation (Table 3). As for the production of phospholipase, only 1 (3.1%) isolate was from the oral mucosa showed a very strong production while 2 (14.3%) were from dental biofilm ($p=0.21$), being 1 with relatively strong production and 1 with very strong production. In the protease activity, we observed that in mucosa, 30 isolates (93.8%) were protease producers comparing to 12 (85.7%) from dental biofilm ($p=0.57$). Almost all of the isolates had very strong activity in both from oral mucosa (80%) and dental biofilm (70%). The distribution and characterization, according to species and different sites, in relation to virulence attributes can be seen in table 4.

When the resistance of the isolates to fluconazole was verified, it was observed, comparing the two groups that 38 (82.6%) isolates from hospitalized patients (G1) and 13 (92.9%) from the control (G2) ($p=0.32$) are resistant to fluconazole (FLZ), according to what is determined by CLSI (2017), being 8 $\mu\text{g/ml}$ for *Candida* spp. except *Candida glabrata* (64 $\mu\text{g/ml}$). Considering different species in G1, 10 isolates (90.9%) of *C. albicans*, 5 (100%) of *C. tropicalis*, 22 (81.5%) of *C. guilliermondii* and 1 (50%) of *C. glabrata* were resistant. In G2, 3 (75%) isolates of *C. albicans*, 5 (100%) of *C. guilliermondii* and 5 (100%) of *C. parapsilosis* were resistant. No significant differences were observed between groups in the different species (Table 5).

About chlorhexidine susceptibility, we observed there was no *Candida* spp. growth in highest concentrations tested (0.37 mg/ml to 3 mg/ml). The profile of survival at lowest concentrations (0.005 mg/ml to 0.18 mg/ml) was present in G1 and G2 (Graphic 6). No significant difference was observed between groups showing that *Candida* species of both groups, G1 and G2, maintained the same pattern of susceptibility to chlorhexidine.

After performing CHX susceptibility, at the concentration 0.18 mg/ml, we found two resistant isolates (1 isolate of *C. tropicalis* from G1 and 1 isolate *C. albicans* from G2). Then, we decided to use the two strains for the next experiment. The quantitative checkerboard assays indicated that CHX and FLZ combination could sensitize these *Candida* species. The FICI calculation of the interaction between the two drugs revealed a synergism (FICI = 0.12) (Table 6).

Relations between virulence attributes (biofilm formation, phospholipase and protease production) and resistance FLZ and hospitalization time were not observed. However, the isolates that present resistance to CHX at concentrations 0.18 to 0.046 mg/ml, were from patients with a higher time of hospitalization (ranging from 105.67 to 267.0 days) than those susceptible isolates (31.39 – 31.69 days) ($p < 0.01$).

DISCUSSION

Infections caused by fungi in hospitalized patients have become a public health issue due to the increase in hospital costs due to long-term hospitalizations as well as the use of medications and high associated mortality rate (VIEIRA; SANTOS, 2017). In the pediatric population in the ICUs, there was a significant increase in the risk of fungal infections due to immunosuppressive medications in several medical specialties. In order to combat these infections new diagnostic tests and proven use of fungal agents for prophylactic and treatment purposes are used. These factors, taken together, have changed the epidemiology of infections caused by fungi in recent years (PANA; ROILIDES; WARRIS; GROLL *et al.*, 2017; PAPPAS; KAUFFMAN; ANDES; CLANCY *et al.*, 2016).

Candida spp. remains the leading cause of fungal infections in childhood patients (PANA; ROILIDES; WARRIS; GROLL *et al.*, 2017). According to the latest Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis held in 2016, it was observed that among the most prevalent species that cause more invasive diseases, more than 90% in humans are *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei* (PAPPAS; KAUFFMAN; ANDES; CLANCY *et al.*, 2016). According to Pana in 2018, in his study carried out in children's intensive care units, the most prevalent species are *C. albicans* and *C. parapsilosis* (37% to 55%), followed by *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. lusitaniae* (10% to 15%) (PANA; KOTZADAMIS; ROILIDES, 2018). In a study by Batista in 2014 (BATISTA; KREBS; RUIZ; AULER *et al.*, 2014), the most prevalent oral mucosa isolates were *C. albicans* 68.4%, followed by *C. krusei* 10.5%. Mohammadi in 2016 (MOHAMMADI; ATA EI, 2016), on the other hand, finds into oral cavity species of *C. albicans*, *C. krusei* and *C. kefyr*. In our study, we observed that the most frequent species are *C. guilliermondii* (53.3%) followed by *C. albicans* (25%), *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* (8.3%), thus showing the tendency of non-*albicans* species to the installation of fungal infections and these species have proved increasingly isolated from the oral cavity.

The formation of biofilm by *Candida* species, considering a mainly virulence factor, can lead to antifungal resistance because they are well adapted to the colonization of tissues and internal devices such as vascular, urinary and respiratory catheters, and the protection of the cells themselves against the host's immune responses (LI; CHEN; KUO; CHEN *et al.*, 2018). Biofilms formed by fungi play an important role in the development of human diseases that culminate in high mortality rates and their presence makes clinical treatment difficult due to late diagnosis (BARBOSA; DAMASCENO; CASEMIRO; MARTINS *et al.*, 2019).

Biofilm formed by the species of *Candida* has a variety about its architecture. And, in addition to the internal factors of the patient, external factors such as intraoral medical devices influence the type of biofilm produced (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; RODRIGUES; GOMES; RODRIGUES, 2020). No difference was observed in our study in the biofilm formation ability. Fifty nine isolates of *Candida* spp.. (n = 60) were able to produce biofilm measurement by MTT metabolic assay. Forty five isolates in G1, mostly non-albicans, had viable cells in both sites of origin, mucosa and dental biofilm, with no significant difference between groups. Sriphannam in 2019, the isolates of 4 *C. albicans* 4 (10.8%), 14 *C. tropicalis* 14 (46.7%), 4 *C. parapsilosis* 4 (50.0%), 2 *C. glabrata* 2 (33.3%) and 1 *C. guilliermondii* 1 (33.3%) had a high biofilm formation (SRIPHANNAM; NUANMUANG; SAENGSAWANG; AMORNTHIPAYAWONG *et al.*, 2019). Also in 2019, another study revealed that non-albicans isolates had high biofilm production *C. tropicalis* 7 (46.6%), *C. parapsilosis* 6 (40%), *Candida krusei* 1 (6.7%), and *C. fabianii* 1 (6.7 %) (RODRIGUES; MOTTA; PICHARSKI; VASCONCELOS *et al.*, 2019) corroborating our study.

In *Candida* spp., the secretion of hydrolytic enzymes can regulate resistance to antifungal drugs as well as in the pathogenesis of candidiasis. These control the evasion of the immune system and degrade proteins related to immune defense, such as antibodies and the complement system, allowing the fungus to escape the host's first line of defense (FIGUEIREDO-CARVALHO; RAMOS; BARBEDO; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Among hydrolytic enzymes, phospholipases and proteinases, they play a role in the invasion of host tissue, colonization and progression of infection (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014).

Phospholipases attack phospholipids playing an active role in invading host tissue by disrupting epithelial cell membranes and allowing the tip of the hypha to enter the cytoplasm, leading to cell lysis and tissue damage (SRIPHANNAM; NUANMUANG;

SAENGSAWANG; AMORNTHIPAYAWONG *et al.*, 2019). In a study conducted in 2018, only *C. albicans* isolates produced phospholipase (CANELA; CARDOSO; VITALI; COELHO *et al.*, 2018). Our study revealed that three isolates, all isolates in G1, 3 *C. albicans* produced the phospholipase enzyme relatively strong and strong. In 2012 (DE LUCA; GUGLIELMINETTI; FERRARIO; CALABR *et al.*, 2012), all *C. albicans* isolates from patients in ICU were able to produce phospholipase, and isolates of *C. glabrata* and *C. parapsilosis* were not detected. In a study conducted in 2016 (ANDREOLA; DEMATHÉ; GALAFASSI; ELSEMANN *et al.*, 2016), it showed a phospholipase activity for the genus *Candida*, isolated from active infections of the oral cavity, with a 29% positivity among the strains tested. The difference with our findings may be due to the intrinsic characteristics of the isolates or the methodology used. It was expected that the isolates, mainly from the oral mucosa, would produce the enzyme, facilitating the degradation of the membrane, thus increasing the risk of infection.

Proteinases help improve the ability of the microorganism to colonize and penetrate host tissues, including the degradation of host defense proteins, such as immunoglobulins, complement and cytokines (SRIPHANNAM; NUANMUANG; SAENGSAWANG; AMORNTHIPAYAWONG *et al.*, 2019). Canela in 2018 (CANELA; CARDOSO; VITALI; COELHO *et al.*, 2018), showed that the isolates 70% of *C. albicans*, 25% of *C. parapsilosis* and 80% of *C. tropicalis* produced proteinase. In our study, we observed that isolates of *C. albicans*, *C. guilliermondii* and *C. tropicalis* had the highest production of the enzyme characterized as relatively strong and strong. In the study by Andreola (ANDREOLA; DEMATHÉ; GALAFASSI; ELSEMANN *et al.*, 2016), it was observed that 97% of *Candida albicans* isolates could produce protease. Our study revealed that 91.3% of those isolated from patients in ICU were able to produce the enzyme, the majority of which were oral mucosa. We also observed that among *Candida* species, *C. guilliermondii* was highly productive of this, leading to the conclusion of a tendency to be a virulent species for this population.

This difference found between the production of phospholipase and protease is because the isolates are clinical strains from the pre-infection of the oral cavity and immunosuppression, which presented themselves as highly proteinase producers. (ANDREOLA; DEMATHÉ; GALAFASSI; ELSEMANN *et al.*, 2016).

The resistance of a drug can be characterized by another type of mechanism of action that can be activated simultaneously, such as DNA repair and induction of drug-resistant

phenotypes, the emergence of emerging species that are already intrinsically sensitive to all antifungal classes (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

The treatment of infections caused by fungi is a great challenge for clinical practice. Due to the inappropriate use of antifungal drugs in the treatment, due to the late diagnosis, and increasing resistance to them, they led to the need to perform susceptibility tests to essential antifungals for the application of non-effective therapy (VIEIRA; NASCIMENTO, 2017). In fungi, the drugs resistance could be related to the decrease in drug capitation, target and the increase in drug efflux made by proteins located in the cell membrane that become overexpressed as the ERG11 gene, mutation of the ERG11 gene (GHANNOUM, 2016; PAPPAS; KAUFFMAN; ANDES; CLANCY *et al.*, 2016; RODRIGUES; MOTTA; PICHARSKI; VASCONCELOS *et al.*, 2019; VIEIRA; SANTOS, 2017).

In the present study, 51 (85%) isolates of *Candida* spp., 38 (82.6%) in G1 and 13 (92.9%) in G2, were resistant to FLZ according to the assay determined by CLSI (CLSI 2017). According to Ying, FLZ has a satisfactory therapeutic activity in *Candia albicans* and in recent years it has been used to prevent systemic fungal infections (BADIEE; CHOOPANIZADEH; MOGHADAM; NASAB *et al.*, 2017; YING; ZHAO; HU; CAI *et al.*, 2013). However, prolonged and repeated use favored the emergence of resistant isolates (HERKERT; GOMES; MURO; PINHEIRO *et al.*, 2015). In a 2019 study by Sriphannam, it showed that its isolates of *C. albicans* (100%), *C. tropicalis* (94%), *C. parapsilosis* (50%) were resistant to fluconazole (SRIPHANNAM; NUANMUANG; SAENGSAWANG; AMORNTHIPAYAWONG *et al.*, 2019). In another study conducted in 2017, it showed that the majority of isolates were *C. albicans* (n = 178) and of which 95.4% were resistant to FLZ (BADIEE; CHOOPANIZADEH; MOGHADAM; NASAB *et al.*, 2017). In 2018, a study by Silva revealed the frequency of resistance to FZL, 3.3% for *C. albicans* isolates, 8.3% for *C. krusei*, 5.3% for *C. tropicalis* (DA SILVA; DA SILVA; DE ALMEIDA; NETTO *et al.*, 2018). Considering that patients with compromised immune systems are more susceptible to therapeutic failures due to their suboptimal condition, the use of various drugs and antimicrobials are factors that can contribute to the occurrence of resistance against antifungals as well as their preventive use. (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

In the oral cavity, the topical use of antifungal agents tends to be reduced due to the dilutive process of saliva and the action of the oral musculature. Thus, microorganisms are subjected to suboptimal conditions varying the concentration according to the niche (MIMA; PAVARINA; DA SILVEIRA VARGAS; GIAMPAOLO *et al.*, 2011). However, CHX, commonly used in dentistry, is attached to the formed biofilm and can act for 12 h (DE SOUZA PAZ; TEIXEIRA; JACOBI; SANTOS *et al.*, 2019). In our study, we observed that at low concentrations, after microdilution of the 0.12% solution (12 µg / µl), the isolates could grow with total inhibition at a concentration of 0.37 µg / µl after 24 h. *Candida albicans* and *C. tropicalis*, were the two isolates that could grow at a concentration of 0.18 mg/ml. In the study by Salim, it demonstrated that CHX has an excellent action against the formation of biofilm and has activity superior to FZL for a prolonged period (SALIM; SILIKAS; SATTERTHWAITTE; MOORE *et al.*, 2013).

To decrease the growth of *Candida* spp.. the checkerboard test was carried out to assess whether there is a synergism between FZL and CHX. CHX, is an antiseptic compound that can be used as an adjunct to specific antifungal agents. The CHX solution has a bactericidal action acting on the dissociation in the plasma membrane, causing cell lysis (DE LIMA RIBAS; DOS SANTOS; BOTELHO, 2020). However, according to the literature consulted, there is little current evidence of trials with antifungal drugs with antiseptics to assess the association between them. In a state carried out in 2011, it used several concentrations of CHX in 3 FZL-resistant isolates, *C.albicans*, and demonstrated that after 7 days the samples that were subjected to a concentration of 2% had a decrease in *Candida* species when compared to the concentration at 0.2%. However, an isolate was able to grow regardless of the concentration used (MIMA; PAVARINA; DA SILVEIRA VARGAS; GIAMPAOLO *et al.*, 2011). In a study conducted in 2013 by Salim (SALIM; MOORE; SILIKAS; SATTERTHWAITTE *et al.*, 2013), among the candida isolates, resistant to FZL, none were resistant to CHX. Which corroborates with our findings. This can demonstrate that, *in vivo*, there is a possibility of reducing these microorganisms based on the substantivity of CHX in the oral cavity concomitant with the systemic use of FZL. A single solution with the two drugs is not possible due to the difference in presentation, which makes the systemic use of both impossible and perhaps more beneficial to the sick individual.

In our study, isolates from dental biofilm (n=14) demonstrate a tendency to be more pathogenic than those located in the mucosa (n=32) according to the results presented, in G1.

I believe that despite being present in mixed biofilm, it is not common for *candida* species located in dental biofilm to be so virulent, as in the findings of this study. In hospital environments, mechanical cleaning is not always possible due to the difficulty due to the presence of internal devices inside the oral cavity. Therefore, the use of CHX in these environments could be indispensable as an adjunct to therapies performed to decrease the local microbiota as well as the risk of installing infections of fungal origin from the formation of biofilm.

In the present study, we observed diversity of species from both oral mucosa and dental biofilm, as well as their potentiated virulence attributes, such as biofilm formation, phospholipase and protease production, as was initially assumed. The limitation of this study was the fact that it was *in vitro*, as it does not simulate local conditions such as the oral cavity and the host response. Most studies are performed in adults and adapted to children and there is a low rate of research directed at the pediatric population. Thus, there is a need for research for these patients to elucidate the reality and behavior of *Candida* species of oral cavity in the hospitalized child population.

Because of what was demonstrated in our study, we can conclude that ICU isolates were more virulent about protease production and that both dental biofilm and oral mucosa isolates are virulent, also increasing the risk of these patients facing infections caused by fungi of oral origin. Therefore, it is necessary to have a policy where we can preventively disorganize the dental biofilm, be it mechanically or chemically, to reduce the colonization of these microorganisms in oral cavity, aiming not only to reduce the hospital burden but also to improve the condition of these patients.

REFERENCES

AKTAR, F.; TEKIN, R.; GÜNEŞ, A.; ÜLGEN, C. *et al.* Determining the independent risk factors and mortality rate of nosocomial infections in pediatric patients. *BioMed research international*, 2016, 2016.

ANDREOLA, P.; DEMATHÉ, A.; GALAFASSI, D.; ELSEMANN, E. B. *et al.* Comparative study between extracellular phospholipase and proteinase production in clinically important of the genus *Candida* isolated in oral candidiasis patients. *Revista de Odontologia da UNESP*, 45, n. 4, p. 219-226, 2016.

BADIEE, P.; CHOOPANIZADEH, M.; MOGHADAM, A. G.; NASAB, A. H. *et al.* Antifungal susceptibility patterns of colonized *Candida* species isolates from immunocompromised pediatric patients in five university hospitals. *Iranian journal of microbiology*, 9, n. 6, p. 363, 2017.

BALDESI, O.; BAILLY, S.; RUCKLY, S.; LEPAPE, A. *et al.* ICU-acquired candidaemia in France: Epidemiology and temporal trends, 2004-2013 - A study from the REA-RAISIN network. *J Infect*, 75, n. 1, p. 59-67, Jul 2017.

BARBOSA, A. H.; DAMASCENO, J. L.; CASEMIRO, L. A.; MARTINS, C. H. G. *et al.* Susceptibility to Oral Antiseptics and Virulence Factors Ex Vivo Associated with *Candida* spp. Isolated from Dental Prostheses. *Journal of Prosthodontics*, 28, n. 4, p. 398-408, 2019.

BATISTA, G. C.; KREBS, V. L.; RUIZ, L. S.; AULER, M. E. *et al.* Oral colonization: a possible source for candidemia in low-weight neonates. *J Mycol Med*, 24, n. 2, p. 81-86, Jun 2014.

CANELA, H. M. S.; CARDOSO, B.; VITALI, L. H.; COELHO, H. C. *et al.* Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses*, 61, n. 1, p. 11-21, 2018.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in medicine*, 5, p. 28, 2018.

CHARONE, S.; PORTELA, M. B.; MARTINS, K. d. O.; SOARES, R. M. *et al.* Role of *Candida* species from HIV infected children in enamel caries lesions: an in vitro study. *Journal of Applied Oral Science*, 25, n. 1, p. 53-60, 2017.

CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. CLSI Supplement M60. INSTITUTE, C. a. L. S. Wayne, PA: 28 p. 2017.

DA SILVA, J. J.; DA SILVA, T. A.; DE ALMEIDA, H.; NETTO, M. F. R. *et al.* *Candida* species biotypes in the oral cavity of infants and children with orofacial clefts under surgical rehabilitation. *Microbial pathogenesis*, 124, p. 203-215, 2018.

DE LIMA RIBAS, M. A.; DOS SANTOS, B. M.; BOTELHO, M. P. J. Evaluation of the bactericide property of 0.12% and 0.2% chlorhexidine digluconate in solution. *Brazilian Journal of Development*, 6, n. 1, p. 4621-4634, 2020.

DE LUCA, C.; GUGLIELMINETTI, M.; FERRARIO, A.; CALABR, M. *et al.* Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiol*, 35, n. 4, p. 459-468, Oct 2012.

DE SOUZA PAZ, C. Q.; TEIXEIRA, A. C. O. C.; JACOBI, C. C. B.; SANTOS, F. F. C. *et al.* Risks associated to the presence of candida in the bucal cavity of children in public schools of Governador Mangabeira - BA. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, 17, n. 1, 2019.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. *International Journal of Microbiology*, 2014, 2014.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; RAMOS, L. d. S.; BARBEDO, L. S.; OLIVEIRA, J. C. A. d. *et al.* Relationship between the antifungal susceptibility profile and the production of virulence-related hydrolytic enzymes in Brazilian clinical strains of *Candida glabrata*. *Mediators of inflammation*, 2017, 2017.

GHANNOUM, M. Azole resistance in dermatophytes: prevalence and mechanism of action. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 106, n. 1, p. 79-86, 2016.

HERKERT, P. F.; GOMES, R. R.; MURO, M. D.; PINHEIRO, R. L. *et al.* In vitro susceptibility and molecular characterization of *Candida* spp. from candidemic patients. *Revista iberoamericana de micologia*, 32, n. 4, p. 221-228, 2015.

IBRAHIM, A. S.; MIRBOD, F.; FILLER, S. G.; BANNO, Y. *et al.* Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 63, n. 5, p. 1993-1998, 1995.

LI, W.-S.; CHEN, Y.-C.; KUO, S.-F.; CHEN, F.-J. *et al.* The impact of biofilm formation on the persistence of candidemia. *Frontiers in microbiology*, 9, p. 1196, 2018.

MIMA, E. G. d. O.; PAVARINA, A. C.; DA SILVEIRA VARGAS, F.; GIAMPAOLO, E. T. *et al.* Effectiveness of chlorhexidine on the disinfection of complete dentures colonised with fluconazole- resistant *Candida albicans*: in vitro study. *Mycoses*, 54, n. 5, p. e506-e512, 2011.

MIYAHIRA, K. M. Análise clínica e fúngica da cavidade bucal de pacientes pediátricos hospitalizados em UTI. *Dissertação de mestrado - UFRJ, Faculdade de Odontologia*. 2018.

MOHAMMADI, R.; ATAEI, B. Candidiasis in Pediatrics; Identification and In vitro Antifungal Susceptibility of the Clinical Isolates. *Iran J Ped Hematol Oncol*, 6, n. 1, p. 43-51, 2016.

MUSHI, M. F.; BADER, O.; BII, C.; GROß, U. *et al.* Virulence and susceptibility patterns of clinical *Candida* spp. isolates from a tertiary hospital, Tanzania. *Medical mycology*, 57, n. 5, p. 566-572, 2018.

PANA, Z. D.; KOTZADAMIS, D.; ROILIDES, E. Invasive Candidiasis in Pediatric Intensive Care Unit: More Challenges. *The Pediatric infectious disease journal*, 37, n. 12, p. 1309-1311, 2018.

PANA, Z. D.; ROILIDES, E.; WARRIS, A.; GROLL, A. H. *et al.* Epidemiology of invasive fungal disease in children. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 6, n. suppl_1, p. S3-S11, 2017.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J. *et al.* Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62, n. 4, p. e1-e50, 2016.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62, n. 4, p. e1-e50, 2015.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet infectious diseases*, 17, n. 12, p. e383-e392, 2017.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

REIS DE SÁ, L. F.; TOLEDO, F. T.; GONÇALVES, A. C.; SOUSA, B. A. *et al.* Synthetic organotellurium compounds sensitize drug-resistant *Candida albicans* clinical isolates to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, n. 1, p. e01231-01216, 2017.

RODRIGUES, L. S.; MOTTA, F. A.; PICHARSKI, G. L.; VASCONCELOS, T. M. *et al.* Invasive candidiasis: Risk factor for mortality in a pediatric tertiary care hospital in south of Brazil. *Medicine*, 98, n. 23, 2019.

RODRIGUES, M. E.; GOMES, F.; RODRIGUES, C. F. *Candida* spp./Bacteria Mixed Biofilms. *Journal of Fungi*, 6, n. 1, p. 5, 2020.

RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 20, n. 3, p. 233-244, 1982.

SALIM, N.; MOORE, C.; SILIKAS, N.; SATTERTHWAITTE, J. *et al.* Chlorhexidine is a highly effective topical broad-spectrum agent against *Candida* spp. *International journal of antimicrobial agents*, 41, n. 1, p. 65-69, 2013.

SALIM, N.; SILIKAS, N.; SATTERTHWAITTE, J.; MOORE, C. *et al.* Chlorhexidine-impregnated PEM/THFM polymer exhibits superior activity to fluconazole-impregnated

polymer against *Candida albicans* biofilm formation. *International journal of antimicrobial agents*, 41, n. 2, p. 193-196, 2013.

SÁNCHEZ-VARGAS, L. O.; ESTRADA-BARRAZA, D.; POZOS-GUILLEN, A. J.; RIVAS-CACERES, R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Archives of oral biology*, 58, n. 10, p. 1318-1326, 2013.

SRIPHANNAM, C.; NUANMUANG, N.; SAENGSAWANG, K.; AMORNTHIPAYAWONG, D. *et al.* Anti-fungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. isolated from blood cultures. *Journal de Mycologie Médicale*, 29, n. 4, p. 325-330, 2019.

THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Archives of oral biology*, 52, n. 8, p. 761-767, 2007.

TURE, Z.; ALP, E. Infection control measures to prevent hospital transmission of *Candida*. *Hospital Practice*, 46, n. 5, p. 253-257, 2018.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. *RBAC*, 49, n. 3, p. 235-239, 2017.

VIEIRA, F.; NASCIMENTO, T. *Candida* Antifungal Resistance and Therapeutic Approach. *Revista Portuguesa De Farmacoterapia*, 9, n. 3, p. 29-36, 2017.

YING, Y.; ZHAO, Y.; HU, X.; CAI, Z. *et al.* In vitro fluconazole susceptibility of 1,903 clinical isolates of *Candida albicans* and the identification of ERG11 mutations. *Microbial Drug Resistance*, 19, n. 4, p. 266-273, 2013.

Table 1: Distribution of *Candida* isolates from oral cavity of ICU hospitalized pediatric patients (G1)(46 isolates) and control (G2) (14 isolates)

	Group	Site		
		Oral Mucosa n=40	Dental Biofilm n=20	
<i>Candida</i> spp. (n=60)	<i>C. albicans</i>	G1 (n=11)	6 (54,5%)	5 (45,5%)
		G2 (n=4)	2 (50%)	2 (50%)
	<i>C. tropicalis</i>	G1 (n=5)	5 (100%)	–
		G2	–	–
	<i>C. guilliermondii</i>	G1 (n=27)	18 (66,7%)	9 (33,3%)
		G2 (n=5)	3 (60%)	2 (40%)
	<i>C. parapsilosis</i>	G1	–	–
		G2 (n=5)	3 (60%)	2 (40%)
	<i>C. glabrata</i>	G1 (n=2)	2 (100%)	–
		G2	–	–
	<i>C. kefyr</i>	G1 (n=1)	1 (100%)	–
		G2	–	–

MIYAHIRA, K. M. **Análise clínica e fúngica da cavidade bucal de pacientes pediátricos hospitalizados em UTI.** Dissertação de mestrado - UFRJ, Faculdade de Odontologia. 2018.

Table 2: Distribution among groups of *Candida* spp in relation to biofilm formation capacity, phospholipase and protease production

		Groups		p valor	Odds ratio (95% CI)
		G1 (n=46)	G2 (n=14)		
<i>C. albicans</i> (n=15)	Biofilm	10 (90.9%)	4 (100%)	NS	0.71 (0.51-0.99)
	Phosp.	3 (27.3%)	–	--	--
	Prot.	9 (81.8%)	2 (50%)	NS	4.5 (0.37-54.1)
<i>C. tropicalis</i> (n=5)	Biofilm	5 (100%)	–	--	--
	Phosp.	–	–	--	--
	Prot.	4 (80%)	–	--	--
<i>C. guilliermondii</i> (n=32)	Biofilm	27 (100%)	5 (100%)	NS	--
	Phosp.	–	1 (100%)	--	--
	Prot.	27 (100%)	2 (40%)	0.002	0.06 (0.01-0.26)
<i>C. parapsilosis</i> (n=5)	Biofilm	–	5 (100%)	--	--
	Phosp.	–	–	--	--
	Prot.	–	5 (100%)	--	--
<i>C. glabrata</i> (n=2)	Biofilm	2 (100%)	–	--	--
	Phosp.	–	–	--	--
	Prot.	1 (50%)	–	--	--
<i>C. kefyr</i> (n=1)	Biofilm	1 (100%)	–	--	--
	Phosp.	–	–	--	--
	Prot.	1 (100%)	–	--	--
<i>Candida</i> spp. (n=60)	Biofilm	45 (97.8%)	14 (100%)	NS	0.76 (0.66-0.87)
	Phosp.	3 (6.5%)	1 (7.1%)	NS	0.90 (0.08-9.47)
	Prot.	42 (91.3%)	9 (64.3%)	0.025	5,83 (1.30-26.11)

Note: ^a G1= UCI hospitalized patients; G2= group control; ^b NS= not significant

Table 3: Distribution and characterization of biofilm formation by site (oral mucosa or dental biofilm) and by species of *Candida* spp isolates from children hospitalized in ICU (G1)

	Biofilm Viability Assay					p value
	Site	Non-producer	Weak	Mild	Strong	
<i>C. albicans</i>	OM (n=6)	1 (16.7%)	–	3 (50%)	2 (33.3%)	0.26
	DB (n=5)	–	2 (40%)	1 (20%)	2 (40%)	
<i>C. tropicalis</i>	OM (n=5)	–	2 (40%)	1 (20%)	2 (40%)	–
<i>C. guilliermondii</i>	OM (n=18)	–	2 (11.1%)	11 (61.1%)	5 (27.8%)	0.60
	DB (n=9)	–	1 (11.1%)	7 (77.8%)	1 (11.1%)	
<i>C. glabrata</i>	OM (n=2)	–	–	–	2 (100%)	–
<i>C. kefyr</i>	OM (n=1)	–	–	1 (100%)	–	–

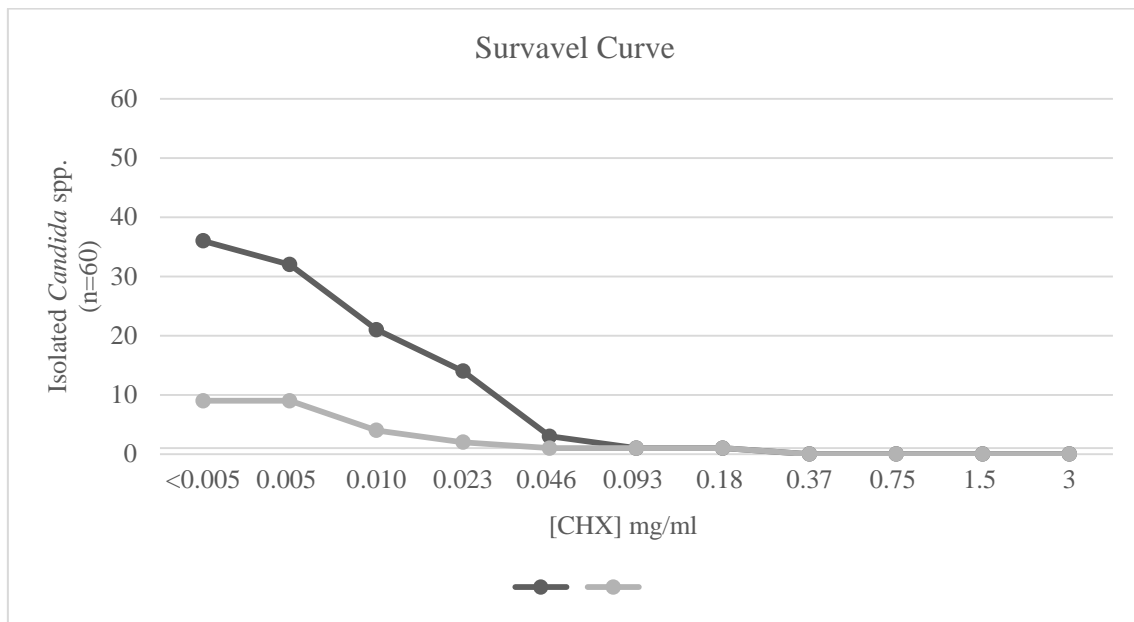
Note: ^a OM= Oral mucosa, DB= Dental biofilm ^b Isolates were classified, according Sanchez, as non-producer when <0.10; weak producer when 0.11- 0.40; mild producer when 0.41- 0.74 and strong producer when >0.75

Table 4: Distribution and characterization of production to phospholipase and protease by site (oral mucosa or dental biofilm) and by species of *Candida* spp isolates from children (n=30) hospitalized in ICU (G1)

		Phospholipase and Protease production						p value
		Site	Non-producer	Weak	Mild	Relatively Strong	Very Strong	
<i>C. albicans</i>	Phosp.	OM (n=6)	5 (83.3%)	–	1 (16.7%)	–	–	0.32
		DB (n=5)	3 (60%)	–	–	1 (20%)	1 (20%)	
	Prot.	OM (n=6)	---	–	–	–	6 (100%)	0.08
		DB (n=5)	2 (40%)	–	–	–	3 (60%)	
<i>C. tropicalis</i>	Phosp.	OM (n=5)	5 (100%)	–	–	–	–	–
	Prot.	OM (n=5)	1 (20%)	–	–	–	4 (80%)	–
<i>C. guilliermondii</i>	Phosp.	OM (n=18)	18 (100%)	–	–	–	–	–
		DB (n=9)	9 (100%)	–	–	–	–	
	Prot.	OM (n=18)	---	–	–	2 (11.1%)	16 (88.9%)	0.22
		DB (n=9)	---	–	1 (11.1%)	–	8 (88.9%)	
<i>C. glabrata</i>	Phosp.	OM (n=2)	2 (100%)	–	–	–	–	–
	Prot.	OM (n=2)	1 (50%)	–	–	–	1 (50%)	–
<i>C. kefyr</i>	Phosp.	OM (n=1)	1 (100%)	–	–	–	–	–
	Prot.	OM (n=1)	–	–	–	–	1 (100%)	–

Note: a OM= Oral mucosa, DB= Dental biofilm b Isolates were classified, according to Pz, as not producer when $Pz = 1$; weak producer when $0.99 \leq Pz \leq 0.90$; mild producer when $0.89 \leq Pz \leq 0.80$; relatively strong producer when $0.79 \leq Pz \leq 0.70$; and very strong when $Pz \leq 0.69$

Graphic 1: Result of sensibility test with chlorhexidine between G1 (n=46) and G2 (14) after 24 h.



Note: ^a The isolates shown in the graph are those that survived the concentrations used in a 24 h period; ^bG1= UCI hospitalized patients; G2= group control; ^c p valor per concentration (χ^2): 3 mg/ml (p= NS); 1.5 mg/ml (p= NS); 0.75 mg/ml (p= NS); 0.37mg/ml (p= NS); 0.18 mg/ml (p= 0.41); 0.093 mg/ml (p= 0.41); 0.046 mg/ml (p= 0.66); 0.023 mg/ml (p= 0.20); 0.010 mg/ml (p= 0.20); 0.005 mg/ml (p= 0.71); <0.005 mg/ml (p= 0.29) ^dNS= not significant

Table 5: Checkerboard assay of *Candida tropicalis* (G1) and *Candida albicans* (G2) with FZL and CHX

Isolate	Medications							Outcome
	CHX			FLZ				
	MIC 1	MIC 2	FIC	MIC 1	MIC 2	FIC	FICI	
<i>C. tropicalis</i>	0.18	0.011	0.06	256	0.011	0.00004	0.0604	Synergy
<i>C. albicans</i>	0.18	0.011	0.06	256	0.011	0.00004	0.0604	Synergy

Note: ^a MIC values were determined by a broth microdilution assay according to CLSI protocol M60 (2017), using 50% growth reduction as the cutoff for the reported MIC values. MIC 1, MIC of FLZ or CHX alone; MIC2, MIC of compound or FLZ in the presence of FLZ or compound, respectively. FIC, fractional inhibitory concentration; FICI, fractional inhibitory concentration index; ^b The strains used were those that survived the CHX concentration at 0.018 mg / ml

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A heterogeneidade da população pediátrica nas unidades de terapia intensiva é uma realidade e é bem elucidada. Diariamente são expostas as condições de risco a exemplo do uso de dispositivos internos, contato paciente-profissional, acometimento de doenças subjacentes, longo tempo de hospitalização e variabilidade medicamentosa. A exposição prévia, contínua e/ ou errônea das medicações leva a seleção de espécies como *Candida* e outros microorganismos, a mutação genética destes e a superexpressão de genes resultando na resistência contra os fármacos utilizados.

Além dos cuidados gerais já protocolados, não se pode esquecer que a cavidade bucal é um sítio bastante diverso em relação a disponibilidade e variedade de microrganismos e, ambiente ideal para a proliferação delas pela temperatura e disponibilidade de nutrientes.

Como já dissertado neste trabalho, a formação do biofilme é um dos principais fatores de virulência, e é um dos fatores que eleva o risco da instalação da doença devido as suas propriedades de proteção contra agentes antimicrobianos e antifúngicos e, sistema imune, produção e secreção de enzimas, que degradam as proteínas das células do hospedeiro propiciando a disseminação sistêmica. A cavidade bucal quando não higienizadas de forma correta (mecânica e/ ou química), não há a desorganização do biofilme inicialmente formado levando a maturação do mesmo e assim, aumentando o risco de acometimento de uma infecção de origem bucal.

Diante da literatura consultada, percebe-se poucos estudos referentes a população infantil. Estudos *in-vitro* de isolados de *Candida* spp. da cavidade bucal e sua íntima relação com candidemias são bem escassos. Por isso, faz se necessárias maiores pesquisas para que haja um melhor entendimento do comportamento desses fungos na cavidade oral avaliando os sintomas relacionados as infecções que possam ser instaladas por esses microrganismos traçando assim uma terapia mais adequada visando a melhora no quadro de saúde desse paciente.

E, afim de diminuir a alta taxa de mortalidade a partir de infecções ocasionadas por fungos em pacientes pediátricos hospitalizados em UTI, o uso da Clorexidina tópica em concentração 0,12%, comumente utilizada e facilmente encontrada, como terapia adjuvante juntamente a terapia medicamentosa e, com a desorganização mecânica do biofilme dental

faz-se necessário. Contudo, é importante levar a informação e a educação tanto para a equipe multidisciplinar tanto para os cuidadores desses pacientes para que juntos com esses profissionais possam colaborar com a condição do paciente contribuindo para uma menor permanência no ambiente hospitalar.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados podemos concluir que:

- Podemos observar que em ambos os grupos, tanto de pacientes hospitalizados quanto o grupo controle, todos os isolados foram capazes de produção de biofilme. Caracterizados por serem fortes produtores de biofilme.
- Em relação a produção de fosfolipase, não houve diferença na frequência dos isolados quando comparados entre os grupos. A produção de protease foi observada em 42 (91,3%) dos isolados do G1 enquanto no G2, 9 (64,2%) dos isolados foram capazes de produzir. Destes podemos caracterizar em relativamente fortes e fortes produtores dessas enzimas.
- No grupo de pacientes hospitalizados (G1; n=46), 38 (82,6%) dos isolados foram resistentes ao Fluconazol enquanto 13 (92,9%) do grupo controle (G2; n= 14), independente do sítio, biofilme supra gengival e mucosa.
- A *Candida guilliermondii* foi a espécie mais frequente no estudo 32 (53,33%). Ao que se diz respeito a produção de protease, 24 (75%) isolados foram caracterizados como fortes produtores. A resistência ao Fluconazol foi observada em 27 (84%) dos isolados. Mostrando o alto indicio dessas espécies serem resistentes.
- Após o teste de susceptibilidade a Clorexidina, observamos crescimento dos isolados em baixas concentrações. Contudo, houve uma inibição a partir do momento que a concentração ultrapassa 0,018 mg/ml.
- Após o ensaio do checkerboard observamos o sinergismo entre as duas drogas.
- Na prática clínica, o cuidado prévio quanto a suspeita da infecção ocasionada por fungo e o tratamento adequado são de extrema relevância. Porém a identificação de uma infecção ocasionada por fungo ainda é um grande desafio. Devido à dificuldade de higienização da cavidade bucal devido ao uso de artefatos orais, o uso da Clorexidina tópica como tratamento adjuvante ao uso sistêmico de antifúngicos pode se tornar uma grande ferramenta ao combate dessas infecções que podem se originar a partir dos microrganismos da cavidade bucal, já que não existe mesma apresentação entre as duas drogas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTAR, F.; TEKIN, R.; GÜNEŞ, A.; ÜLGEN, C. *et al.* Determining the independent risk factors and mortality rate of nosocomial infections in pediatric patients. *BioMed research international*, 2016, 2016.

ANDREOLA, P.; DEMATHÉ, A.; GALAFASSI, D.; ELSEMANN, E. B. *et al.* Comparative study between extracellular phospholipase and proteinase production in clinically important of the genus *Candida* isolated in oral candidiasis patients. *Revista de Odontologia da UNESP*, 45, n. 4, p. 219-226, 2016.

BADIEE, P.; CHOOPANIZADEH, M.; MOGHADAM, A. G.; NASAB, A. H. *et al.* Antifungal susceptibility patterns of colonized *Candida* species isolates from immunocompromised pediatric patients in five university hospitals. *Iranian journal of microbiology*, 9, n. 6, p. 363, 2017.

BALDESI, O.; BAILLY, S.; RUCKLY, S.; LEPAPE, A. *et al.* ICU-acquired candidaemia in France: Epidemiology and temporal trends, 2004-2013 - A study from the REA-RAISIN network. *J Infect*, 75, n. 1, p. 59-67, Jul 2017.

BARBOSA, A. H.; DAMASCENO, J. L.; CASEMIRO, L. A.; MARTINS, C. H. G. *et al.* Susceptibility to Oral Antiseptics and Virulence Factors Ex Vivo Associated with *Candida* spp. Isolated from Dental Prostheses. *Journal of Prosthodontics*, 28, n. 4, p. 398-408, 2019.

BASSETTI, M.; GARNACHO-MONTERO, J.; CALANDRA, T.; KULLBERG, B. *et al.* Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. *Intensive care medicine*, 43, n. 9, p. 1225-1238, 2017.

BATISTA, G. C.; KREBS, V. L.; RUIZ, L. S.; AULER, M. E. *et al.* Oral colonization: a possible source for candidemia in low-weight neonates. *J Mycol Med*, 24, n. 2, p. 81-86, Jun 2014.

BEYER, R.; SPETTEL, K.; ZELLER, I.; LASS- FLÖRL, C. *et al.* Antifungal susceptibility of yeast bloodstream isolates collected during a 10- year period in Austria. *Mycoses*, 62, n. 4, p. 357-367, 2019.

CANELA, H. M. S.; CARDOSO, B.; VITALI, L. H.; COELHO, H. C. *et al.* Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses*, 61, n. 1, p. 11-21, 2018.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in medicine*, 5, p. 28, 2018.

CHARONE, S.; PORTELA, M. B.; MARTINS, K. d. O.; SOARES, R. M. *et al.* Role of *Candida* species from HIV infected children in enamel caries lesions: an in vitro study. *Journal of Applied Oral Science*, 25, n. 1, p. 53-60, 2017.

CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. CLSI Supplement M60. INSTITUTE, C. a. L. S. Wayne, PA: 28 p. 2017.

- COLOMBO, A.; DE ALMEIDA JÚNIOR, J.; SLAVIN, M. A.; CHEN, S. C. *et al.* Candida and invasive mould diseases in non-neutropenic critically ill patients and patients with haematological cancer. *The Lancet Infectious Diseases*, 2017.
- CORREIA, M.; SIMÃO, C.; LITO, L. M.; CABEÇADAS, M. *et al.* Nosocomial infection in a pediatric intensive care unit. *Acta medica portuguesa*, 10, n. 6-7, p. 463-468, 1997.
- D'EÇA JÚNIOR, A.; SILVA, A. F.; ROSA, F. C.; MONTEIRO, S. G. *et al.* In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of Candida. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44, n. 3, p. 334-338, 2011.
- DA SILVA, J. J.; DA SILVA, T. A.; DE ALMEIDA, H.; NETTO, M. F. R. *et al.* Candida species biotypes in the oral cavity of infants and children with orofacial clefts under surgical rehabilitation. *Microbial pathogenesis*, 124, p. 203-215, 2018.
- DAGDEVIREN, M.; CERIKCIOGLU, N.; KARAVUS, M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of Candida parapsilosis strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses*, 48, n. 5, p. 321-326, 2005.
- DE LIMA RIBAS, M. A.; DOS SANTOS, B. M.; BOTELHO, M. P. J. Evaluation of the bactericide property of 0.12% and 0.2% chlorhexidine digluconate in solution. *Brazilian Journal of Development*, 6, n. 1, p. 4621-4634, 2020.
- DE LUCA, C.; GUGLIELMINETTI, M.; FERRARIO, A.; CALABR, M. *et al.* Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiol*, 35, n. 4, p. 459-468, Oct 2012.
- DE SOUZA PAZ, C. Q.; TEIXEIRA, A. C. O. C.; JACOBI, C. C. B.; SANTOS, F. F. C. *et al.* Risks associated to the presence of candida in the bucal cavity of children in public schools of Governador Mangabeira - BA. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, 17, n. 1, 2019.
- DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence factors contributing to pathogenicity of Candida tropicalis and its antifungal susceptibility profile. *International Journal of Microbiology*, 2014, 2014.
- EPELBAUM, O.; CHASAN, R. Candidemia in the Intensive Care Unit. *Clin Chest Med*, 38, n. 3, p. 493-509, Sep 2017.
- FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; RAMOS, L. d. S.; BARBEDO, L. S.; OLIVEIRA, J. C. A. d. *et al.* Relationship between the antifungal susceptibility profile and the production of virulence-related hydrolytic enzymes in Brazilian clinical strains of Candida glabrata. *Mediators of inflammation*, 2017, 2017.
- GHANNOUM, M. Azole resistance in dermatophytes: prevalence and mechanism of action. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 106, n. 1, p. 79-86, 2016.
- GUERRA, L. d. F. C.; DO SANTOS, A. T. Perfil odontológico de pacientes internados na unidade de terapia intensiva de um hospital oncológico do sudoeste do Paraná. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, 22, n. 2, 2018.

- HERKERT, P. F.; GOMES, R. R.; MURO, M. D.; PINHEIRO, R. L. *et al.* In vitro susceptibility and molecular characterization of *Candida* spp. from candidemic patients. *Revista iberoamericana de micologia*, 32, n. 4, p. 221-228, 2015.
- IBRAHIM, A. S.; MIRBOD, F.; FILLER, S. G.; BANNO, Y. *et al.* Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 63, n. 5, p. 1993-1998, 1995.
- KANTARCIOĞLU, A. S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, 45, n. 5- 6, p. 160-165, 2002.
- KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 373, n. 15, p. 1445-1456, 2015.
- LI, W.-S.; CHEN, Y.-C.; KUO, S.-F.; CHEN, F.-J. *et al.* The impact of biofilm formation on the persistence of candidemia. *Frontiers in microbiology*, 9, p. 1196, 2018.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H. *et al.* *Microbiologia de Brock-14ª Edição*. Artmed Editora, 2016. 8582712987.
- MIMA, E. G. d. O.; PAVARINA, A. C.; DA SILVEIRA VARGAS, F.; GIAMPAOLO, E. T. *et al.* Effectiveness of chlorhexidine on the disinfection of complete dentures colonised with fluconazole- resistant *Candida albicans*: in vitro study. *Mycoses*, 54, n. 5, p. e506-e512, 2011.
- MIYAHIRA, K. M. Análise clínica e fúngica da cavidade bucal de pacientes pediátricos hospitalizados em UTI. *Dissertação de mestrado - UFRJ, Faculdade de Odontologia*. 2018.
- MOHAMMADI, R.; ATAEI, B. Candidiasis in Pediatrics; Identification and In vitro Antifungal Susceptibility of the Clinical Isolates. *Iran J Ped Hematol Oncol*, 6, n. 1, p. 43-51, 2016.
- MUSHI, M. F.; BADER, O.; BII, C.; GROß, U. *et al.* Virulence and susceptibility patterns of clinical *Candida* spp. isolates from a tertiary hospital, Tanzania. *Medical mycology*, 57, n. 5, p. 566-572, 2018.
- NGUYEN, T. N.; MATANGKASOMBUT, O.; RITPRAJAK, P. Differential dendritic cell responses to cell wall mannan of *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Candida dubliniensis*. *Journal of oral science*, p. 17-0426, 2018.
- OLIVEIRA, E. d.; SILVA, S. C.; SOARES, A. J.; ATTUX, C. *et al.* Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. *Rev Soc Bras Med Trop*, 31, n. 6, p. 523-527, 1998.
- PANA, Z. D.; KOTZADAMIS, D.; ROILIDES, E. Invasive Candidiasis in Pediatric Intensive Care Unit: More Challenges. *The Pediatric infectious disease journal*, 37, n. 12, p. 1309-1311, 2018.
- PANA, Z. D.; ROILIDES, E.; WARRIS, A.; GROLL, A. H. *et al.* Epidemiology of invasive fungal disease in children. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 6, n. suppl_1, p. S3-S11, 2017.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J. *et al.* Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62, n. 4, p. e1-e50, 2016.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62, n. 4, p. e1-e50, 2015.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet infectious diseases*, 17, n. 12, p. e383-e392, 2017.

PORTELA, M. B. Estudo de proteínas funcionais de *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal em crianças infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana. 2006. 176 f. - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), UFRJ.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

QUEIROZ, A. M. d.; EDUARDO, C. d. P.; NAVARRO, C. M.; EDUARDO, F. d. P. *et al.* Manual de odontologia hospitalar. *In: Manual de odontologia hospitalar*, 2012. p. 88-88.

REIS DE SÁ, L. F.; TOLEDO, F. T.; GONÇALVES, A. C.; SOUSA, B. A. *et al.* Synthetic organotellurium compounds sensitize drug-resistant *Candida albicans* clinical isolates to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, n. 1, p. e01231-01216, 2017.

RIBEIRO, A. d. A.; PORTELA, M.; SOUZA, I. P. d. Relation between biofilm, caries activity and gingivitis in HIV+ children. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 16, n. 2, p. 144-150, 2002.

RODRIGUES, L. S.; MOTTA, F. A.; PICHARSKI, G. L.; VASCONCELOS, T. M. *et al.* Invasive candidiasis: Risk factor for mortality in a pediatric tertiary care hospital in south of Brazil. *Medicine*, 98, n. 23, 2019.

RODRIGUES, M. E.; GOMES, F.; RODRIGUES, C. F. *Candida* spp./Bacteria Mixed Biofilms. *Journal of Fungi*, 6, n. 1, p. 5, 2020.

ROILIDES, E.; CARLESSE, F.; LEISTER-TEBBE, H.; CONTE, U. *et al.* A Prospective, Open-label Study to Assess the Safety, Tolerability and Efficacy of Anidulafungin in the Treatment of Invasive Candidiasis in Children 2 to <18 Years of Age. *Pediatr Infect Dis J*, 38, n. 3, p. 275-279, Mar 2019.

RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 20, n. 3, p. 233-244, 1982.

SALIM, N.; MOORE, C.; SILIKAS, N.; SATTERTHWAITTE, J. *et al.* Chlorhexidine is a highly effective topical broad-spectrum agent against *Candida* spp. *International journal of antimicrobial agents*, 41, n. 1, p. 65-69, 2013.

SALIM, N.; SILIKAS, N.; SATTERTHWAITTE, J.; MOORE, C. *et al.* Chlorhexidine-impregnated PEM/THFM polymer exhibits superior activity to fluconazole-impregnated

polymer against *Candida albicans* biofilm formation. *International journal of antimicrobial agents*, 41, n. 2, p. 193-196, 2013.

SALVATICO, S.; FEUILLOLAY, C.; JABBOUR, V.; GOUHIER-KODAS, C. *et al.* Representativeness of EN 1040/13727 Assay Conditions for Evaluating In Vitro the Bactericidal Activity of a Chlorhexidine Digluconate and Benzalkonium Chloride Antiseptic Preparation. 2018.

SAMARANAYAKE, L.; LAMEY, P. Oral candidosis: 1. Clinicopathological aspects. *Dental update*, 1988.

SÁNCHEZ-VARGAS, L. O.; ESTRADA-BARRAZA, D.; POZOS-GUILLEN, A. J.; RIVAS-CACERES, R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Archives of oral biology*, 58, n. 10, p. 1318-1326, 2013.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS- FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 58, p. 2-13, 2015.

SCHEIBLER, E.; DA SILVA, R. M.; LEITE, C. E.; CAMPOS, M. M. *et al.* Stability and efficacy of combined nystatin and chlorhexidine against suspensions and biofilms of *Candida albicans*. *Archives of oral biology*, 89, p. 70-76, 2018.

SRIPHANNAM, C.; NUANMUANG, N.; SAENGSAWANG, K.; AMORNTHIPAYAWONG, D. *et al.* Anti-fungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. isolated from blood cultures. *Journal de Mycologie Médicale*, 29, n. 4, p. 325-330, 2019.

THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Archives of oral biology*, 52, n. 8, p. 761-767, 2007.

TURE, Z.; ALP, E. Infection control measures to prevent hospital transmission of candida. *Hospital Practice*, 46, n. 5, p. 253-257, 2018.

VICTORIA CASTELLI, M.; GABRIEL DERITA, M.; NOELI LOPEZ, S. Novel antifungal agents: a patent review (2013-present). *Expert opinion on therapeutic patents*, 27, n. 4, p. 415-426, 2017.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. *RBAC*, 49, n. 3, p. 235-239, 2017.

VIEIRA, F.; NASCIMENTO, T. *Candida* Antifungal Resistance and Therapeutic Approach. *Revista Portuguesa De Farmacoterapia*, 9, n. 3, p. 29-36, 2017.

WARRIS, A. *Candida auris*, what do paediatricians need to know? *Archives of disease in childhood*, 103, n. 9, p. 891-894, 2018.

YANG, H.; TSANG, P. C. S.; POW, E. H. N.; LAM, O. L. T. *et al.* Potential role of *Candida albicans* secreted aspartic protease 9 in serum induced-hyphal formation and interaction with oral epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 139, p. 103896, 2020.

YING, Y.; ZHAO, Y.; HU, X.; CAI, Z. *et al.* In vitro fluconazole susceptibility of 1,903 clinical isolates of *Candida albicans* and the identification of ERG11 mutations. *Microbial Drug Resistance*, 19, n. 4, p. 266-273, 2013.

8 Anexos

ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Alterações bucais e perfil microbiológico de pacientes pediátricos hospitalizados

Pesquisador: Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 54723716.2.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da Faculdade de Odontologia da UFRJ
Financiamento Próprio
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.722.126

Apresentação do Projeto:

Protocolo 074-16 do grupo III. Emenda E1 recebida em 11.8.2016.

INTRODUÇÃO

Com evidências científicas que apontam para uma relação positiva entre a condição de saúde bucal do paciente hospitalizado e o comprometimento do estado geral de sua saúde, a Odontologia passa a dividir responsabilidades juntamente com a equipe de saúde no ambiente hospitalar, contribuindo para uma melhor qualidade de vida desses pacientes. A pneumonia hospitalar (infecção nosocomial), que se instala após 48 horas da internação do paciente, é responsável por 10% a 15% de todas as infecções adquiridas em hospitais e de 20% a 50% dos óbitos dos pacientes que a contraem (MARTINS, 2009). Estudos indicam que pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) apresentam higiene bucal deficiente e consequente acúmulo de biofilme dental e inflamação gengival aumentados pelo tempo de internação, atuando como uma fonte de infecção nosocomial. Sabe-se que a cavidade bucal é particularmente susceptível à infecção por possuir numerosos micro-organismos que proliferam em condições de imunossupressão, causando lesões fúngicas,

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.uff.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



Continuação do Parecer: 1.722.126

virais, bacterianas e neoplásicas. Uma recente e importante preocupação envolvendo pacientes com doenças sistêmicas crônicas ou infectocontagiosas é o desenvolvimento de infecções nosocomiais. Dentre os patógenos mais comumente envolvidos estão os *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (MORAN et al., 2006; NASSERI, SOBOL 2009; MILSTONE et al., 2010; MATLOW et al., 2012). Portanto, a presença do profissional de Odontologia no ambiente hospitalar é fundamental para o tratamento integral do paciente e na sua recuperação mais rápida (GOMES; ESTEVES, 2012). Nos Estados Unidos, a Odontologia já está inserida no contexto hospitalar desde 1901, quando o Hospital Geral da Filadélfia estabeleceu seu primeiro departamento de Odontologia e, posteriormente, desenvolveu um programa de residência (WILLIS, 1965). Com relação ao Brasil, observamos que alguns hospitais têm demonstrado uma preocupação com relação à assistência odontológica prestada no ambiente hospitalar, mas estes ainda são poucos. Há aproximadamente 10 anos, o atendimento odontológico de rotina foi implementado na Santa Casa de Barretos, o que refletiu em menos casos de infecção, uso de medicamentos e tempo de internação. Já no setor de onco-hematologia do Hospital Albert Einstein, o acompanhamento odontológico diário reduziu o tempo de internação em cinco dias quando comparado com pacientes que não foram acompanhados por cirurgião-dentista (CD). Desde 2010, pacientes internados nas nove Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) do Instituto Central do Hospital das Clínicas são visitados diariamente por CDs, que têm como objetivo identificar e tratar possíveis focos de infecção na boca dos doentes (LOPES, 2012). Em 2011, o Programa Sorria Mais São Paulo, inicialmente implantado no Hospital Estadual Mario Covas, em Santo André, o maior público do ABC paulista, com o objetivo de garantir a manutenção da saúde bucal tanto dos pacientes internados como também os portadores de doenças crônicas atendidos regularmente nas unidades, já está presente no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Centro de Referência e Treinamento em DST/Aids e Cratod (Centro de Referência em Álcool, Tabaco e Outras Drogas) (SECRETARIA DE SAÚDE DE SÃO PAULO, 2012). Já no estado do Rio de Janeiro, centros de saúde e hospitais incorporaram a assistência odontológica às rotinas das UTIs, como é o caso do Hospital Federal de Bonsucesso, cujo trabalho iniciou-se em 2009 com o Projeto Odonto-leito, Hospital Municipal Desembargador Leal Júnior (Itaboraí), e o Hospital Central da Aeronáutica (ASSIS, 2012).

Embora haja a iniciativa por parte desses hospitais de incluir a assistência odontológica na rotina de pacientes internados, ainda não se vê essa realidade difundida entre os hospitais pediátricos. A Agência Nacional de Vigilância

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



Continuação do Parecer: 1.722.126

Sanitária (Anvisa), em sua RDC 07/2010, dispõe sobre os requisitos mínimos para funcionamento de UTI, que recomenda que todo paciente deve receber assistência integral e interdisciplinar, inclusive a assistência odontológica (ANVISA, 2010). Além dessa resolução, em 2013, foi aprovado na Comissão de Assuntos Sociais do Senado Federal o Projeto de Lei Complementar 34/2013 (antigo PL nº 2.776/2008), que estabelece a obrigatoriedade da presença do cirurgião-dentista nas equipes multiprofissionais das UTIs, em hospitais públicos e privados, para a prestação de assistência odontológica aos pacientes em regime de internação hospitalar. Quanto à

presença do cirurgião-dentista como integrante da equipe médica que atende pacientes pediátricos internados em enfermaria, isso ainda não foi estabelecido e pouquíssimos serviços contam com essa realidade. Embora a inclusão do CD às equipes multidisciplinares hospitalares, principalmente nas UTIs, já exista, ela ainda é muito restrita, e o que se observa é que na maioria dos hospitais brasileiros a Odontologia ainda é negligenciada. Fato que deveria despertar a atenção das autoridades para a relevância dos cuidados com a saúde bucal em ambiente hospitalar, principalmente no que se refere à assistência aos pacientes pediátricos, dada a sua fragilidade no que tange ao cuidado oral, uma vez que estudos demonstram que doenças bucais podem atuar como foco de disseminação de microrganismos patogênicos e atuarem como possível fator de risco para infecções hospitalares (MOJON, 2002; AZARPAZHOOH; LEAKE, 2006). 1.1 Cuidados bucais preventivos no hospital Crianças portadoras de doenças sistêmicas crônicas costumam passar por diversos períodos de internação hospitalar. Processos agudos também podem levar o paciente a uma condição de internação e durante este período, é necessário que o cuidado com a saúde bucal não seja negligenciado, pois isto pode levar o paciente a uma piora no quadro de saúde geral. No entanto, esta é uma situação bem comum, muitas vezes causada pela falta de conhecimento e orientação por parte dos profissionais e responsáveis que cuidam desses pacientes. Além disso, na maioria das vezes, o CD não faz parte da equipe médica envolvida no tratamento de crianças hospitalizadas, o que piora ainda mais o problema. Barbosa et al. (2010) realizaram um estudo a fim de avaliar o conhecimento e as práticas em saúde bucal em crianças com câncer hospitalizadas e concluíram que ainda não há um protocolo de cuidados com a saúde bucal para esses pacientes. Salientam, ainda, a importância do estabelecimento de um protocolo de cuidados diante da fragilidade dessas crianças e a relevância do CD no contexto hospitalar a fim de minimizar manifestações bucais advindas do tratamento oncológico e melhorar a qualidade de vida do paciente hospitalizado. Com o intuito de verificar a presença de cuidados relacionados à saúde bucal em pacientes hospitalizados, Ximenes et al.

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.uff.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



Continuação do Parecer: 1.722.126

(2008) observaram que durante o período de internação a higiene bucal dessas crianças não era realizada de forma sistemática e nem orientada. Portanto, ressaltaram que é essencial a presença do CD como membro da equipe de saúde do hospital, atuando também na promoção da saúde bucal. Silveira et al. (2014) avaliaram o perfil de saúde bucal e hábitos de higiene de crianças hospitalizadas, de 0 a 12 anos, e constataram que durante o período de internação os cuidados com a higiene oral têm baixa prioridade e destacaram, dessa forma, a importância de um programa de promoção à saúde bucal nessa população a fim de minimizar o agravamento das suas condições de saúde e evitar um maior período de internação. Em estudo realizado para verificar a existência de protocolo de controle de infecção oral em pacientes internados em hospitais do estado do Rio de Janeiro, Kahn et al. (2008) concluíram, por meio de questionário, que em ambiente de UTI 39% das instituições realizavam controle de biofilme por meio de solução antisséptica, escovação ou gaze, embora sem padronização, e apenas 15% dos hospitais adotavam protocolo regular. GaettiJardim et al. (2013) realizaram uma revisão dos protocolos de atendimento a pacientes hospitalizados já publicados e encontraram poucos artigos sobre esse assunto. Apesar de existir protocolo de rotina de higienização bucal, com clorexidina a 0,12% de 12/12 horas, para paciente adulto crítico internado (AMIB, 2014), no que concerne ao cuidado com a higiene bucal do paciente pediátrico esse item ainda não está bem estabelecido na literatura.

1.2 Saúde bucal de pacientes hospitalizados e a influência da internação na sua condição bucal Dados recentes revelaram, através de métodos moleculares independentes de cultivo, usando principalmente estudos de clonagem baseadas em genes 16S rRNA, que cerca de 600 espécies ou filotipos podem ser comumente isolados na cavidade bucal de pacientes sistemicamente saudáveis (<http://www.homd.org>; Dewhirst et al., 2010; Paster & Dewhirst de 1988). Estes micro-organismos da cavidade oral tem sido correlacionados com uma série de doenças infecciosas orais, incluindo cárie dentária, periodontite, infecções endodônticas, entre outras. No entanto, muito pouco se sabe quanto à comunidade microbiana encontrada em pacientes hospitalizados, apesar de serem muitas as alterações e necessidades odontológicas que podem ser apresentadas por estes indivíduos, sobretudo pacientes infantis hospitalizados, decorrentes diretamente ou indiretamente da doença/internação. CRUZ et al (2008) determinaram a presença de alterações da mucosa bucal em 165 crianças de 3 a 12 anos hospitalizadas em três alas do Hospital Universitário Materno Infantil

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



Continuação do Parecer: 1.722.126

da Universidade Federal do Maranhão e as alterações mais frequentes foram a língua saburrosa (61,82%), candidíase pseudomembranosa (5,45%) e infecção herpética recorrente (3,64%). Das 165 crianças examinadas, 78,18% exibiram alterações. Barbosa et al. (2010) verificaram que as manifestações orais mais frequentes entre crianças sob tratamento antineoplásico foram mucosite, xerostomia e ausência de paladar. Lopes et al. (2012), avaliando manifestações orais decorrentes de quimioterapia em crianças de um Centro de Tratamento Oncológico de Teresina-PI, observaram que a mucosite (62,5%) foi a mais prevalente, seguida da xerostomia (54,1%), disfagia (50,0%), disgeusia (45,8%), candidíase (41,6%), sangramento gengival (25,0%), herpes labial (25,0%) e odontalgia (12,5%). Estudos também demonstram que a presença de patógenos cariogênicos e periodontais, além de uma higiene bucal deficiente atuam como possíveis fatores de risco para a pneumonia nosocomial. Dessa forma, a cavidade oral pode atuar como um reservatório de patógenos respiratórios. Portanto, intervenções em saúde bucal podem reduzir a incidência ou a progressão da pneumonia adquirida em pacientes hospitalizados (MOJON, 2002; AZARPAZHOOH; LEAKE, 2006). Recentemente, alguns estudos já documentaram um aumento na prevalência de MRSA entre crianças hospitalizadas (Nasseri, Sobol 2009; Milstone et al., 2010; Matlow et al., 2012), mas poucos estudos detalhados existem sobre a distribuição dos estafilococos na boca. Porém, a literatura fornece um número de sólidas evidências demonstrando que os *S. aureus* podem ser isolados, com certa frequência, da cavidade bucal de grupos particulares de pacientes, como crianças (Miyake et al, 1991) e portadores de doenças sistêmica (Jobins et al., 1992). Assim, parece claro que a cavidade bucal pode representar um reservatório, pobremente reconhecido, de cepas de estafilococos, e que, sob condições apropriadas, poderia favorecer à instalação de doenças localizadas ou sistêmicas, principalmente por este ser um patógeno oportunista, produtor de diversos fatores de virulência e resistência a diversos antimicrobianos. Huang & Platt (2003) avaliaram a evolução da colonização ou infecção por MRSA, em pacientes de um hospital universitário em Boston, nos Estados Unidos, e verificaram que, dentre 209 pacientes recentemente colonizados por essas cepas, 60 (29%) desenvolveram 90 episódios de infecções por MRSA aproximadamente 1,5 infecção/paciente) em um período de até 18 meses após o início da colonização. Os tipos mais comuns de infecções foram: bacteremias (28%) e pneumonias (20%), além das infecções em tecidos moles (16%) e ossos ou articulações (16%). Lages et al.(2014) investigaram a associação entre o tempo de internação hospitalar e a condição de saúde bucal de pacientes adultos e observaram que a condição periodontal agravou-se durante o período de

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



Continuação do Parecer: 1.722.126

internação, fato que deveria despertar a atenção para a importância dos cuidados de higiene bucal em ambiente hospitalar uma vez que a frequência dos mesmos diminuiu após a internação. Needleman et al. (2012)

também estudaram essa associação e concluíram que o agravamento da condição bucal de pacientes hospitalizados aponta para uma baixa qualidade de vida e piora do seu bem-estar. Em seu estudo, Carrilho Neto et al. (2011) investigaram as condições de saúde bucal e sua associação com o estado de saúde de pacientes adultos hospitalizados no Hospital Universitário da Região Norte do Paraná da Universidade Estadual de Londrina, Brasil. Como resultado, observaram que a maioria dos pacientes necessitavam de cuidados com a higiene oral e que o maior período de internação poderia aumentar o acúmulo de biofilme e a inflamação gengival. Sendo assim, a ação de um profissional de Odontologia em ambiente hospitalar poderia contribuir para melhorar a saúde bucal, e em certa medida, a condição sistêmica e a alimentação de pacientes hospitalizados. Em estudo de revisão sistemática, Terezakis et al. (2011) identificaram que a hospitalização está associada ao agravamento da condição bucal dos pacientes, visto que há um aumento do risco de infecções nosocomiais e piora na qualidade de vida, bem como aumento nos custos com os cuidados hospitalares. Embora seja de conhecimento comum que crianças hospitalizadas apresentem diversas alterações bucais, assim como grande necessidade odontológica, estudos científicos sobre prevalência de

cárie e necessidades odontológicas em pacientes pediátricos hospitalizados não foram encontrados na literatura consultada. Ressalva cada ao estudo de Nicopoulos et al. (2007) que, ao avaliarem 120 crianças internadas, observaram 43% de necessidades odontológicas não atendidas (cáries não tratadas) e 59% de anormalidades em tecido mole (mucosa), sendo as mais comuns: eritema, placas brancas, ulceração, petéquias, equimose. Diante do exposto, é essencial a presença do cirurgião-dentista no contexto hospitalar como membro da equipe multidisciplinar, contribuindo para uma atenção integral ao paciente hospitalizado, particularmente o pediátrico, a fim de minimizar potenciais riscos de infecção hospitalar advindos de focos na cavidade oral. Ademais, é necessário conhecer, por meio de dados consistentes, as condições de saúde bucal, suas necessidades odontológicas e os cuidados preventivos estabelecidos para estes pacientes, já que a literatura é escassa nesse assunto. Adicionalmente, o conhecimento da microbiota oral destes pacientes pode ajudar no tratamento e na prevenção de possíveis infecções que venham a agravar a condição sistêmica dos mesmos levando a um aumento do número de dias de internação.

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



Continuação do Parecer: 1.722.126

HIPÓTESE

A presença de lesões orais de tecidos moles e prevalência de cárie, em crianças hospitalizadas, e suas elevadas comparando com crianças não hospitalizadas. As necessidades de tratamento odontológico nesse grupo de pacientes são mais elevadas. Os cuidados adotados pela equipe de saúde e responsáveis com relação à saúde bucal das crianças hospitalizadas são inadequados. O perfil microbiológico (fúngico e bacteriano) da cavidade bucal destes pacientes é diferente dos não hospitalizados. Existe relação entre os achados clínicos e microbiológicos com a história médica dos pacientes (diagnóstico, motivo de internação, tempo de internação, episódios de internação). Os fatores de virulência e susceptibilidade ao Fluconazol das *Candida spp* encontradas nos pacientes hospitalizados, comparando com o com a expressão desses fatores dos isolados do grupo controle são mais atuantes, in vitro. A incidência de isolamento de *S. aureus*, *S. epidermidis* e em outras espécies *Staphylococcus coagulase-negativas* no biofilme dental e saliva de crianças

hospitalizadas, através de PCR é alta. A frequência de cepas de *Staphylococcus* metilina resistentes, através do gene *mecA* é alta nos pacientes hospitalizados.

METODOLOGIA

Este estudo será do tipo transversal, observacional e laboratorial. A pesquisa será realizada com crianças hospitalizadas em enfermarias e UTIs de dois Hospitais Pediátricos de referência no município do Rio de Janeiro (Instituto Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira - IPPMG - e Hospital Municipal Jesus, e crianças pacientes da clínica de Odontologia da FO, UFRJ (grupo controle). Esses hospitais foram selecionados por serem os dois maiores hospitais pediátricos no Rio de Janeiro, que atendem as diversas especialidades pediátricas e com maior número de leitos em enfermarias e UTIs pediátrica para atendimento hospitalar de crianças (60 no IPPMG e 80 no HM Jesus). A participação dos sujeitos na pesquisa será voluntária e todos, juntamente com os responsáveis legais, receberão esclarecimentos necessários para a realização da pesquisa e assinarão previamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. A amostra será censitária e para isso tomou-se por base a taxa de ocupação mensal desses leitos, sendo 100% no IPPMG e 100% no HM Jesus. Serão então examinados todos os pacientes internados por no mínimo 48h em enfermarias e UTIs nesses hospitais, durante o período de março a maio de 2016. Estimase com isso uma amostra mínima de 140 pacientes, desde que atendam aos critérios de inclusão e

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



Continuação do Parecer: 1.722.126

exclusão. Para o grupo controle serão selecionados por conveniência o mesmo número de crianças. A coleta de dados será realizada através do preenchimento de uma ficha de identificação e anotação dos dados obtidos da anamnese, exame clínico extra e intrabucal e pesquisa aos prontuários médicos. Também serão anotadas informações a respeito de cuidados adotados pela equipe de saúde e/ou responsável legal com relação aos hábitos de higiene bucal das crianças. Exame intra e extraorais serão realizados por um único examinador previamente calibrado, com auxílio de espelho bucal, sonda exploradora, gaze e luz ambiente. O biofilme dentário será avaliado para obtenção do índice de biofilme de acordo com RIBEIRO et al. (2002), assim como os elementos dentários presentes para obtenção dos índices de cárie (ceo/CPOD) (OMS, 1987) e presença de necessidades odontológicas (tratamento restaurador, exodontias, endodontia, etc). Será realizada uma entrevista com o responsável legal da criança/cuidador principal e com o profissional de enfermagem responsável pelo setor, para obtenção de dados relativos aos cuidados de higiene bucal das crianças, realizados durante o período de internação. Espécimes clínicos (saliva e biofilme supragengival) serão coletados através de esfregaços na língua, bochechas, palato, assoalho da boca e mucosas jugal, utilizando SWAB®. Os pacientes e responsáveis receberão orientações de higiene oral e pacientes com necessidades odontológicas serão encaminhados para tratamento na clínica de pacientes Especiais na FO, UFRJ. As análises laboratoriais em laboratórios da Universidade Federal do Rio de Janeiro serão realizadas para análises microbiológicas (fúngicas e bacterianas), bem como análise dos fatores de virulência dos microorganismos encontrados. Em relação as análises fúngicas, serão realizadas: 1. análise do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Candida* spp de forma semiquantitativa, de acordo como número de colônias exibidas em meio sólido CHROMagar *Candida*® em placa Petri e identificação definitiva através do API System. 2. análise dos fatores de virulência de *Candida* spp.: formação de biofilme através do XTT e microscopia confocal, atividade de fosfolipase, atividade de protease e susceptibilidade ao Fluconazol. Quanto as análises bacterianas, serão realizadas: 1. análise do perfil total de bactéria (microbioma) através da extração de DNA. 2. avaliação da incidência e perfis de resistência e virulência de *Staphylococcus* sp, sendo que os genes de virulência serão submetidos a teste estatísticos para comparação entre grupos e correlação de variáveis clínicas e laboratoriais.

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



Continuação do Parecer: 1.722.126

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- idade entre 03 e 12 anos; - tempo mínimo de internação de 48 horas; - presença do responsável legal quando da realização do exame.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Serão excluídos da pesquisa os pacientes que apresentarem situação clínica muito grave/instável, impossibilitando a realização do exame clínico, bem como aqueles internados para a realização de cirurgia eletiva.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: O objetivo será determinar a presença das alterações bucais e o perfil microbiológico da cavidade bucal de crianças de 03 a 12 anos, internadas em dois Hospitais Pediátricos de referência no município do Rio de Janeiro (Instituto Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira - IPPMG - e Hospital Municipal Jesus).

Objetivo Secundário: 1. Identificar a presença de lesões orais de tecidos moles e prevalência de cárie, em crianças hospitalizadas, comparando com crianças não hospitalizadas. 2. Determinar as necessidades de tratamento odontológico nesse grupo de pacientes. 3. Verificar a existência de cuidados adotados pela equipe de saúde com relação à saúde bucal das crianças hospitalizadas. 4. Determinar o perfil microbiológico (fúngico e bacteriano) da cavidade bucal destes pacientes. 5. Determinar a relação entre os achados clínicos e microbiológicos com a história médica dos pacientes (diagnóstico, motivo de internação, tempo de internação, episódios de internação). 6. Analisar, in vitro, os fatores de virulência e susceptibilidade ao Fluconazol das *Candida spp* encontradas nos pacientes hospitalizados, comparando com a expressão desses fatores dos isolados do grupo controle. 7. Analisar a incidência de isolamento de *S. aureus*, *S. epidermidis* e em outras espécies *Staphylococcus coagulase-negativas* no biofilme dental e saliva de crianças hospitalizadas, através de PCR. 8. Caracterizar as cepas de *Staphylococcus metilicina resistentes*, através do gene *mecA*. 9. Mapear 25 genes acessórios (de virulência) nessas amostras através de PCR multiplex.

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



Continuação do Parecer: 1.722.126

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a Pesquisadora:

"Riscos: Os riscos relacionados a esta pesquisa são a possibilidade de constrangimento, ficar sem graça com relação às questões da ficha clínica, sendo assim poderá se recusar a responder as perguntas sem nenhum prejuízo ou sentir algum desconforto durante a realização do exame clínico. Benefícios: Os pacientes e responsáveis receberão orientações quanto aos cuidados de higiene e saúde bucal. Pacientes com necessidade de tratamento odontológico serão encaminhados a clínica de pacientes especiais da FO, UFRJ, onde será matriculados e terão garantido o direito ao tratamento. Como benefício indireto por participar deste estudo, o participante poderá contribuir para estabelecer medidas necessárias para a manutenção de saúde bucal em ambiente hospitalar. Adicionalmente, contribuirá para o levantamento de aspectos importantes para a melhora da qualidade de vida da criança hospitalizada, uma vez que a condição bucal do paciente pode influenciar no seu estado de saúde geral."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de análise da emenda 01.

HISTÓRICO

17/05/2016 - Parecer de aprovação.

EMENDA 01

11/08/2016 - no documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_735119_E1", na página 9 de 9, item justificativa da emenda, lê-se: "O presente projeto "Alterações bucais e perfil microbiológico de pacientes pediátricos hospitalizados", cuja pesquisadora principal é Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro, CAAE: 54723716.2.0000.5257, enviado ao CEP/HUCFF em 30/03/2016 e aprovado em 19/05/2016, tem como instituições coparticipantes o IPPMG e o Hospital Municipal Jesus. Assim que o projeto foi aprovado pelo CEP/HUCFF, foi diretamente encaminhado ao CEP da Secretaria Municipal do Rio de Janeiro, via Plataforma Brasil, e foi aprovado em 30/06/2016. Entretanto, ainda não tinha sido encaminhado ao CEP/IPPMG. Dessa forma, fez-se a inclusão do CNPJ do IPPMG no projeto, uma vez que o mesmo não estava constando nos dados da Plataforma Brasil (o que ocorrera com o CNPJ do Hospital Municipal Jesus) a fim de que o projeto seja encaminhado ao CEP do IPPMG para sua avaliação"

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



Continuação do Parecer: 1.722.126

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontrados óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

a. De acordo com o item X.1.3.b, da Resolução CNS n.º 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais que permitam ao Cep acompanhar o desenvolvimento dos projetos. Esses relatórios devem conter informações detalhadas nos moldes do relatório final contido no Ofício Circular n. 062/2011: <http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/arquivos/conep/relatorio_final_encerramento.pdf>

b. Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_735119_E1.pdf	11/08/2016 19:40:42		Aceito
Outros	justificativa_da_emenda.docx	11/08/2016 19:22:44	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Pac_Hospitalizados_versao_revisada_CEP.doc	05/05/2016 22:50:18	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
Outros	Conclusoes_ou_Pendencias_e_Listas_de_Inadequacoes.doc	05/05/2016 22:46:47	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_infraestrutura.pdf	05/05/2016 22:45:35	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
TCLE / Termos de	Termo_de_assentimento_02.doc	05/05/2016	Gloria Fernanda	Aceito

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



Continuação do Parecer: 1.722.126

Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_assentimento_02.doc	22:44:04	Barbosa de Araújo Castro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_02.doc	05/05/2016 22:28:45	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
Outros	Carta_de_apresentacao_editavel.doc	30/03/2016 19:23:08	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
Outros	Carta_de_apresentacao.pdf	30/03/2016 19:22:37	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
Outros	Relacao_dos_documentos_anexados.doc	30/03/2016 19:20:46	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
Outros	Folha_de_Rosto_editavel.pdf	30/03/2016 19:19:42	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	30/03/2016 19:18:24	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
Outros	Encaminhamento.pdf	21/03/2016 18:02:51	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
Outros	Curriculo_lattes_pesquisadores.doc	15/03/2016 11:24:06	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia_institucional_IPPM G_HMJ.pdf	12/03/2016 11:33:11	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_PacientesHospitalizados.doc	12/03/2016 11:29:52	Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro	Aceito
Outros	Ficha_identificacao_exame_clinico.docx	30/11/2015 11:17:47	Amanda Vervloet Dutra Agostinho Assis	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br