DEBORA MOREIRA

Perfil fenotípico, diferenciação molecular, produção de enzimas e
sensibilidade aos antifúngicos de amostras de
leveduras isoladas em três grupos amostrais:
mulheres assintomáticas, com candidíase vulvovaginal
primária e recorrente

Tese apresentada ao Departamento de
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

SÃO PAULO
2012

DEBORA MOREIRA

Perfil fenotípico, diferenciação molecular, produção de enzimas e
sensibilidade aos antifúngicos de amostras de
leveduras isoladas em três grupos amostrais:
mulheres assintomáticas, com candidíase vulvovaginal
primária e recorrente

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora:

Prof^a. Dr.^a Claudete Rodrigues Paula

Versão original

SÃO PAULO
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Moreira, Debora.

Perfil fenotípico, diferenciação molecular, produção de enzimas e sensibilidade aos antifúngicos de amostras de leveduras isoladas em três grupos amostrais: mulheres assintomáticas, com candidíase vulvovaginal primária e recorrente / Debora Moreira. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Pro^{fa} Dra. Claudete Rodrigues Paula.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Candidíase vulvovaginal.

Versão do título para o inglês: Phenotypic profile, molecular differentiation, production of enzymes and antifungal susceptibility of yeasts isolated from samples in three sample groups: asymptomatic women with primary and recurrent vulvovaginal candidiasis.

Descritores: 1. Candidíase 2. *C. albicans* 3. Antifúngicos 4. Enzimas hidrolíticas 5. Reação em cadeia por polimerase 6. Eletroforese em gel I. Paula, Pro^{fa} Dra. Claudete Rodrigues II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB025/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Debora Moreira.

Título da Tese: Perfil fenotípico, diferenciação molecular, produção de enzimas e sensibilidade aos antifúngicos de amostras de leveduras isoladas em três grupos amostrais: mulheres assintomáticas, com candidíase vulvovaginal primária e recorrente.

Orientador(a): Profª Dra. Claudete Rodrigues Paula.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de setembro de 2009.

PARECER 919 /CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 24.09.2009 **APROVOU** o projeto intitulado: *"Candidíase vulvovaginal: Perfil fenotípico, genotípico, produção de proteinase (em meio sólido/liquido) e sensibilidade aos antifúngicos de amostras de leveduras isoladas como colonizantes e como agentes de candidíase vulvovaginal primária e recorrente"* sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula e a aluna Débora Moreira.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em
24.09.2010

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO MARINHO ANDRADE ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Feliz é aquele que teme ao Senhor...

E anda em seus caminhos

Salmos 128:1

Ao meu pai, *José Luiz*, e a minha mãe *Lourdes*,
Que sempre me apoiaram: Amo vocês.
Aos meus irmãos, *Joede* e *Damaris* e aos meus cunhados *Cláudio* e *Débora*,
Pelos momentos compartilhados,
Aos meus sobrinhos *Pedro*, *Felipe*, *Duda* e *Aninha*
que me fizeram ver que o valor da vida está nos pequenos gestos.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora **Prof^a. Dr.^a Claudete Rodrigues Paula** "*Teacher*": Por ser a minha grande incentivadora; por me deixar "Voar"; pelos dez anos de convivência; pela paciência; pelo companheirismo; pela transmissão de conhecimentos. Enfim, pela amizade e compreensão em todos os momentos.

A Deus, que me concedeu tudo o que tenho de mais precioso.

Ao Laboratório de Micologia, do Departamento de Microbiologia, pelo programa de Pós Graduação.

Ao Cnpq e à Fapesp, pelo auxílio financeiro.

Aos professores Dr. Valderes Gambale e Dr. Flavio Alterthun pelo convívio tão amável em nosso laboratório.

Ao Dr. Luiz Jorge Fagundes, da Faculdade de Saúde Pública e a Bióloga Fátima, pelo apoio, nas coletas.

A especialista em Microbiologia Maria José (minha atual "chefa"), pelos conhecimentos transmitidos, durante a realização das coletas e pela convivência harmoniosa, na Controlbio e aos meus colegas de trabalho.

Ao Prof. Dr. Arnaldo César Colombo, por permitir a realização de experimentos, em seu laboratório e a todos os alunos, em especial, a Angela e a Karina.

A pesquisadora Dr^a Walderez Szeszs e Dr^a Marcia de Souza Carvalho Melhem, pesquisadoras do Instituto Adolfo Lutz, que tanto contribuíram para esse estudo.

Aos meus amigos Fábio, Anita, Sandra e Elza... quem tem amigos, tem tudo....

A minha amiga Vanessa, pelo apoio, e aos amigos do Laboratório de Micologia, a Elizângela, ao Prof. Dr. Marcos Auler, Prof^a Dr^a Amanda, Ériques, Luciana "Lu", Diana, Bruno, Georgea e Satiko, pelos momentos compartilhados. Às estagiárias Luciana, Ana Luiza e Diana, que fizeram parte desse trabalho.

Aos funcionários da Esterilização. À secretaria da Pós Graduação e aos funcionários da biblioteca do ICB, que me auxiliaram na revisão da tese.

Afinal, agradeço a todos que me apoiaram em algum momento da minha vida e que contribuíram para a realização de mais um sonho.

RESUMO

Moreira, D. **Perfil fenotípico, diferenciação molecular, produção de enzimas e sensibilidade aos antifúngicos de amostras de leveduras isoladas em três grupos amostrais: mulheres assintomáticas, com candidíase vulvovaginal primária e recorrente.** 155 f. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O presente estudo foi realizado com 258 mulheres, com e sem sintomas de candidíase vulvovaginal, atendidas no Centro de Saúde “Geraldo Paula Souza”, da Faculdade de Saúde Pública da USP. Leveduras foram isoladas em 162 mulheres, sendo que 34% foram de mulheres assintomáticas, 34% com sintomas de candidíase vulvovaginal primária (CVV) e 32% com candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR). As espécies mais isoladas foram *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Espécies como *C. metapsilosis* e *C. haemulonii* também foram encontradas. A produção de proteinase foi vista em 88% das amostras e de fosfolipase foi de 39%. A sensibilidade “in vitro” aos antifúngicos foi realizada pelo “Etest” e, nos isolados resistentes a anfotericina B, fluconazol e itraconazol foram realizados ensaios de microdiluição (CLSIM27S3) e EUCAST EDef7.1, que confirmaram a diminuição da sensibilidade ao itraconazol em isolados de *C. parapsilosis* (1); *C. guilliermondii* (1), *C. glabrata* (3) e *Trichosporon* spp (1). A diminuição da sensibilidade ao fluconazol foi observada em isolados de *C. parapsilosis* (1), *C. glabrata* (3), *C. krusei* e *Rhodotorula* spp (1). As leveduras do grupo das CVVRs foram as que apresentaram menor sensibilidade. Em 61 isolados de várias espécies foi realizada a cariotipagem em campo pulsado (PFGE) e não foram observadas similaridade entre elas. Os dados obtidos reforçam a importância da realização de exames laboratoriais que permitam identificar as espécies presentes no conteúdo vaginal, de modo a nortear a escolha terapêutica.

Palavras chaves: Candidíase. *C. albicans*. Antifúngicos. Enzimas hidrolíticas. Reação em cadeia por polimerase. Eletroforese em gel (PFGE)

ABSTRACT

Moreira, D. **Phenotypic profile, molecular differentiation, production of enzymes and antifungal susceptibility of yeasts isolated from samples in three sample groups: asymptomatic women with primary and recurrent vulvovaginal candidiasis.** 155 p. 2012. Master thesis (Microbiology). Instituto de Ciencias Biomedicas [Biomedical Sciences Institute], Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

This study was conducted with 258 women, with and without symptoms of vulvovaginal candidiasis, seen at the Health Center "Geraldo Paula Souza", School of Public Health of USP. Yeasts were isolated in 162 women, 34% of women were asymptomatic, 34% with primary symptoms of vulvovaginal candidiasis (VVC) and 32% with recurrent vulvovaginal candidiasis (CVVR). The species were more isolated *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*. Species such as *C. metapsilosis* and *C. haemulonii* were also found. The production of proteinase was seen in 88% of the samples and phospholipase was 39%. Sensitivity "in vitro" Antifungal was by the "Etest" and in isolates resistant to amphotericin B, fluconazole and itraconazole microdilution tests were performed (CLSIM27S3) and EUCAST EDef7.1, which confirmed the decreased sensitivity to itraconazole in isolates *C. parapsilosis* (1), *C. guilliermondii* (1), *C. glabrata* (3) and *Trichosporon* spp (1). The decreased sensitivity to fluconazole was observed in isolates of *C. parapsilosis* (1), *C. glabrata* (3), *C. krusei* and *Rhodotorula* spp (1). Yeasts of the group CVVRs were those who had lowest sensitivity. In 61 isolated from various species karyotyping was performed pulsed field (PFGE) and there were no similarity between them. The data emphasize the importance of laboratory tests to identify the species present in the vaginal content in order to guide the therapeutic choice.

Key works: Candidiasis. *C. albicans*. Antifungal. Hydrolytic enzymes. Polymerase chain reaction. Gel electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Expressão de SAPS e a função fisiológica associada a cada um dos genes	28
Figura 2: Localização das regiões ITS 1 e ITS	37
Figura 3: Variação de Idade, por grupo amostra	64
Figura 4: Cultivo de <i>Candida albicans</i> em CHROMagar	65
Figura 5: Cultivo de <i>C. dubliniensis</i> em CHROMagar	66
Figura 6: Cultivo de <i>C. tropicalis</i> , em	66
Figura 7: Cultivo de <i>C. parapsilosis</i> em CHROMagar	66
Figura 8: Cultivo de <i>C. glabrata</i> em CHROMagar	67
Figura 9: Cultivo de <i>Candida albicans</i> em ágar Sabouraud dextrose	67
Figura 10: Cultura de <i>Rhodotorula</i> spp em ágar Sabouraud dextrose	67
Figura 11: Microcultivo em lâmina de <i>C. albicans</i>	68
Figura 12: Microcultivo em lâmina de <i>C. haemuulonii</i>	68
Figura 13: Microcultivo em lâmina de <i>C. glabrata</i>	68
Figura 14: Microcultivo em lâmina de <i>C. parapsilosis</i>	69
Figura 15: Microcultivo em lâmina de <i>C. tropicalis</i>	69
Figura 16: Bandas exibidas por <i>Candida</i> spp em gel de agarose	76
Figura 17: Alinhamento dos nucleotídeos, gerados no Blast	79
Figura 18: Frequência de leveduras isoladas da região vulvovaginal, identificadas através de provas fisiológicas e sequenciamento	79
Figura 19: Frequência de leveduras, por grupo amostral	80
Figura 20: Índice de proteinase em todas as amostras	81
Figura 21: Comparação da produção de proteinase, por grupo amostral	83
Figura 22: Produção de proteinase por espécies pertencente ao grupo das assintomáticas	84
Figura 23: Produção de proteinase por espécies pertencente ao grupo das CVV	84
Figura 24: Produção de proteinase por espécies pertencente ao grupo das CVVRs	85
Figura 25: Índice geral de produção de fosfolipase pelas espécies de leveduras	86
Figura 26: Comparação da produção de fosfolipase, pelos grupos amostrais	88
Figura 26: Perfil cromossômico de diferentes isolados de <i>Candida</i> spp, através do PFGE em gel de agarose a 0,8%	96
Figura 27: Dendograma dos isolados de <i>Candida glabrata</i> , a partir das bandas eletroforéticas	97
Figura 28: Dendograma dos isolados de <i>Candida kefyr</i> , a partir das bandas eletroforéticas	97
Figura 29: Dendograma dos isolados de <i>Candida tropicalis</i> , a partir das bandas eletroforéticas	97
Figura 30: Dendograma dos isolados de <i>Candida albicans</i> , a partir das bandas eletroforéticas	98

Figura 31: Dendograma dos isolados de *Candida parapsilosis*, a partir das bandas eletroforéticas

99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características bioquímicas das Saps	25
Tabela 2: Diferenças entre os métodos CLSI M27S3 e o Eucast EDef7.1	43
Tabela 3: Atividade enzimática (proteínase e fosfolipase) conforme o PZ e o código	54
Tabela 4: Interpretação do comportamento de cepas de <i>Candida</i> spp frente à concentração dos antifúngicos (µg/mL), segundo documentos CLSI M27S3	56
Tabela 5: Desempenho da coloração do esfregaço pelo método de Gram, em relação a cultura, para a confirmação do diagnóstico de <i>Candida</i> spp	63
Tabela 6: Avaliação da cultura, em relação a coloração do esfregaço pelo Gram, para diagnóstico de candidíase vulvovaginal	63
Tabela 7: Relação de concordância entre os métodos convencionais e CHROMagar de para a confirmação da espécie de levedura	70
Tabela 8: Perfil fisiológico de amostras identificadas como <i>Candida</i> spp não classificadas pelos métodos de identificação tradicional	72
Tabela 9: Características fenotípicas semelhantes de <i>C. dubliniensis</i>	74
Tabela 10: Identificação de através de provas fisiológicas e características apresentadas em meio cromogênico	74
Tabela 11: Resultado do sequenciamento das amostras	78
Tabela 12: Produção de proteinase, por espécie de levedura	82
Tabela 13: Produção de fosfolipase, por índice e por espécie	86
Tabela 14: Valores de CIM apresentados amostras de leveduras pelo método do Etest	89
Tabela 15: Variação de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ , sensibilidade e resistência de isolados de leveduras	90
Tabela 16: Comparação dos resultados obtidos pelo “Etest” com os demais métodos para a anfotericina B	91
Tabela 17: Perfil de SDD e R ao itraconazol das 29 amostras frente aos três métodos de antifungograma	92
Tabela 18: Perfil de sensibilidade dose dependente e resistência ao fluconazol das 12 amostras frente aos três métodos	94
Tabela 19: Perfil das amostras que apresentaram resistência ou sensibilidade dose dependente, através do método de referência: CLSIM27S3	95
Tabela 20: Informações gerais sobre as espécies e o PFGE	99

SUMÁRIO

1.1 Leveduras do gênero <i>Candida</i> spp	18
1.2 Presença de <i>Candida</i> no conteúdo vaginal	18
1.3 Fatores predisponentes a colonização do trato genital e ao desenvolvimento de infecção	20
1.4 Fatores relacionados à virulência das leveduras	22
1.5 Espécies de <i>Candida</i> spp envolvidas na candidíase vulvovaginal	29
1.6 Sinais e sintomas clínicos de CVV	33
1.7 Diagnóstico Laboratorial	34
1.7.1 Identificação Tradicional	34
1.7.2 Métodos moleculares de diagnóstico de CV	35
1.7.2.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e sequenciamento	36
1.8 Tratamento da CVV	39
1.9 Testes de Susceptibilidade	41
2.0 Objetivos	45
2.1 Objetivos Gerais	46
2.2 Hipóteses a serem testadas	46
3 Material e métodos	47
3.1 Mulheres que participaram do estudo	48
3.1.1 Coleta do material vaginal	48
3.2 Definições dos grupos	48
3.3 Isolamento e condições de crescimento	49
3.3.1 Diferenciação entre <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	49
3.3.1.1 Diferenciação em "CHROMagar <i>Candida</i> ®"	49
3.3.1.2 Crescimento a 45 °C	50
3.3.1.3 Caldo Sabouraud hipertônico	50
3.3.1.4 Diferenciação molecular das amostras sugestivas de <i>C. dubliniensis</i>	50
3.3.2 Diferenciação das amostras de leveduras pertencentes ao complexo <i>C. parapsilosis</i> strictu sensu	51
3.3.3 Identificação das leveduras que não foram identificadas pelas provas fisiológicas: <i>Candida</i> spp	51
3.4 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e Sequenciamento	51
3.4.1 Extração de DNA das Leveduras	51
3.4.2 Amplificação.	52
3.4.3 Sequenciamento	53
3.5 Determinação dos fatores relacionados a virulência	53
3.5.1 Pesquisa de Proteínase (Sap`s)	53
3.5.2 Pesquisa da Fosfolipase	54
3.6 Determinação dos Perfis de Sensibilidade e de Resistência “in vitro” às Drogas Antifúngicas	55
3.6.1 “Etest	55
3.6.2 Microdiluição	56
3.6.2.1 CLSI M27S3	56
3.6.2.2 EUCAST EDef 7.1	58
3.7 Cariotipagem através da técnica Eletroforese em Campo Pulsado (Pfge)	58
3.7.1 Extração de DNA	58
3.7.2 Corrida Eletroforética	59
3.8 Análise Estatística	60
4 Resultados	61

4.1 Mulheres que participaram do estudo	62
<i>4.1.1 Coleta de material vaginal</i>	62
<i>4.1.1.1 Coloração do esfregaço pelo método de Gram e cultura</i>	62
4.2 Definições de grupos amostrais	64
4.3 Identificação morfológica dos isolados de <i>Candida</i> spp	65
<i>4.3.1 Características Fenotípicas</i>	65
<i>4.3.1.2 Identificação de <i>Trichosporon</i> spp</i>	65
<i>4.3.2 Características Fisiológicas</i>	70
<i>4.3.2.1 Diferenciação de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i></i>	70
<i>4.3.2.2 Complexo <i>C. parapsilosis</i> strictu sensu</i>	71
4.4 PCR e Sequenciamento das <i>Candida</i> spp Seleccionadas para os Estudos Moleculares	75
<i>4.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	75
<i>4.4.2 Amplificação da Região ITS pela Reação em Cadeia por Polimerase (PCR)</i>	75
4.5 Sequenciamento dos Produtos da PCR	76
4.6 Identificação das leveduras	77
<i>4.6.1 Correlação Entre as Espécies e os grupos de Mulheres Assintomáticas, com CVV e com CVVR</i>	80
4.7 Produção de Exoenzimas	81
<i>4.7.1 Proteinase</i>	81
<i>4.7.2 Correlação entre proteinase e o grupo amostral</i>	83
<i>4.7.3 Correlação entre a produção de proteinase, as espécies e os grupos amostrais</i>	83
4.8 Fosfolipase	85
4.8.1 Correlação entre a produção de fosfolipase, as espécies e os grupos amostrais	87
4.9 Sensibilidade aos antifúngicos	88
<i>4.9.1 “Etest”</i>	88
<i>4.9.2 Microdiluição (Eucast Edef7.1 e CLSI)</i>	91
<i>4.9.3 Resistência a anfotericina B</i>	91
<i>4.9.4 Resistência ao itraconazol</i>	92
<i>4.9.5 Resistência ao fluconazol</i>	92
4.10 Perfil genotípico	95
<i>4.10.1 Tipagem molecular das leveduras isoladas</i>	95
<i>4.10.2 Estimativa do peso molecular das bandas de <i>Candida</i> Spp</i>	96
5 Discussão	101
6 Conclusão.	125
7 Referência	127
Anexos	150
Anexo A: Protocolo de Avaliação Clínica	151
Anexo B: Avaliação Laboratorial	152
Anexo C: Termo de consentimento	153

1 Introdução

1.1 Leveduras do gênero *Candida Spp*

As leveduras do gênero *Candida* estão normalmente presentes como células individuais que se replicam de forma assexual por blastoporação ou por gemulação (SCHULZE; SONNENBORN, 2009).

Candida albicans é uma levedura polimórfica com oito pares de cromossomos. Pode se aeróbica ou pode se replicar em condições microaerófila, como quando presente no cólon humano. Entre as 314 espécies conhecidas, cerca de doze são consideradas como patogênicas para o homem. Uma das razões para que o número de espécies patogênicas seja limitado é que dois terços das leveduras são incapazes de crescer a 37 °C (SCHULZE; SONNENBORN, 2009).

As leveduras são classificadas como patógenos oportunistas. Por exemplo, quando ocorre mudanças na composição da microbiota do trato gastrointestinal por ação dos antimicrobianos ou deficiência de parâmetros específicos do sistema imunológico, podem favorecer a transformação da levedura da forma comensal para a forma patogênica. Esses danos podem se manifestar em dois níveis: infecções superficiais, da pele, membranas mucosas ou epitélios; e penetração invasiva dos tecidos, com distribuição ao sangue e disseminação para vários órgãos (SCHULZE; SONNENBORN, 2009).

1.2 Presença de *Candida* no conteúdo vaginal

A presença de *Candida spp* na mucosa vaginal, na ausência de sinais e sintomas de doença indica que há a colonização assintomática (ACHKAR; FRIES, 2010). Estudos indicam que cerca de 20 a 30% das mulheres saudáveis são portadoras assintomáticas de leveduras (BEIGI et al., 2004; GUZEL et al., 2011).

Esta colonização pode estar associada a diferentes fontes como: propagação local do trato gastrointestinal e do períneo, pela introdução digital e por transmissão sexual (NYIRJESY, 2008).

Logo após o nascimento, inicia-se a colonização do trato gastrointestinal, com micro-organismos que irão compor a chamada microbiota também chamada de

“microflora intestinal”. Mais de 99% da microbiota é composta por bactérias. Em adição, as espécies de *Candida* podem ser detectadas no trato gastrointestinal de aproximadamente 96% dos neonatos, no primeiro mês de vida. O processo de constituição da microbiota é completo entre três e cinco anos, e cada indivíduo apresenta uma microbiota compatível com o seu sistema imunológico (SCHULZE; SONNENBORN, 2009).

Durante o crescimento dentro do trato gastrointestinal, o organismo se adapta às condições de pH, oxigênio, fontes de carbono e a presença de receptores de superfície que lhes permite otimizar a expressão de genes em um ambiente particular. Com esses mecanismos, as leveduras do gênero *Candida* são capazes de colonizar o trato gastrointestinal na infância, estabelecendo, assim, um dos nichos naturais mais importantes (ROSENBACH et al., 2010). Essa colonização intestinal pode favorecer a migração da levedura para a região vulvovaginal.

White et al. (2007) sugerem que durante a colonização o tamanho da população de micro-organismos reflete um equilíbrio entre as forças externas que limitam a população, como os efeitos do sistema imune do hospedeiro e, fatores intrínsecos, como a capacidade do micro-organismo em aumentar de número. Na fase adulta, cerca de 70% dos indivíduos apresentam colonização por fungos, sendo muitos desses do gênero *Candida*.

A microbiota normal pode estimular os receptores “toll-likes” e essas interações são importantes para a regulação da resposta inflamatória. Na ausência dos receptores “toll likes”, pode ocorrer um desequilíbrio da resposta inflamatória, o que pode causar danos aos hospedeiro.

Além disso, as leveduras possuem a capacidade de regular o crescimento de sua população, através da expressão de reguladores que parecem ser fatores que podem auxiliar na manutenção do equilíbrio entre a colonização e o desenvolvimento da doença.

A expressão de genes em células colonizadas mostra padrões distintos de células provenientes de laboratório. Essa expressão é semelhante a apresentada pelas células que estão na fase estacionária do crescimento. Nessa fase, os genes expressos tem a capacidade de conferir resistência ao “stress” oxidativo e possuem a capacidade

de manter o crescimento do micro-organismo em condições nutricionais desfavoráveis (ROSENBACH et al., 2010).

Além desses, alguns clones de *C. albicans* podem expressar genes característicos da fase exponencial. Isto pode ser resultante da existência de várias subpopulações de células, em diferente estado fisiológico (ROSENBACH et al., 2010).

A combinação deste estado fisiológico dessas células com a capacidade da célula crescer rapidamente e a resistência ao estresse, pode produzir um mecanismo fisiológico que se adapte a colonização ao hospedeiro.

Outra fonte de infecção importante é a transmissão sexual. Através de estudos “in vitro”, Southern et al. (2008) demonstraram que há uma aparente facilidade de *Candida spp* se aderir às células epiteliais e aos fibroblastos. No entanto, a secreção de muco, pelas células epiteliais endocervicais pode conferir uma proteção contra essa colonização. Porém, quando há o aparecimento de microlesões na superfície celular, o epitélio é exposto o que favorece a adesão das leveduras à mucosa vaginal. As microlesões são comumente encontradas em mulheres jovens, com o início da atividade sexual.

1.3 Fatores predisponentes a colonização do trato genital e ao desenvolvimento de infecção

Há vários fatores que podem ser considerados predisponentes a colonização da mucosa vaginal por *Candida spp*. Um desses seria o fator genético. Em um estudo realizado com modelo animal, Calderon et al. (2003) perceberam que diferentes linhagens de camundongos reagem a diferentes formas à colonização por *Candida spp*, indicando que existem alguns fatores, ainda não bem esclarecidos que envolvem a colonização. Alguns estudos recentes demonstram que a deficiência da expressão de lectina nas células dos hospedeiros podem favorecer a colonização por *Candida spp*.

A elevação dos níveis de estrógeno pode ser considerada como outro fator importante para o aumento da colonização por *Candida*. Esta condição pode ser observada em mulheres portadoras de “*diabetes mellitus*” (PIROTTA; GARKABD, 2006) e durante a gestação, os estudos indicam que entre 10 e 50% das mulheres grávidas podem ser colonizadas por leveduras. Outro fator que pode favorecer a colonização por

Candida spp é o uso de contraceptivos orais a base de estrógeno. Esses fatores podem resultar no aumento dos níveis de glicogênio circulante, favorecendo, assim, a colonização (GUZEL et al., 2011).

Após a colonização, as leveduras podem permanecer durante longo período sem produzir sintomas. Para Cassone et al. (2007), essa permanência da levedura sobre a superfície da mucosa não passa despercebida pelo sistema imunológico e nem é simplesmente tolerada pelo hospedeiro. Para ele, há mecanismos da resposta imune inata e humoral que conseguem restringir o crescimento do fungo e neutralizar a sua virulência.

Porém, quando esses mecanismos falham ocorre o desenvolvimento de candidíase vulvovaginal (CVV). Dados mostram que 75% das mulheres em idade fértil apresentam pelo menos um episódio de candidíase ao longo da vida e, aproximadamente 5% das mulheres apresentam episódios freqüentes e refratários, com mais de quatro episódios ao ano (ACHKAR; FRIES, 2010; SOBEL, 2007).

Diversos estudos têm sido realizados no sentido de esclarecer quais são as causas e como ocorre a transformação da levedura da forma comensal para a patogênica. De acordo com Sobel (2007) estes eventos são multifatoriais e envolve fatores relacionados ao hospedeiro e aos micro-organismos.

Para Martinez et al. (2009) o desenvolvimento de candidíase vulvovaginal (CVV) é resultante de um aumento exagerado no número de *Candida spp*. As causas para esse super crescimento seria o uso de antibacterianos e de duchas vaginais (CHENG et al., 2010) que poderiam levar a diminuição do número de lactobacilos.

Os lactobacilos estão presentes na vagina de mulheres em idade fértil e sua função é prevenir o aumento no número de patógenos através da produção de ácidos, bacteriocinas, bioessulfactantes, peróxido de hidrogênio e moléculas coagregativas. Os lactobacilos e as leveduras podem ser encontradas na vagina de mulheres saudáveis. Contudo, a diminuição dos lactobacilos proporciona um super crescimento das leveduras. e essas são capazes de destruir as células epiteliais por invasão direta e causar a liberação de substâncias como as prostaglandinas e bradisininas que levam a inflamação vulvovaginal (vaginítes). Esta invasão pode estar associada a capacidade

das leveduras em produzir enzimas extracélulares, como proteases e fosfolipases (MARTINEZ et al., 2009).

Beigi et al. (2004) sugerem que vários fatores relacionados aos hospedeiros como portadores de HIV, com diabetes, que fazem uso de contraceptivos orais e o uso recente de antimicrobianos favorecem essa transformação (MASHBURN, 2006). Em mulheres que apresentam atopia ao contato com produtos químicos, alergia local ou reações de hipersensibilidade o meio vaginal pode ser alterado, facilitando a transformação do estado de colonização para vaginite sintomática (SHAH et al., 2006).

1.4 Fatores relacionados à virulência das leveduras

As leveduras patogênicas podem codificar genes que são específicos para a patogenicidade e outras propriedades importantes no processo de infecção. Esses fatores incluem adesinas, que mediam a ligação da levedura à superfície celular, como os fatores de agregação ao epitélio e endotélio, que incluem as proteínases aspárticas secretadas, as fosfolipases e as lipases.

O primeiro passo para que ocorra a infecção é a interação com as células hospedeiras. As leveduras do gênero *Candida* são capazes de expressar várias adesinas, com capacidade de quebrar as proteínas da matriz extracélular das mucosas e das células endoteliais (SUNDSTROM, 2002).

As proteínas que mediam a aderência e a invasão de *Candida spp* as células hospedeiras tem sido foco de numerosas investigações.

Os genes da família de sequências tipo aglutinina (Als) são adesinas amplamente estudadas em *C. albicans*. Estas adesinas são codificadas por uma família de genes ALS composta de nove integrantes distintos presentes no genoma de *C. albicans*.

As proteínas ALS têm três diferentes domínios. O primeiro é N terminal, constituído por aproximadamente 433 aminoácidos que, provavelmente estão relacionados com a função adesiva. A região central de domínio consiste em regiões repetitivas com essa sequência de aminoácidos. O domínio C terminal varia de

comprimento e, apresenta sequências variadas, mas, todas as proteínas desta região estão fortemente ligadas por carboidratos com a região N terminal (ZHAO et al., 2004)

Em cada proteína Als madura, há uma região N terminal em uma região chamada de T, que apresenta um domínio variável denominado de TR (FRANK et al., 2010). Por exemplo, Filler 2006 descreve que Als1p e Als3 mediam a aderência às células epiteliais da mucosa oral e às células do endotélio vascular. Als5p5 liga-se à matriz extracelular (FILLER, 2006).

Em *C. glabrata*, o maior grupo de adesinas é codificado pela família de genes EPA (adesinas epiteliais). A estrutura dessas proteínas é semelhante a das ALS, de *C. albicans*, contudo, a diferença entre elas está no fato de que a expressão gênica da EPA é governada por silenciadores subteloméricos, enquanto a expressão de ALS é governada por outros mecanismos (FRANK et al., 2010).

Outra importante adesina de *Candida spp* é a Hwp1 (proteína 1 de parede de hifa), encontrada exclusivamente na superfície do tubo germinativo e que regula ligações fortes das leveduras às células hospedeiras. Estudo realizado por Naglik et al., com amostras provenientes de mulheres portadoras assintomáticas e sintomáticas de leveduras, mostrou que a expressão de Hwp1 estava presente em ambos os casos. Nas mulheres que foram utilizadas como controle negativo, a Hwp1 não foi detectada. Esse fato sugere que a função dessa adesina pode estar relacionada ao processo de adesão do micro-organismo ao tecido do hospedeiro (NAGLIK et al., 2006).

Um grande número de proteínas de matriz extracelular (ECM) são expressas por *C. albicans*, como as de colágenos tipo um e quatro, lamininas, fibrinogênio, fibronectinas e elastinas. Essas proteínas contribuem para a virulência da levedura pois formam uma complexa rede proteica que fornece múltiplos sítios para fixação do micro-organismo, aumentando assim, a eficácia da interação célula com célula e matriz célula (CHAFIN, 2008).

Dentre essas funções de virulência estão a produção de enzimas que facilitam a hidrólise das membranas celulares dos hospedeiros, favorecem a adesão e invasão do tecido, ou causam danos as células e moléculas do sistema de defesa do hospedeiro (NAGLIK et al., 2003a).

A família de genes SAP é a melhor caracterizada em termos de padrões de expressão, durante a infecção por *Candida spp.* Dependendo da situação, diferentes genes são expressos e exercem papel fundamental na invasão dos tecidos e órgãos (NAGLIK 2003a, 2008; SCHULZE; SONNENBORN, 2009).

As proteinases são classificadas com base em seu mecanismo catalítico e não de acordo com a origem, sítio anatômico, tipo de substrato ou função fisiológica. Classicamente, as proteinases foram distinguidas em quatro classes, que são serino protease, cisteína, metaloprotease e aspartil proteinase.

A atividade proteolítica de *C. albicans* está relacionada com uma família de 10 proteinases aspárticas (Sap), com peso molecular que varia de 35 a 50kDa codificadas, pelos genes SAP1-10 (NAGLIK et al., 2003b; CHAFFIN, 2008; DABAS; MORCHHÄUSER, 2008). Saps 1-8 são liberadas para o meio extracelular e as Saps 9 e 10 são consideradas proteínas de superfície (WILLIAMS; LEWIS, 2011). Através de análise filogenética observou-se que os produtos da Sap1 a Sap3 e Sap4 e Sap6 são aproximadamente 67 e 89% idênticos, respectivamente (CHAFFIN, 2008).

As proteinases Saps foram purificadas e caracterizadas através de sobrenadantes de cultura de células crescidas em meio contendo albumina bovina (BSA) em pH 5. Contudo, na literatura, há trabalhos que relatam a utilização de vários meios de cultura para a expressão das Saps (WHITE; AGABIAN, 1995). Em meio contendo nitrogênio como única fonte de proteína, ocorre uma perda significativa de Sap2, Sap4 e Sap6, contudo, a deleção de Sap2 torna *C. albicans* incapaz de crescer em meio “Yeast Carbon Base” albumina bovina, que contém albumina bovina como única fonte de nitrogênio. Staib et al. (2002) suportam a ideia de que a capacidade de *C. albicans* utilizar nitrogênio pode ser importante para o crescimento da leveduras em certos nichos do hospedeiro. As características das Saps estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Características bioquímicas das Saps

Gene	Massa mol (kDa)	Atividade ótima de pH	Ponto isoeletrico	Referência
SAP1	38	3.2-4.5	4	Borg-von Zepelin et al. 1998
SAP2	40	3.2-3.5	4.25	Borg-von Zepelin et al. 1999
SAP3	41	3.2-3.5	5.7	Borg-von Zepelin et al. 2000
SAP4	40	5	ne	Borg-von Zepelin et al. 2001
SAP5	37	5	ne	Borg-von Zepelin et al. 2002
SAP6	40	5	ne	Borg-von Zepelin et al. 2003
SAP7	ne	ne	ne	Borg-von Zepelin et al. 2004
SAP8	41	ne	ne	Morrison et al. 1993
SAP9	ne	ne	ne	
SAP10	ne		ne	

ne: não encontrado. Técnica: SDS

Fonte: adaptado por Naglik et al. (2003a)

A atividade ótima de pH difere na expressão das Saps. A atividade ótima dessas enzimas é, em geral, em pH ácido. Este fato pode ser uma desvantagem em potencial, desde que os tecidos dos hospedeiros são mais neutros que ácidos. *Candida spp* é um comensal da vagina, com um pH ácido e da cavidade oral, que tem pH neutro. O pH normal do sangue é em torno de 7.4. Para compensar, há algumas respostas diferentes entre a expressão de Saps em resposta ao pH. A atividade de pH é entre 2 a 7. Sap1-3 tem atividade alta em valores de pH menor, de 3 a 5, enquanto Sap4-6 tem atividade entre pH 5 a 7 (CHAFFIN, 2008).

Todas as espécies de *Candida* secretam Saps, contudo, essa expressão pode variar de uma espécie para outra. As espécies de *Candida* consideradas mais patogênicas, como *C. albicans* (XU et al., 2005; SIKORA et al., 2011), *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* (SIKORA et al., 2011) têm maior expressão de Saps mas, de acordo com Trofa et al. (2008), a expressão de Saps em *C. parapsilosis* é menor do que em *C. albicans*, porém, não foi observado ausência de atividade das Saps em isolados clínicos incomuns, como *C. kefyr*, *C. guilliermondii* (NAGLIK et al., 2004) e *C. glabrata* (LIAN; LIU, 2007).

Vários trabalhos, realizados “in vitro”, demonstram que há padrões distintos da expressão de Saps, nas leveduras, nos diferentes estágios de infecção (NAGLIK et al., 2004). Em estudo realizado por Naglik et al. (2003b), o autor utilizou células epiteliais humanas provenientes da mucosa vaginal e infectou essas células com leveduras provenientes de 130 indivíduos portadores assintomáticos e com infecção por *Candida*

spp. O autor concluiu que, todos os membros da família Sap foram expressos durante a colonização e durante o período patogênico (desenvolvimento da doença); certos genes SAP podem ser papel mais expressivo durante a infecção.

A conclusão de que as Saps são expressas em portadores assintomáticos de leveduras é baseada em vários trabalhos. Ripeau et al. (2002) demonstraram que em modelo animal de candidíase orofaríngea, Sap1-6 e Sap9 foram detectadas continuamente, durante todo o processo de infecção. Para Cassone et al. (2002) em infecção gastrointestinal, Sap4 e 6 foram continuamente expressa, e que Saps2, 3 e 5 ocasionalmente foram detectadas. Conclusão similar chegou Felk et al. (2002), em infecção intraperitoneal. Esses dados indicam que a expressão e regulação dos genes SAPS depende do tipo e do estágio da infecção por *Candida spp* e que o pH e o substrato são de extrema importância para a expressão desses genes (NAGLIK et al., 2004).

O papel exercido pelas Saps “in vivo” tem sido objeto de vários estudos. Os meios de cultura utilizados, normalmente, favorecem a expressão da Sap2 e essa tem sido a mais estudada.

De acordo com Moschhäuser et al. (1997) a atividade da Sap2 está relacionada com a degradação de varias proteínas presentes na mucosa dos hospedeiros incluindo a queratina, o colágeno, a vimectina, a fibronectina, a laminina e a mucina. A eficiente remoção das barreiras dos hospedeiros poderia não somente melhorar o aporte nutricional para as células, como também poderia facilitar a adesão, colonização, penetração aos tecidos do hospedeiro e disseminação da *Candida spp* para o sistema circulatório (NAGLIK et al., 2004).

O papel exercido pela Sap2, na aderência, invasão e infecção pode ser confirmado pela adição de pepstatina A, em ensaios “in vitro”. A adição deste inibidor de protease leva uma inibição da digestão da mucina, indicando que as proteinases expressas pelas espécies de *Candida* podem degradar as proteínas de barreiras, presente nas mucosas (FALLON et al., 1997).

A primeira função atribuída as SAPS4-6 estavam relacionadas a formação de hifas, em valores de pH neutro (CHAFFIN, 2008; WHITE; AGABIAN, 1995;). Contudo, os estudos prosseguiram e, Hube et al. (1997) propuseram que a função desses genes

estaria relacionada às infecções sistêmicas e que essas SAPS não participariam da patogenicidade das infecções superficiais. Porém, Felk et al. (2002) propuseram que os genes SAP4-6 estavam envolvidos com a evasão do sistema imunológico.

A produção de Sap8 é regulada pela temperatura, sendo mais abundante a 25 °C do que a 37 °C, sugerindo que esses genes operam na transformação dos diferentes fenótipos de *Candida spp*, da fase opaca (O) para a fase branca (W).

Poucos estudos analisam a expressão de Sap8, Sap9 e Sap10, já que há evidências de que a secreção dessas enzimas ocorre de forma distinta, ou seja, elas não são enzimas extracelulares. A atividade de Sap9 e Sap10 parece estar relacionada com a regulação e manutenção da integridade da superfície celular (LIAN; LU, 2007). Xu et al. (2005) demonstraram que SAP10 parece estar relacionada com a aquisição de resistência ao fluconazol, por amostras de *Candida albicans*.

A análise da expressão das SAPS, em candidíase vulvovaginal tem sido estudada por vários autores. Em 1999, De Bernardis et al. observaram que a deleção de genes SAP2 pode diminuir totalmente o potencial de *C. albicans* de produzir infecções vaginais, em ratas. Ao inserir cepas mutantes de SAPS1,2 e 3, os autores observaram que os mutantes de SAPS 2 foram menos virulentos que os demais. Ao reinserir o gene, a patogenicidade retornou, demonstrando a importância desse gene, para patogenicidade. A quebra dos genes SAPS 1 e 3 foi menos danosa, do que a quebra dos genes SAP2.

De acordo com Naglik et al. (2003a), a expressão de SAP1, SAP3, SAP4. SAP7 e SAP8 estão mais relacionadas com doenças na mucosa oral, enquanto as SAP1, SAP4 e SAP6-8 estão associadas com infecção vaginal. Contudo, vários estudos têm demonstrado outros resultados. Na Figura 1 há a provável expressão dos genes SAPS com os estágios de infecção.

Lian e Liu (2007) analisaram a expressão de SAP1– SAP7, através da técnica de PCR transcriptase reversa (RT), de amostras de secreção vaginal, provenientes de mulheres portadoras assintomáticas e com quadros de vulvovaginites primária e recorrente. Neste estudo, os autores encontraram SAP2, SAP4-6 em todas as amostras; SAP7 foram predominantemente encontradas nas amostras de portadoras assintomáticas e SAP1 e SAP3 foram encontradas somente nas mulheres com quadros

de candidíase vulvovaginal, comprovando que, a expressão de genes SAP pode ser diferente durante o processo de colonização e da produção de doença. Resultado semelhante ao obtido por Naglik et al. (2003b). Em estudo realizado com mulheres portadoras assintomáticas e sintomáticas, os autores observaram que a expressão de SAP3 foi maior em mulheres sintomáticas do que em assintomáticas, indicando que a expressão de SAP3 poderia auxiliar na infecção por *Candida spp.*

Figura 1: Expressão de SAPS e a função fisiológica associada a cada um dos genes

Fonte: Adaptado de Naglik et al. (2004)

Em um estudo realizado por Ishiguro et al. (1992) os autores estudaram as características sorológicas de mulheres portadoras sintomáticas e assintomáticas. Os

autores observaram que o padrão de ligação contra os antígenos celulares e a frequência de detecção de antígenos não foi diferente nos dois grupos. Contudo, quando os autores testaram a atividade dos anticorpos contra a Saps purificadas, a partir de meio de cultura específico, a expressão de anticorpos IgG foi maior no grupo das sintomáticas do que nas assintomáticas, comprovando que as Saps podem estimular a produção de anticorpos. No grupo das assintomáticas, 18% expressaram anticorpos também. De acordo com os autores, esse fenômeno pode estar associado a presença de *Candida spp* em outros locais do corpo.

Outro grupo de enzimas hidrolíticas secretadas por *Candida spp* são as fosfolipases (PL) e sete genes distintos foram identificados e ligados a essa produção, sendo denominados de PLA, PLB1, PLB2, PLC1, PLC2, PLC3 e PLD1. Essas enzimas normalmente hidrolisam ligações ésteres dos fosfolipídios e, nos hospedeiros, podem auxiliar na degradação das membranas celulares, que pode levar a lise da celular. Este processo pode facilitar tanto a adesão das leveduras quanto a penetração da levedura aos tecidos (WILLIAMS; LEWIS, 2011). A expressão de fosfolipase, em meio utilizando-se gema de ovo é menor em *C. glabrata* do que em outras espécies de *Candida*. Em estudo realizado por Al-Rawi (1999), com noventa e oito isolados de *Candida glabrata*, provenientes de secreção vaginal, não produziram essa enzima.

A pouca expressão dos genes SAPS e PL em amostras de *C. glabrata* ser indicativo de uma menor virulência dessa espécie. Alternativamente, as amostras de *C. glabrata* parecem expressar as proteínas denominadas de YPS (yapsin like). As YPS são proteínas de superfície primariamente identificadas em *Saccharomyces cerevisiae* (KRYSAN et al., 2005).

1.5 Espécies de *Candida spp* envolvidas na candidíase vulvovaginal

A distribuição das leveduras do gênero *Candida*, identificadas em mulheres portadoras assintomáticas e sintomáticas, varia de acordo com a localização geográfica bem como, de acordo com a população estudada (ACHKAR; FRIES, 2010).

Normalmente, apenas uma espécie é encontrada em amostras de conteúdo vaginal. Contudo, aproximadamente de 2 a 5% das mulheres podem apresentar uma ou

mais espécies, no conteúdo vaginal. Geralmente, este fato está associado ao desenvolvimento de candidíase recorrente (FAN et al., 2008).

C. albicans é a espécie mais isolada em casos de vulvovaginites por *Candida*, sendo isolada de 70-90% dos casos (FAN et al., 2008; PIROTTA et al., 2006). Essa espécie é a melhor estudada e, pode ser encontrada como comensal em varias partes do organismo, como no trato gastrointestinal, na mucosa oral e na mucosa vaginal. Contudo, poucos estudos relatam a presença de *C. albicans* no ambiente (PAULA et al., 1983). Esta aparente ausência pode estar associada a adaptações no ciclo de vida da levedura (COOPER JR., 2011).

Quando cultivada em meios de cultura próprios e, em temperaturas ótimas. *C. albicans* produz estruturas que permitem diferenciá-la das demais espécies, como a capacidade de produzir clamidoconídeos, na posição terminal das hifas. Outra característica importante é o estágio inicial da hifa que é diferente pois, há a ausência de constrição, na base, formando a estrutura conhecida como tubo germinativo. Em meio cromogênico, CHROMagar Candida, *Candida albicans* apresenta coloração verde (COOPER JR., 2011).

Em 1995, Sullivan et al. descreveram, em amostras isoladas de cavidade oral de indivíduos portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, uma espécie de levedura com características fenotípicas bastante similares a *C. albicans*. Atualmente, alguns autores propõem a existência de testes fenotípicos que parecem permitir a diferenciação entre as duas espécies, como a termotolerância a temperatura de 45 °C e a capacidade de crescimento Sabouraud hipertônico (ALBERT et al., 2002), apresentados por *C. albicans* (LORETO et al., 2010; SULLIVAN 2005).

A presença de *C. dubliniensis* em secreção vaginal de mulheres sem imunodeficiência parece ser inexpressiva. Us e Cengiz (2007) coletaram amostras de mulheres gestantes e, 2,43% apresentaram características fenotípicas de *C. dubliniensis*, porém, os autores não relatam a realização de testes genotípicos que confirmem esse dado. Na Turquia, AL-Sweich et al., em 2005, analisaram 1644 amostras de coleção de cultura, provenientes de uma maternidade, identificadas como *C. albicans* e, observaram que, a presença de *C. dubliniensis* nestas amostras foi de 0,2%, através de análise molecular. Entre mulheres portadoras de HIV, Badiie et al.

(2010) relataram que, das 86 amostras de *Candida spp* provenientes de secreção vaginal, 13,3% foram identificadas como *C. dubliniensis*, comprovando, assim, que este patógeno parece estar intimamente relacionado com a presença de HIV.

Outra espécie de grande importância médica é *Candida glabrata* (FAN et al., 2008; OZCAN et al., 2006). Dentre as *Candida* não *albicans*, essa é considerada de maior importância, não só em casos de candidíase vulvovaginal, como em outros quadros clínicos, como na colonização da mucosa oral e em infecções do sangue (COOPER JR., 2011).

Nas rotinas laboratoriais, a distinção de *C. glabrata* de outras espécies patogênicas é relativamente simples, pois, essa não produz hifas e pseudo-hifas em meio contendo ágar fubá, com Tween 80 e são observados apenas blastoconídeos pequenos. Contudo, a diferenciação dessa com *C. famata* pode depender de provas bioquímicas específicas. Em meio cromogênico, *C. glabrata* produz uma coloração que varia de cor de rosa claro ao magenta. Essa coloração pode ser produzida por outras espécies de *Candida*, fato que não permite a utilização dos meios cromogênicos como única ferramenta para a identificação dessa espécie.

Cooper Jr. (2011) chama a atenção para a dificuldade de cultivar e manter as amostras de *C. glabrata* em meios usualmente utilizados em laboratório, pois, para que essa manutenção seja eficaz, a levedura depende de meio enriquecido com uma fonte de colesterol exógeno, pois, as cepas utilizariam o colesterol, presente no meio de cultura, para a síntese do ergosterol, presente em sua membrana estrutural.

A taxonomia de *Candida glabrata* é um tanto controversa. Inicialmente, a levedura, descrita por Berlese, em 1895, foi denominada como *Cryptococcus glabratus*. Em 1938, Lodder e De Vries usaram o termo *Torulopsis glabrata* e, em 1978, Yarrow e Meyer incluíram essa levedura no gênero *Candida* (apud MENDLING et al., 2003). Entretanto, estudos moleculares recentes, mostram que *C. glabrata* possui maior similaridade com *Saccharomyces cerevisiae* do que com as leveduras do gênero *Candida* (KUO et al., 2010; MIYAZAKI et al., 2011; ROETZER, 2011).

A presença de *C. glabrata* no conteúdo vaginal é bastante expressiva. Mendling (1988) relata que 25% das mulheres podem ser portadoras assintomáticas dessa espécie. Essa colonização parece estar associada com a idade. Em um estudo

realizado por Qi et al. (2005), os autores estudaram 273 jovens saudáveis, com idade inferior a 21 anos. O grupo que apresentou maior colonização por *C. glabrata* foi o de jovens com idade entre 18 e 21 anos, comprovando essa hipótese.

C. tropicalis está associada a infecções por *Candida spp* na corrente sanguínea, em pacientes com leucemia (MARINA et al., 1991) e com neutropenia, após um longo tempo de hospitalização (PEMAN et al., 2011). Em quadros de candidíase vulvovaginal, embora as amostras de *C. tropicalis* apresentem sensibilidade “in vitro” as drogas antifúngicas utilizadas, essa espécie está relacionada à casos de candidíase recorrente (KOTHAVADE et al., 2010).

Em isolados de secreção vaginal, *C. tropicalis* varia bastante. Fan et al. (2008) encontraram 0,9% de *C. tropicalis*, na China; na Grécia, Grigoriou et al. (2006) há a descrição de 1,6% do total de isolamentos; Bulmer et al. (1999), nas Filipinas relatam a presença dessa levedura em 14% dos isolados. No México, *C. tropicalis* foi a terceira espécie mais isolada em mulheres com e sem sintomas de infecção vaginal (SANCHEZ et al., 2006).

O isolamento do complexo *C. parapsilosis* em amostras oriundas de secreção vaginal é significativa. Bulmer et al. (1999) encontraram a espécie como a segunda causa mais frequente de candidíase vulvovaginal, com 17.8% de isolamento. Aproximadamente 20% das mulheres portadoras assintomáticas de leveduras portam *C. parapsilosis*. Fato esse que levaram Nyirjesy et al. (2005) a questionarem se esta presença está ou não associada a produção de sintomas, ou se a levedura estaria apenas colonizando a mucosa vaginal. Os resultados obtidos demonstraram que a presença de *C. parapsilosis* foi de 8,5% dos isolamentos realizados e, 72,5% dessas mulheres apresentaram sintomas de candidíase vulvovaginal.

A diferenciação de *C. parapsilosis*, das demais espécies de *Candida spp* é possível graças a produção de pseudo-hifas alongadas, na forma de “pinheiro”. Contudo, o grau de formação de pseudo-hifas varia de acordo com o isolado. Em meio cromogênico, a coloração de *C. parapsilosis* varia de cor-de-rosa a lavanda (COOPER JR., 2011).

A fase telemórfica de *C. parapsilosis* não foi descrita, na literatura. Entretanto, Tavanti et al. (2005), através de análises moleculares sugeriram a criação de duas

novas espécies: *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, que compõem o chamado complexo *C. parapsilosis* (GONÇALVES et al., 2009; TROFA; GÁCSE; NOSANCHUK, 2008).

Outras espécies, como *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) e *C. guilliermondii* (*Meyerozyma* (*Pichia guilliermondii*)) (COOPER JR., 2011) são leveduras em que, o isolamento, em casos de candidíase vulvovaginal varia entre 0,2 a 2%. Porém, apresentam características importantes como uma menor sensibilidade “in vitro” aos antifúngicos, fato que pode contribuir para maior desenvolvimento de recorrência, ou falha terapêutica.

1.6 Sinais e sintomas clínicos de CVV

Candidíase, na fase aguda usualmente está associada a leucorréia, prurido, e hiperemia (MOREIRA; PAULA, 2006).

A leucorreia, ou corrimento branco ou amarelado consiste em uma mescla de células vaginais com polimorfonucleares (ZIARRUSTA, 2002). Este sintoma pode ser agravado durante o período pré-menstrual e, que é aliviado após a menstruação. Alterações de pH não são observadas durante a infecção aguda por *Candida spp.*

O prurido pode estar associado a reações de hipersensibilidade do hospedeiro ou a mecanismos do sistema imunológico (SOBEL, 2007) como a liberação de substâncias como as prostaglandinas e bradicininas, que possuem a capacidade de induzir processos inflamatórios locais (MENDLING, 1988).

O exame clínico mostra a presença de eritema difuso ou irregular, na parede vaginal e no colo uterino e, ocasionalmente, pode-se observar, ainda, a presença de placas de leveduras, na parede vaginal e, consequente formação de erosão (MENDLING, 1988).

De acordo com Sobel (2007), os sinais e sintomas apresentados não permitem distinguir a infecção por *Candida albicans* das demais espécies. Contudo, Geiger et al. (1995) suportam que há padrões distintos da infecção causada por *C. glabrata*. A presença de leucorreia é menos abundante do que nas mulheres com *C. albicans*. Isto pode ser resultante da não formação de hifas e pseudo-hifas, por essa espécie. Além disso, percebe-se que há uma menor resposta inflamatória e menos disparemia. A

presença de sensação de ardência é relatada em mulheres com *C. glabrata*, em substituição ao prurido provocado por *C. albicans*. A presença de eritema difuso é observada, ao exame clínico e, não há relatos da presença de placas, na parede vaginal, quando a infecção está associada a *C. glabrata*.

Porém, esses sinais e sintomas variam de acordo com o estágio da infecção e, faz-se necessário a realização de exames laboratoriais que confirmem a espécie envolvida nos quadros de candidíase vulvovaginal.

1.7 Diagnóstico Laboratorial

1.7.1 Identificação Tradicional

A maneira mais simples de coletar amostras de conteúdo vaginal é com auxílio do uso de espéculos, que permitem a avaliação de toda a parede vaginal bem como o colo uterino (MENDLING, 1988).

Em mulheres com sintomas específicos de candidíase vulvovaginal, o conteúdo vaginal pode ser examinado através do exame microscópico direto, ou o mesmo pode ser suspenso em solução salina a 0,85%. Este procedimento pode auxiliar na detecção de elementos, como hifas e blastoconídeos, além de permitir a exclusão de diagnóstico de *Trichomonas vaginalis* e *Gardnerella vaginalis* (GONZALEZ et al., 2011). A adição de hidróxido de potássio pode melhorar a acurácia desse exame, pois facilita a visualização de hifas (SOBEL, 2007).

Contudo, cerca de 50% das mulheres com sintomas de candidíase apresentam o exame direto negativo. Esse fato pode indicar a presença de espécies que não são formadoras de hifas e pseudo-hifas, como *C. glabrata* (SOBEL, 1998).

A coloração do esfregaço pelo método de Gram é um teste indicado para o diagnóstico de vaginose bacteriana, já que permite a visualização de estreptococos, “clue cells” (indicadoras de *Gardnerella vaginalis*), além de permitir a detecção de *Trichomonas vaginalis*. Apesar de não haver preconização para a utilização desse método para o diagnóstico de *Candida spp*, essa coloração mostra-se altamente eficaz em melhorar a visualização das estruturas das leveduras, inclusive, facilitando a

detecção de blastoconídeos, presentes em espécies que não filamentam, como ocorre com *C. glabrata*.

A não visualização de leveduras, no exame direto, requer a realização de cultura do conteúdo vaginal (MENDLING, 1988; SOBEL 2007). A cultura está indicada também para casos em que a mulher não responde ao tratamento, já que, através da cultura, é possível a identificação da levedura, em nível de espécie. Este fato facilita a conduta terapêutica a ser adotada. É possível, ainda, a monitoração da eficácia terapêutica, já que de sete a dez dias após o término da medicação, é possível observar se ainda restam micro-organismos viáveis (MENDLING, 1988; SOBEL, 2007).

A cultura pode ser realizada em vários meios utilizados na microbiologia, como ágar sangue ou ágar Chocolate, ou, ainda, em meios específicos para isolamento de fungos, como ágar Sabouraud dextrose ou CHROMagar Candida® (Biomérieux, França), que por conter extratos cromogênicos, permite a detecção de mais de uma espécie em um mesmo isolado clínico (MADHAVAN et al., 2011; ODDS et al., 2003).

Após a obtenção das cepas, a realização de testes bioquímicos, como os testes de assimilação (BEIJERICK, 1889) e de fermentação de açúcares e permite a identificação das leveduras, em nível de espécie (*apud* KURZTMAN, 2011).

1.7.2 Métodos moleculares de diagnóstico de CV

O diagnóstico das infecções fúngicas é realizado, frequentemente, com base nas características morfológicas e metabólicas, o que pode requer dias ou semanas para que o isolamento e a identificação das espécies sejam concluídos. Com isso, o desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais rápidos e com maior acurácia têm sido pesquisados (SANDHU et al., 1995). Vários grupos (NOBLE, 2005; RIBEIRO et al., 2005) têm desenvolvido os testes baseados nas reações em cadeia de polimerase (PCR).

O advento da biologia molecular tem providenciado muitas ferramentas para os taxonomistas de fungos. As reações de PCR e sequenciamento de genes providenciam rápida e acurada identificação de um grande número de patógenos. Novas espécies não poderiam ser descritas com base nos testes fenotípicos.

1.7.2.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e sequenciamento

O alvo mais frequente das pesquisas de PCR são os DNA ribossomais. Os genes de DNA ribossomal são encontrados em todos os micro-organismos e são conhecidos por acumular mutações lentas (IWEN; HINRICHS, RUPP, 2002).

A maior parte do genoma haploide de *Candida spp* consiste em DNA mitocondrial e DNA ribossômico (DNAr). No DNA ribossomal existe, três regiões codificadoras relativamente conservadas que incluem a região 18S, uma sequência altamente conservada de 5.8S e a região 28S .

Entre a região 5.8S e a 28S existem regiões de sequências variáveis denominadas de regiões Espaçadores Internos Transcritos, ou em inglês, *Internal Transcribed Spaces*, ITS 1 e ITS2 são regiões que permaneceram conservadas ao longo da evolução. A região ITS1 apresenta uma rápida evolução e a região ITS2 apresenta uma evolução moderadamente rápida, demonstrando baixo polimorfismo intraespecífico e alto polimorfismo interespecífico (IWEN; HINRICHS, RUPP, 2002; PINCUS; ORENGA, CHATELLIER, 2007).

Kurztzman et al. (2008) descreveram a existência de divergências extensas na região D1/D2 do DNA ribossomal que permite a diferenciação de até 500 espécies de *Ascomycetos*. De acordo com os autores alterações de 1% dos 600 nucleotídeos presentes nessa região podem ser suficientes para distinguir as espécies e, alterações de um a três nucleotídeos é suficiente para diferenciar espécies correlacionadas ou similares.

Através das análises das regiões ITS e D1/D2 é possível a identificação de leveduras, em gênero e espécie (CHEN et al., 2000; CIARDO et al., 2006; FELL et al., 2000; LIGOURI et al., 2010); verificar se há alterações entre as espécies (IIDA et al., 2005) e ainda se, as espécies estão inter-relacionadas (KURZTMAN; ROBNETT 1997). A Figura 2 traz um desenho esquemático da região ITS.

Figura 2: Localização das regiões ITS 1 e ITS 2

Fonte: PINCUS; ORENGA, CHATELLIER, 2007

Fonseca et al. (2000), através da análise da região D1/D2 identificaram uma nova espécie de *Candida* chamada *C. tartarinovans*, que possui grande aplicação biotecnológica, pois é capaz de degradar ácido tartárico.

Fell et al. (2000) realizaram análise de 337 isolados de leveduras pertencentes aos Basidiomicetos ou “Basidiomycetes like” e, através da região D1/D2 foi possível a diferenciação das leveduras em “clusters”. De acordo com os autores a análise da região D1/D2 permite a diferenciação da maioria das espécies. Porém, uma análise mais segura é obtida através da análise conjunta dessa região (D1/D2) com a região ITS. Opinião que também é compartilhada por Fonseca et al. (2000) e Kurtzman et al., (2007).

Com isso, vários estudos estão utilizando o sequenciamento direto das regiões ITS e D1/D2 para identificação de leveduras. A capacidade de sequenciar os ácidos nucleicos proporcionou um grande avanço nas áreas da Biologia e da Medicina, pois, possibilitou a ampliação do conhecimento da estrutura primária dos genes e auxiliou na inferência da função das sequências já conhecidas (FLOREZ et al., 2007).

Após a realização do sequenciamento, as ferramentas de bioinformática e os bancos de dados de domínio público possibilitou um avanço na análise dos resultados. O banco de sequências mais popular existente é o Gen Bank, do NCBI.

Através do sequenciamento da região D1/D2, Garner et al. (2010), sequenciaram 109 amostras de leveduras oriundas de amostras clínicas veterinárias e identificaram 30 espécies distintas.

Porém, de acordo com Ciardo et al. (2006), nem todas as identificações geradas pelo Gen Bank são altamente confiáveis, pois, em casos de pequenas alterações na sequência de nucleotídeo, o banco pode entender que há uma espécie não conhecida, ou ainda, podem haver sequências que não foram depositadas no banco, gerando alguns erros de identificação.

O advento das técnicas de separação de DNA cromossomal intacto por eletroforese em eucariotos pequenos tem providenciado, nas últimas duas décadas, meios de caracterizar arranjos de cromossomos. Estas técnicas têm fornecido novas informações fundamentais para uma organização básica sobre o genoma de muitas espécies de fungos. Essas pesquisas são baseadas na separação eletroforética de DNA não digerido ou por comparação de padrões de macro restrições obtidas pelo uso de endonucleases de restrição. A aplicação desses protocolos permitem obter espécies com padrões cada vez mais específicos (BELLOCH et al., 1997; FLOREZ, et al., 2007).

Em comparação com os métodos de detecção direta, que utilizam sequências universais ou espécie específicas, as técnicas de tipagem tem como objetivos identificar a mesma linhagem em isolados independentes; identificar mudanças microevolutivas em uma mesma linhagem (isolados que são altamente similares, porém, não idênticos; agrupar isolados moderadamente relacionados e, identificar isolados completamente não relacionados (BORIOLLO; HOFLING, 2004).

As espécies fúngicas apresentam cromossomos de comprimentos polimórficos que são resultantes de rearranjos cromossômicos desiguais ou de quebra de parte do cromossomo.

As sequências polimórficas podem ser avaliadas através da técnica de cariotipagem eletroforética em gel de campo pulsado (PFGE). Essa técnica permite a separação de fragmentos de DNA utilizando campo pulsado. A fim de se evitar a quebra do DNA durante a extração, as células são colocadas inteiras em blocos de agarose e a quebra dos componentes celulares é realizada com a adição de soluções tampão no bloco inicial e, são tratados com enzimas e detergentes, que removem os componentes

celulares. Os fragmentos do DNA da levedura é, então, separado de acordo com o tamanho e, podem ser visualizados em gel corado com brometo de etídio. Através da técnica de PFGE é possível visualizar fragmentos que variam de 10 a 800 quilobases (TRTCHOVA; RADAUSKY, 2006).

Em 1988, Merz et al., analisaram dezessete isolados de *C. albicans* e encontraram 14 padrões distintos de bandas. Em 1989, o mesmo autor, em conjunto com Kaufmann, avaliaram o perfil cromossômico de trinta e três amostras de *C. glabrata* e, observaram que o número de bandas variava de 9 a 12, com peso de 445 a 3000 quilobases. Nesse estudo, 22 padrões distintos de bandas foram observados,

Vasquez et al. (1993) compararam o perfil cromossômico de várias espécies de *Candida*, através da técnica de PFGE e da análise de enzimas de restrição (REA). No PFGE, os autores encontraram 14 padrões de *C. lusitanae*; 16 de *C. glabrata*; 10 de *C. tropicalis*, 10 de *C. parapsilosis* e 7 de *C. kefyr*. Através da técnica de REA, os índices obtidos foram 2 de *C. lusitanae*, 2 de *C. glabrata*, 5 de *C. tropicalis*, 3 de *C. parapsilosis* e 1 de *C. kefyr*. Esses dados comprovam que a técnica de PFGE apresenta maior poder de discriminação dos isolados do que a REA.

Com isso, vários estudos epidemiológicos utilizam o PFGE (DE BERNARDIS et al., 1999; DOI et al., 1992; KHATAK et al., 1992; SHIN et al., 2001; 2004). A técnica apresenta a desvantagem de ser trabalhosa e, os resultados demorarem até cinco dias para serem concluídos, o que inviabiliza sua utilização em rotinas laboratoriais. Porém, sua utilização em estudos epidemiológicos é de suma importância.

1.8 Tratamento da CVV

O tratamento das infecções vaginais deve ser realizado de acordo com o histórico individual de cada mulher e a classificação da candidíase vulvovaginal é importante para determinar a duração do mesmo (SOBEL et al., 2004).

De acordo com Sobel (2007), o tratamento de mulheres portadoras assintomáticas é controverso, pois, as leveduras poderiam estar em equilíbrio com os demais micro-organismos presentes na microbiota vaginal e, ao inserir a utilização de um fármaco, o mesmo seria rompido. Por outro lado, a presença de leveduras, na

mucosa vaginal, poderia ser precursora do desenvolvimento de candidíase sintomática, em período, como na gestação, em que há um aumento da secreção dos hormônios femininos, ou ainda, em casos de parto natural, no momento da passagem do bebê pelo canal vaginal pode ocorrer contaminação da mucosa oral dos recém-nascidos, predispondo-os a infecções secundárias graves como septicemias.

A conduta terapêutica a ser adotada,, nos tratamentos de quadros clínicos de candidíase vulvovaginal deve ser realizada de forma individual e, deve levar em conta o quadro clínico apresentado.

Em casos de candidíase vulvovaginal primária as mulheres podem ser tratadas com doses simples de antifúngicos, como o butoconazol, clotrimazol, miconazol, econazol ou nistatina.

Contudo, quando após o fim do tratamento ainda persistem sinais de infecção, faz-se necessário um tratamento mais prolongado, de 5 a 7 dias (SOBEL, 2007).

Os antifúngicos disponíveis para o tratamento de candidíase vulvovaginal podem estar na forma de cremes e pomadas, para uso tópico; na forma de óvulos, que devem ser utilizados como supositórios, ou como capsulas, para ser administrado por via oral. De acordo com Seidman e Skokos (2005) nos Estados Unidos, o tratamento de escolha, para casos mais simples é com tioconazol na forma de creme; com soluções que contenham 6,5% de miconazol, na forma de óvulos ou com dose única de fluconazol, por via oral.

De acordo com Sobel (2007), o uso dos antifúngicos na forma tópica é bem tolerado, contudo, algumas mulheres relatam a sensação de ardência. Porém, a taxa de cura pode variar de 80 a 90%, em casos menos severos da doença (REEF et al., 1995).

Na literatura, vários trabalhos comparam a eficácia dos cremes com o uso de fluconazol, via oral.

Mendling et al. (2004) compararam a performance do clotrimazol, sob duas formas de apresentação, com a performance do fluconazol. Os autores concluíram que as terapias tópicas podem ser tão eficazes quanto a dose única de fluconazol. Após 14 dias, as taxas foram de 62% e 60%, respectivamente. Após oito semanas, 50% das mulheres, com histórico de candidíase recorrente relataram o reaparecimento dos sintomas, em ambos os tratamentos.

Seidman e Skokos (2005) realizaram estudo comparativo com creme a base de butoconazol e fluconazol, via oral. Neste estudo, os autores relatam que houve o desaparecimento dos sintomas clínicos mais rapidamente, nas mulheres que fizeram uso de creme.

O tratamento da candidíase vulvovaginal recorrente é mais complicado, pois, é um quadro multifatorial e, necessita de uma atenção mais direta.

Nesses casos, faz-se necessária a adoção de regimes profiláticos de antifúngicos, durante um período mais prolongado. O uso do cetoconazol, por três meses (100mg/dia) e o uso de supositório a base de clotrimazol ou a prescrição de 150mg de fluconazol, por via oral, pelo período de três meses, são os tratamentos indicados. Contudo, o cetoconazol é pouco utilizado, devido a toxicidade (SOBEL, 2007).

Alguns autores indicam o uso de terapias alternativas para o tratamento de candidíase recorrente, como o uso de probióticos. Outro caso que merece atenção mais detalhada é quando a mulher apresenta quadros de candidíase causados por *Candida* não-albicans. As vulvovaginites causadas por *C. glabrata* não respondem ao tratamento com fluconazol. Contudo, há atividade moderada com itraconazol, terconazol, cetoconazol e itraconazol (SOBEL, 1993).

Sobel (2007) propõe que nesses casos, seja adotada a utilização de 600mg de ácido bórico, em cápsulas de gelatina, por 14 dias ou que sejam utilizados supositórios a base de anfotericina B.

Existem casos em que as mulheres não respondem a terapia apenas com ácido bórico, pode-se realizar uma terapia combinada de ácido bórico com uso de nistatina, na forma de cremes e uso oral de itraconazol.

1.9 Testes de Susceptibilidade

A sensibilidade às drogas antifúngicas varia entre as diferentes espécies de *Candida*. Este fato realça a importância em se identificar as espécies, bem como em se determinar as CIMs (Concentração Inibitória Mínima) dos antifúngicos para que, dessa forma, seja possível evitar o aparecimento de cepas resistentes e se realizar a conduta terapêutica adequada (ST-GERMAIN et al., 2001).

Consequentemente, houve uma maior necessidade do desenvolvimento de métodos padronizados de susceptibilidade "in vitro", que poderiam servir como um guia para nortear a escolha terapêutica e para monitorar a eficácia da mesma (COSTA et al., 2004).

Existem vários testes que podem ser usados para a determinação da sensibilidade antifúngica, tais como: 1) Diluição em meio líquido por técnicas de macrodiluição e microdiluição; 2) Difusão em ágar a partir de discos e fitas com concentrações variáveis de antifúngicos.

Em 1992 foi publicado pelo Comitê Nacional de Padronização Laboratorial (NCCLS), o documento M27-P, para testes de sensibilidade "in vitro" para as leveduras (ESPINEL-INGROFF et al., 2006), principalmente para *Candida spp* e *Cryptococcus neoformans* (LINARES et al., 2004). Em 2002, foi aprovado o documento M27-A2, propondo algumas alterações ao documento M27A, publicado anteriormente (ACIKGOZ et al., 2004; ANREDRUP et al., 2001). Esse documento estabelece valores de referência para a realização dos testes de sensibilidade "in vitro" pelos métodos de macro e microdiluição em caldo e define a interpretação da concentração inibitória mínima (CIM) para avaliar a eficácia de alguns antifúngicos (DURAN et al., 2003; SANGLARD, 2002; SHÜNJI et al., 2004). E em 2008, o CLSI publicou o documento M27-A3 que inclui os valores de sensibilidade e resistência às drogas anidulafungina para os ensaios de susceptibilidade para *Candida spp* e *Cryptococcus spp*.

Em 1997, o Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade (EUCAST) propôs algumas alterações ao documento do CLSI e, o Subcomitê de Testes de Susceptibilidade aos antifúngicos (AFST) desenvolveu o método que hoje é chamado de EUCAST EDef 7.1.

As diferenças entre os dois métodos estão apresentadas na Tabela 2. Diversos estudos (CLAUDINO et al., 2008; CHRYSSANTHOU; CUENCA-ESTRELLA, 2002; ESPINEL-INGROFF et al., 2005; PFALLER et al., 2010; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2010) comparam a eficácia dos dois métodos.

Rodriguez-Tudela et al. (2007) realizaram ensaios utilizando os dois métodos e, concluíram que os resultados foram bastante similares, após 24 horas de incubação e, na análise de regressão linear, o EUCAST/AFST mostrou valores de Concentração

Inibitória Mínima inferior ao do método do CLSIM27S3. Cuesta et al. (2010), avaliaram o ponto de corte dos métodos para o fluconazol e, encontraram resultados bastante similares entre os dois.

Tabela 2: Diferenças entre os métodos CLSI M27S3 e o Eucast EDef7.1

Método	Adição de glicose (%)	Tipo de Placa	Inóculo (UFC/mL)	Tempo de incubação (h)	Leitura	Ponto de corte
CLSI M27S3	0.2	Fundo arredondado	0.5×10^3 - 2.5×10^3	48	Visual	Inibição substancial do crescimento
EUCAST EDef7.1	2	Fundo Plano	0.5×10^3 - 2.5×10^3	24	Espectrofotômetro	Inibição de 50% do crescimento, em relação ao controle

UFC: Unidade formadora de colônia.

Fonte: Tabela adaptada do artigo de Rodriguez-Tudela et al., (2007)

Não obstante, para a realização dos testes de macro e microdiluição, problemas como a padronização do inóculo, meio de cultura, pH, período e temperatura de incubação e inibição parcial do crescimento dificultam a reprodutibilidade dos ensaios. Em laboratórios de microbiologia onde há um grande volume de amostras, esses testes são muito trabalhosos e de leitura demorada (ANREDRUP et al., 2001).

Com isto, as pesquisas para o desenvolvimento de testes comerciais para a verificação da suscetibilidade vêm aumentando. Um dos métodos comerciais mais utilizados é o “Etest” (AB BIODISK, Solna, Suíça), que consiste em fita plástica

impregnada com gradiente de diferentes concentrações das drogas antifúngicas, que são depositadas na superfície do ágar (SHÜNJI et al., 2004).

De acordo com o fabricante os meios recomendados para a realização dos ensaios são ágar RPMI com 2% de glicose mais tampão MOPS; ágar casitone; ágar Casitone e ágar Müller Hinton. Contudo, um estudo realizado por Tortorato et al. (1998) com os três meios de cultura mostrou que os resultados obtidos com a utilização do meio ágar Müller Hinton teve menor concordância do que o obtido com os dois outros meios, em relação ao método do CLSI.

Diversos estudos, como os realizados por Colombo et al. (1995), Dias et al. (2006) e Silva et al. (2005), Espinel-Ingroff (2006) comprovam que há uma boa correlação entre o "Etest" e os métodos de micro e macrodiluição, preconizados pelo CLSI. Em 2010, Espinel-Ingroff et al., observaram que, o desempenho do "Etest" pode ser superior para detectar a resistência de algumas espécies, como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, com concordância de 87.9 a 100%, em relação ao CLSI M27S3.

Essa pesquisa é uma contribuição ao estudo de candidíase vulvovaginal levando-se em consideração os aspectos abordados, os questionamentos e hipóteses ainda existentes a respeito da intrigante relação existente entre parasita e hospedeiro.

20 objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Este estudo teve como objetivos comparar os perfis fenotípicos e genotípicos, a resistência aos antifúngicos e a produção de enzimas de amostras de leveduras isoladas do fluido vaginal de três grupos de mulheres: assintomáticas, com quadro de: candidíase primária (CVV) e com candidíase recorrente (CVVR) .

a. Hipóteses a serem testadas

- a) Verificar se as amostras de leveduras apresentam diferentes perfis fenotípicos e genotípicos, que as distinguem de mulheres assintomáticas das mulheres com infecções (CVV e CVVR);
 - b) Verificar se existem diferenças no perfil cromossômico das leveduras isoladas do conteúdo vaginal das mulheres pertencentes aos três grupos amostrais, pela técnica de cariotipagem em campo pulsado (PFGE);
 - c) Determinar a correlação entre a identificação tradicional e a identificação molecular, através da técnica de sequenciamento;
 - d) Verificar se existe diferença entre a resistência aos antifúngicos por três métodos, o “gold standard “ (CLSI), Eucast e “Etest” ;
 - e) Pesquisar se há correlação entre os resultados obtidos nos três grupos de mulheres analisadas (assintomáticas de leveduras, com candidíase primária e com candidíase recorrente).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Mulheres que participaram do estudo

Foram realizadas coletas de mulheres atendidas no Serviço de Dermatologia Sanitária do Centro de Saúde “Geraldo de Paula Souza” da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pelo Prof. Dr. Luis Jorge Fagundes. A determinação do número de mulheres foi realizada de acordo com cálculos estatísticos do Pesquisador do Instituto de Matemática da USP (IME) Rogério Pinheiro.

Com aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa das Instituições envolvidas, após assinarem o Termo de Consentimento (Anexo C) as coletas foram realizadas.

Foram excluídas do estudo mulheres que fizeram uso de drogas antifúngicas no prazo inferior a 15 dias antes da coleta e de gestantes.

Foram incluídas no estudo mulheres não grávidas; que faziam ou não uso de contraceptivos hormonais e as que utilizavam ou não DIU (Dispositivo Intrauterino).

3.1.1 Coleta do material vaginal

Através do “Protocolo de avaliação clínica” (Anexo A) obtiveram-se dados como uso de medicação e a presença de sinais e sintomas clínicos característicos de infecção vaginal.

Com auxílio de espéculo sem lubrificante foram realizadas três coletas, com “swabs” estéreis e alginatados (Cefar). O material coletado foi utilizado para a realização de exame direto. Realizou-se também a coloração de esfregaço pelo método de Gram, a fim de se avaliar a presença ou não de células leveduriformes ou pseudo-hifas; o material colhido foi levado imediatamente ao laboratório de Leveduras Patogênicas, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, para ser processado.

3.2 Definições dos grupos

Foram consideradas positivas as mulheres que apresentavam a presença de leveduras no esfregaço corado pelo método de Gram, associada com cultura positiva para leveduras. Essas foram divididas em três grupos:

- a. portadoras assintomáticas: mulheres que apresentaram presença de leveduras na cultura da secreção vaginal e que não tinham manifestado sintomas clínicos de CVV (corrimento vaginal, prurido e hiperemia), até o momento da coleta;
- b. com candidíase (CVV): mulheres que apresentaram cultura positiva para leveduras e que tiveram episódios esporádicos de candidíase durante o período de um ano;
- c. candidíase recorrente (CVVR): mulheres que apresentaram mais de quatro episódios de *Candida spp* por um período de um ano (SOBEL, 2007).

3.3 isolamento e condições de crescimento

As leveduras isoladas foram identificadas de acordo com os métodos preconizados por Kurtzman e Fell (1988) procedendo-se de acordo com o protocolo preconizado no laboratório de Leveduras Patogênicas, do Departamento de Microbiologia, da Universidade de São Paulo (Anexo B).

A diferenciação fenotípica de *Trichosporon spp* foi realizada de acordo com Hoog et al. (2000).

3.3.1 Diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*

A diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* foi feita de acordo com critério proposto por Coleman et al. (1997) baseado nas características fenotípicas. Para a realização dos ensaios foram utilizadas as amostras padrões ATCC 64548 (*C. albicans*) e ATCC777 (*C. dubliniensis*).

3.3.1.1 Diferenciação em "CHROMagar Candida®"

As amostras de *C. albicans* foram cultivadas em ágar Saboraud dextrose (Difco, USA, Detroit), por 24 horas. Após a incubação, os isolados foram repicados em CHROMagar Candida (Biomérieux, Paris, France) e incubadas por até 86 horas a 30 °C, visando-se a obtenção de colônias de coloração característica. Nessas condições,

as amostras de *C. dubliniensis* apresentam coloração verde escura, enquanto que *C. albicans* apresentam coloração verde clara.

3.3.1.2 Crescimento a 45 °C

As amostras de *Candida albicans* foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, USA, Detroit), com cloranfenicol (100µg/mL) e incubadas a 37 °C, por 24 h. Depois foram transferidas para tubos pequenos com ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 45 °C. Amostras de *C. dubliniensis* não crescem nessa temperatura.

3.3.1.3 Caldo Sabouraud hipertônico

O caldo de Sabouraud hipertônico foi realizado de acordo com a descrição de Alves et al. (2002). A partir de cultivo de 24 horas, em ágar Sabouraud dextrose das amostras de *Candida albicans* foram realizadas suspensões, em tubos de ensaio contendo 3mL de solução salina a 0.85%. A suspensão foi homogeneizada em aparelho 'Vortex' e a densidade de células foi ajustada em espectrofotômetro (Spectrum/USA) em comprimento de onda de 530nm, tendo como base a transmitância da escala 0,5 de McFarland. Alíquotas de 20µL de cada suspensão foram adicionados a tubos contendo 1mL de caldo Sabouraud estéril suplementada com 6,5% de cloreto de sódio (Merck/USA) e, em seguida, incubadas por 96 h. As culturas foram então examinadas visualmente para a detecção de crescimento fúngico, em intervalos de 24 h. O resultado positivo do teste foi definido como a ausência de crescimento da colônia visível no tubo de ensaio após 96 h de incubação. Neste caso, *C. albicans*, mas não *C. dubliniensis* é capaz de crescer em excesso de NaCl.

3.3.1.4 Diferenciação molecular das amostras sugestivas de *C. dubliniensis*

Amostras que apresentaram características fisiológicas sugestivas de *C. dubliniensis*, nos itens 3.4.1.1; 3.4.1.2 e 3.4.1.3 foram submetidas a sequenciamento da região ITS1 e ITS4 para confirmar a identificação, conforme descrito no Item 3.4.

3.3.2 *Diferenciação das amostras de leveduras pertencentes ao complexo C. parapsilosis strictu sensu*

As amostras identificadas como *C. parapsilosis*, nas provas fisiológicas foram submetidas a diferenciação molecular, através de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e, sequenciamento da região ITS1 e ITS4, conforme descrito no Item 3.4.

3.3.3 *Identificação das leveduras que não foram identificadas pelas provas fisiológicas: Candida spp*

Os isolados que não foram identificados, pelos métodos tradicionais de identificação foram submetidos ao sequenciamento da região ITS1 e ITS4, conforme descrito no item 3.4.

3.4 **Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e Sequenciamento**

3.4.1 *Extração de DNA das Leveduras*

Após a identificação fenotípica dos isolados, uma colônia pura e isolada de cada amostra cultivada em meio CHROMagar foi repicada em meio líquido YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose (Difco/ USA, Detroit) e incubada por 24 h a 30 °C sob agitação (200rpm).

A cultura obtida foi empregada para a extração do DNA total das leveduras, conforme protocolo comercial *PrepMan™ Ultra Sample Preparation reagent Quick Reference Card* “Applied Biosystems/ USA”. Um mililitro da suspensão foi submetido a centrifugação por 3 minutos, a 16.000 x g. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e o “pellet” ressuspense em 100uL do reagente “PrepMan” e submetido a agitação por 20 segundos no vórtex. A reação foi, então, incubada em banho maria a 100 °C por 10 minutos e, em seguida deixa em temperatura ambiente por 2 minutos.

Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 3 minutos a 16000xg e 90uL do sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo e armazenado em freezer a -20 °C.

O DNA extraído foi quantificado por dosagem espectrofotométrica à razão de O.D. 260nm/280nm no aparelho “NanoVue Plus” (General Electric/USA). O grau de pureza do DNA foi avaliado em relação à proteína (260nm/280nm) e o grau de pureza do DNA em relação ao sal (260nm/230nm). O valor ótimo esperado é entre 1.8 - 2.0.

Após a determinação das concentrações foram preparadas amostras de DNA na concentração de 50ng/uL, que foram estocadas e preservadas a -20 °C.

3.4.2 Amplificação

A amplificação foi realizada utilizando “primers” que amplificam fragmentos da região ITS do DNA ribossomal (DNAr). Os “primers” das regiões ITS1/ITS4 foram: “forward” 5’ TCCGTAGGTGAACCTGCGG3’ e “reverse” 5’ TCCTCCGCTTATGATATGC3’. Como padrão foi utilizada a cepa ATCC 64548 (*C. albicans*)

Para a reação de PCR foram preparados 25uL de solução contendo 23uL de “TaqMan Universal PCR Master Mix” (Applied Biosystems/USA) e 2uL de DNA a 50ng/uL. As condições de amplificação foram: denaturação inicial de 5 minutos à 95 °C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 56 °C, 2 minutos a 72 °C, com extensão final de 10 minutos a 71 °C, em Termociclador (Veriti 96-well Thermal - Applied Biosystems).

Para a corrida eletroforética, 5uL do DNA foi adicionado a 2uL de corante (EZ Vision, Ambresco), que permite a visualização da corrida e dispensa o uso de solução de brometo de etídio. Os amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Invitrogen Life Technologies/ USA) a 1% diluído em tampão TAE (Tris-Acido acético-EDTA) 1x. Todas as análises incluíram um marcador de peso molecular de 500 a 10,000 pb (MW MARKER, Ambresco).

Após a eletroforese a visualização das bandas de DNA foi realizada com auxílio de aparelho fotodocumentador (Bio Rad/USA), sob iluminação de luz ultravioleta.

3.4.3 Sequenciamento

Além dos “primers” ITS1/ITS4, para a reação de sequenciamento foram utilizados os “primers” V9G “forward” (5'TTACGTCCCTGTCCTTTGTA3') e LS “reverse” (5'GCATTCCCAAACAACCTCGACT3').

A amplificação foi realizada, em placas com 96 pocinhos, adicionando-se 100ng do DNA purificado, 9µL de cada primer “forward” e “reverse” em poços separados, 2µL do “ABI Prism® Big Dye® Terminator v3.1” (Applied Biosystems/ USA), 4µL de tampão Tris-HCL 200mM e 5mM de MgCl₂.

As condições de amplificação foram: uma etapa de anelamento, de 20 minutos a 95 °C, seguida de 25 ciclos de 50 °C, por 15 minutos, 60 °C, por 1 minuto. Após essa etapa, as placas foram vedadas e armazenadas em freezer a -20 °C.

Após a denaturação a 94 °C por 4 minutos, as sequências foram determinadas pelo aparelho “DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing” (Applied Biosystem/ USA), pertencente ao Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).

As sequências foram alinhadas com auxílio do “software Sequencher 4.1.4” e, comparadas com as sequências disponíveis no “GenBank”, com auxílio do programa BLAST.

3.5 Determinação dos fatores relacionados a virulência

3.5.1 Pesquisa de Proteínase (Sap`S)

A pesquisa de proteinase em placa foi realizada de acordo com o método descrito por Price et al. (1982).

O meio para a realização do teste é composto por uma solução de 0,2% de albumina bovina (BSA, fração V, Sigma), 5 µL de vitamina B (Roche) e “Yeast Carbon Base” (Difco, Detroit/ USA). O pH foi ajustado em 5,0, esterilizado por filtração, e adicionados a 2% de ágar autoclavado.

As placas contendo quatro inóculos de diferentes cultivos foram incubadas a 37 °C por 4 dias. Como controle positivo foi utilizado a cepa de *C. albicans* (ICB12A). A presença da enzima foi observada pela formação do halo de degradação ao redor da colônia da levedura e a atividade enzimática medida (Pz) segundo Price et al.(1982) através da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais zona de degradação (dd). Os resultados foram analisados conforme padrão descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Atividade enzimática (proteinase e fosfolipase) conforme o PZ e o código

PZ	Atividade enzimática	Código
1	Negativa	1
$>0,64 < 1$	Positiva	2
0,64	Fortemente Positiva	3

PZ: Diâmetro da colônia/ diâmetro do halo de precipitação ou degradação

Fonte: Price et al.(1982)

3.5.2 Pesquisa da Fosfolipase

A atividade de fosfolipase será realizada de acordo com os métodos propostos por Ruchel et al. (1982), com utilização de ágar Sabouraud modificado, acrescido de 2% de gema de ovo. As placas contendo quatro inóculos de diferentes cultivos foram incubadas a 37 °C por 4 dias. A cepa de *C. albicans* (ICB12A) foi utilizada como controle positivo.

A presença da enzima foi observada pela formação do halo de precipitação ao redor da colônia da levedura e a atividade enzimática medida (Pz) segundo Price et al. (1982) através da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais zona de degradação (dd). Os resultados foram analisados conforme padrão descrito na Tabela 3.

3.6 Determinação dos Perfis de Sensibilidade e de Resistência “*in vitro*” às Drogas Antifúngicas

3.6.1 “Etest”

A pesquisa de sensibilidade “*in vitro*” em difusão em meio sólido foi realizada através do “Etest”.

Para as drogas anfotericina B, fluconazol, caspofungina, itraconazol, voriconazol, cetoconazol foram realizados ensaios de sensibilidade pela metodologia do “Etest”.

O “Etest” foi preparado de acordo com as instruções do fabricante (AB Biodisk, Solna, Suécia). O meio utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma/ USA) tamponado com ácido morfopropileno sulfônico (MOPS) 1,65 M, pH 7,2, com 2% glicose (Probac®). Uma solução de 3% de ágar bacteriológico (Difco/ USA) autoclavada foi acrescentada ao meio RPMI e distribuídas em placas.

A partir de cultivo de 24 horas, em ágar Saboraud dextrose (Difco/ USA) das amostras de *Candida spp*, tendo como controle padrão as amostras de *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* ATCC (22019), foram realizadas suspensões, em tubos de ensaio contendo 3mL de solução salina a 0,85%. A suspensão foi homogeneizada em aparelho ‘vórtex’ por quinze minutos e a densidade de células foi ajustada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 530nm, tendo como base a transmitância da escala 0,5 de McFarland.

A suspensão foi semeada em placas de Petri, com auxílio de “swabs” estéreis (Cefar). Após 15 minutos as fitas de “Etest” foram colocadas na superfície do ágar e as placas incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após a incubação foram realizadas as leituras da CIM, através do ponto de intersecção entre a fita e a zona de inibição de crescimento da levedura.

A interpretação dos resultados foi realizada com base nos valores de CIM preconizados pelo documento M27A2 (2002) e M27S3 (2008), descritos pelo CLSI (Tabela 4).

Esse critério acima não estipula valores para o cetoconazol que é considerada uma droga fungistática. Apenas indica a maioria dos valores são encontrados entre 0,03 e 16µg/mL (Cetoconazol) para isolados clínicos.

3.6.2 Microdiluição

Os ensaios de microdiluição (EUCAST EDef 7.1 e CLSI M27S3) foram realizados nas amostras que apresentaram sensibilidade dose dependente ou intermediária e para as amostras resistentes, nos ensaios de difusão em ágar, para os seguintes antifúngicos: anfotericina B, fluconazol e itraconazol que são os antifúngicos mais utilizados para o tratamento de quadros de candidíase vulvovaginal.

Tabela 04 Interpretação do comportamento de cepas de *Candida spp* frente à concentração dos antifúngicos ($\mu\text{g/mL}$), segundo documentos CLSI M27-A2 e M27S3

	S	SDD	R	NS
Caspofungina	≤ 2	-		>2
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64	
Itraconazol	$\leq 0,25$	0.25 - 0.5	≥ 1	
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4	
Anfotericina B	< 2		≥ 2 (sugere)	

S: sensível; SDD: sensibilidade dose dependente; R: resistente; NS: não sensível
 Fonte: Documentos CLSI M27-A2 e M27S3

3.6.2.1 CLSI M27S3

Os ensaios de microdiluição foram realizados em microplacas estéreis descartáveis, com 96 pocinhos, em formato de “U”.

As drogas Fluconazol e Itraconazol foram obtidas diretamente de seus fabricantes, Pfizer ($12.800\mu\text{g/mL}$) e Jansem ($1.600\mu\text{g/mL}$), respectivamente. A anfotericina B ($1.600\mu\text{g/mL}$) foi obtida da Sigma (USA).

A solução estoque de Fluconazol foi preparada, em água. As soluções estoque de Itraconazol e de Anfotericina B foram preparadas em Dimetil Sulfóxido (DMSO, Merck, EUA), por serem insolúveis em água. A partir das soluções padrões foram realizadas 10 diluições seriadas, com volume de $100\mu\text{L}$, duplamente concentradas (2x).

Após a realização das diluições, as placas foram cobertas com filme plástico e armazenadas em freezer a -70°C , por até seis meses.

O meio utilizado foi o RPMI-1640 em caldo com tampão MOPS (ácido 3[N-morfolino] propanossulfônico) 0,165mol/L (Sigma/USA), com L-glutamina, pH 7.0 com indicador vermelho de fenol), suplementados com 0,2% de glicose, de acordo com o documento CLSI M27S3.

A partir de repiques de 24 h foram preparadas suspensões dos isolados em salina 0,145 mol/L de NaCl, estéril padronizadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland (bioMérieux/ França), aproximadamente $1-5 \times 10^6$ células/mL. Estas suspensões foram agitadas em vórtex durante 15 segundos e conferida a densidade celular entre os inóculos, por espectrofotômetro, com comprimento de onda de 530nm.

A partir desse inóculo foram realizadas diluições de 1:50 seguida de outra de 1:20 em meio de cultura RPMI 1640. Após as diluições foram adicionados 100µL do inóculo em cada orifício da placa de microdiluição, na concentração de 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL, de acordo com recomendações do documento CLSI M27S3.

Após repique de 24 h, em meio de ágar Sabouraud Dextrose foram preparados suspensões dos isolados em salina 0,145 mol/L de NaCl, estéril padronizadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland (bioMérieux/ França), aproximadamente $1-5 \times 10^6$ células/mL, agitadas em vórtex durante 15 segundos e conferida a densidade celular entre os inóculos, por espectrofotômetro, com comprimento de onda de 530nm. O volume final em cada orifício da placa foi de 200µL.

Em todas as placas foram utilizados um controle positivo e um negativo. As cepas ATCC 22019 (*C. parapsilosis*) e ATCC 6258 (*C. krusei*) foram utilizadas como controles positivos, conforme recomendações do documento CLSI M27S3.

Após a inoculação, as placas foram tampadas e incubadas a 37 °C, por 24 horas.

A leitura dos testes foi realizada de acordo com o documento do CLSI M27S3. Para as drogas fungistáticas, como itraconazol e fluconazol, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de droga capaz de inibir 50% do crescimento. Para a anfotericina B, o CIM foi definido como a menor concentração da droga que inibe 100% do crescimento da levedura.

3.6.2.2 EUCAST EDef 7.1

Esse método de microdiluição preconizado pelo EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing) é semelhante ao método proposto pelo CLSI. As diferenças estão na concentração de glicose (2%) que é suplementado ao meio RPMI.

Outra diferença está na diluição da amostra, que deve ser de 1:10, em meio RPMI 1640 com 2% de glicose. As concentrações de células inoculadas nas placas resultam em uma concentração de $0,5 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^5$ células/mL.

A leitura é realizada por espectrofotômetro, após 24 h e 48 h. E, o valor de CIM para a anfotericina B é de 90% do crescimento de levedura.

3.7 Cariotipagem através da técnica Eletroforese em Campo Pulsado (Pfge)

3.7.1 Extração de DNA

A técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) foi realizada utilizando o aparelho CHEF MAPPER II (Bio Rad/ USA), segundo protocolo de Branchini et al. (1994), com modificações.

As amostras de *Candida spp* foram repicadas em CHROMagar Candida, incubada a 37 °C, por 48 h. Em seguida, a colônia isolada foi repicada em ágar Sabouraud dextrose (Difco/USA) e incubada a 35 °C por 24 h. Cerca de 300µL de células foram transferidas em microtubos tipo “Eppendorff” (1,5mL) contendo a 600µL de EDTA (Sigma/USA) para lavagem das células. Os tubos foram centrifugados a 3000rpm sob refrigeração a 4 °C, por 15 minutos.

Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após a última lavagem foram adicionados 300µL de EDTA (50 mM, pH 8,0) e o precipitado foi homogeneizado, em vórtex.

A esta suspensão de células foi adicionado 160µL da enzima Lyticase (Invitrogen) (1250 U/mL dissolvida em glicerol 50% (v/v)-0,01M NaPO₄ pH 7,5 ([Sigma])) e a mistura foi incubada a 37 °C por 40min. Após esse período foram acrescentadas a esta solução 400µL de agarose *low- melt* (Bio Rad/ USA) a 0,8% dissolvida em 50mM

de EDTA, pH 8,0, fundida e mantida liquefeita a 50°C. A mistura (células/agarose) foi homogeneizada suavemente e colocada rapidamente nos moldes. O conjunto foi mantido sob refrigeração a 4 °C por um período mínimo de 20 minutos.

Em seguida, os blocos foram removidos dos moldes e colocados em microtubos contendo 3 mL de tampão NET (Tris 1M [pH 7,5], EDTA 0,5 M [PH 8,0], lauroylsarcosine 1%) e proteinase K (1mg/mL; 20U/mg)(Invitrogen Life Technologies/USA) e incubados a 50 °C por 16 h. Após a incubação os blocos foram lavados 3 vezes com 2 mL de EDTA (50mM pH 8,0) por 30 min, sob agitação, a 25 °C. Uma quarta lavagem foi realizada e os blocos foram mantidos a 25 °C durante 1 6h.

Após esse período foram realizadas mais duas lavagens finais antes da realização da PFGE.

3.7.2 Corrida Eletroforética

Os blocos de agarose, das amostras e do peso molecular (*Saccharomyces cerevisiae*, de 225 a 2.200kb (Bio Rad/USA) foram fixados nos pentes de corrida, com a própria agarose. O pente foi, então, posicionado no molde para gel do sistema Chef Mapper (Bio Rad/USA) e, então, agarose liquefeita, a 0,8% foi adicionada. Após a solidificação da agarose, o pente foi retirado.

A corrida foi realizada em 2,5L de tampão TAE a 0,5% a 14 °C. As condições de corrida foram: bloco 1, com pulso inicial e final de 120s; voltagem de 3.5V/cm, ângulo de 106 °, por 24 h; bloco 2: pulso inicial e final de 240 seg.; voltagem de 3.5V/cm, ângulo de 106 °, por 36 h. O tampão de corrida foi substituído a cada 24h de corrida, visando manter as condições de corrente continua.

Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (Sigma/USA) durante 15 minutos e descorado com água destilada por 30 minutos. A documentação fotográfica foi realizada com auxilio do sistema de fotodocumentação de géis e transluminador “Quantum-ST4-1000” (Vilber Lourmat, França).

A análise do peso das bandas cromossômicas foi realizada com auxílio do “Software Quantum Capt” (Vilber Lourmat, França).

Os padrões de macrorrestrições e a construção do dendograma foram comparados através do “software Bionumerics” (Versão 6.5, Austin, TX). Os isolados foram classificados como genotipicamente distintos quando o padrão de similaridade de bandas foi menor que 90% (Chen et al., 2005).

3.8 Análise Estatística

Para as variáveis dicotômicas, utilizou-se o teste de exato de Fischer e para as contínuas, o teste de Mann-Whitney. Para avaliar as tendências foi utilizado o teste Qui-quadrado. Considerou-se significativo um valor de $p < 0.05$. A probabilidade de ocorrência de alterações clínicas foi realizada através do cálculo de valor preditivo positivo e negativo. A análise estatística foi realizada com auxílio do Software Bioedit (versão 7.1.3); Probabilites (versão 1.0).

Para a análise comparativa dos perfis de restrição obtidos utilizou-se o programa informático Bionumerics (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Utilizando o coeficiente de Dice, com posições de otimização 1,0 e de tolerância de 1,5, respectivamente, construiu-se um dendograma pelo método UPGMA e considerou-se que as estirpes pertenciam ao mesmo clone de PFGE se tinham uma semelhança igual ou superior a 80%, como anteriormente descrito. Para a análise comparativa dos perfis de restrição obtidos utilizou-se o programa informático Bionumerics (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Utilizando o coeficiente de Dice, com posições de utilização 1,0 e de tolerância de 1,5, respectivamente, construiu-se um dendograma pelo método UPGMA e considerou-se que as estirpes pertenciam ao mesmo clone de PFGE se tinham uma semelhança igual ou superior a 80%, como anteriormente descrito.

4 RESULTADOS

4.1 Mulheres que participaram do estudo

Este estudo foi do tipo corte transversal, no período de novembro de 2008 a maio de 2010. Foram realizadas coletas de conteúdo vaginal de 258 mulheres com e sem queixas de desconforto vaginal, com idade média de 33 anos (mediana 30; desvio padrão (DP) 10,5).

4.1.1 Coleta de material vaginal

Do material do conteúdo vaginal coletado foram realizados o exame direto, a coloração de Gram e a cultura. Os resultados estão descritos nos itens a seguir.

4.1.1.1 Coloração do esfregaço pelo método de Gram e cultura

Consideraram-se positivas as mulheres que apresentavam a presença de leveduras no esfregaço corado pelo método de Gram, associada com cultura positiva para leveduras. Através da coloração de Gram, a presença de estruturas leveduriformes foi observada em 68.6% do material analisado.

De acordo com a Tabela 5, a coloração do esfregaço pelo Gram apresentou 75.2% de sensibilidade para o diagnóstico de *Candida spp.* Das 268 amostras realizadas, 62.8% (162/258) apresentaram cultura positiva para leveduras.

Tabela 5: Desempenho da coloração do esfregaço pelo método de Gram, em relação à cultura, para a confirmação do diagnóstico de *Candida*.

Valores	%
Sensibilidade	75.12
Especificidade	54.84
Valor preditivo positivo	64.56
Valor preditivo negativo	68.00
Falso negativo	23.80
Falso positivo	45.76
p	0.5194

P : probabilidade

Fonte: Moreira (2012)

A Tabela 6 mostra que a cultura apresenta 82% de sensibilidade, para a confirmação do diagnóstico de candidíase vulvovaginal em relação à coloração de Gram.

Tabela 6: Avaliação da cultura, em relação a coloração do esfregaço pelo Gram, para diagnóstico de candidíase vulvovaginal

	Sinais clínicos positivos	Sinais clínicos negativos	Total
Cultura positiva	107	55	162
Cultura negativa	51	45	96

Sensibilidade: 68%

Especificidade: 45%

Valor Preditivo Positivo: 67%

Valor Preditivo Negativo: 47%

Fonte: Moreira (2012)

Das 158 (62%) mulheres que apresentavam queixa de desconforto vaginal (prurido ou leucorréia), 67% (107/158) apresentaram cultura positiva para leveduras, 24,5% (38/158) apresentavam vaginose bacteriana e, 8,5% vaginose inespecífica.

4.2 Definições de grupos amostrais

As 162 mulheres que apresentaram cultura positiva para leveduras foram classificadas em três grupos amostrais, sendo que 34% foram consideradas assintomáticas, 34% com candidíase primária e 32% com candidíase de recorrência.

Uma grande heterogeneidade em relação a idade foi observada nos três grupos estudados (Figura 3). O grupo das mulheres portadoras assintomáticas foi o que apresentou maior diferença entre as idades ($p < 0.001$). A Figura 3 mostra a variação da idade das mulheres que participaram do estudo, por grupo amostral.

Figura 3: Variação de Idade, por grupo amostral

Assint: proveniente de mulheres portadoras assintomáticas.

Fonte: Moreira (2012)

4.3 Identificação morfológica dos isolados de *Candida* spp

4.3.1 Características Fenotípicas

Foram realizadas análises da morfologia das colônias, em meio CHROMagar Candida e em ágar Sabouraud dextrose. Em meio Cromogênico, as amostras apresentaram coloração verde, sugestivo de *C. albicans* ou *C. dubliniensis*; azul, sugestivo de *C. tropicalis*, magenta, sugestivo de *C. krusei* e roxa, sugestivo de *Candida* spp. Em ágar Sabouraud todas as espécies apresentam colorações que variam do branco ao creme.

4.3.1.2 Identificação de *Trichosporon* spp

Através da identificação fenotípica das quatro amostras de *Trichosporon* spp, realizada por De Hoog et al. (2000) três isolados foram de *T. asahii* e um de *T. inkin*.

Figura 4: Cultivo de *C. albicans* em CHROMagar

Fonte: Moreira (2012)

Figura 5: Cultivo de *C. dubliniensis* em CHROmagar

Fonte: Moreira (2012)

Figura 6: Cultivo de *C. tropicalis* em CHROmagar

Fonte: Moreira (2012)

Figura 7: Cultivo de *C. parapsilosis* em CHROmagar

Fonte: Moreira (2012)

Figura 8: Cultivo de *C. glabrata* em CHROMagar

Fonte: Moreira (2012)

Figura 9: Cultivo de *Candida albicans* em ágar Sabouraud dextrose

Fonte: Moreira (2012)

Figura 10: Cultura de *Rhodotorula* spp em ágar Sabouraud dextrose

Fonte: Moreira (2012)

Figura 11: Microcultivo em lâmina de *C. albicans*

Fonte: Moreira (2012)

Figura 12: Microcultivo em lâmina de *C. haemuulonii*

Fonte: Moreira (2012)

Figura 13: Microcultivo em lâmina de *C. glabrata*

Fonte: Moreira (2012)

Figura 14: Microcultivo em lâmina de *C. parapsilosis*

Fonte: Moreira (2012)

Figura 15: Microcultivo em lâmina de *C. tropicalis*

Fonte: Moreira (2012)

Na Tabela 7 foi realizada a comparação do desempenho do meio CHROMagar Candida para a identificação presuntiva das leveduras.

O meio cromogênico CHROMagar Candida apresentou alta especificidade para o diagnóstico presuntivo de *Candida spp*, a sensibilidade foi alta para *C. albicans* e *C. krusei*, porém, foi baixa para o diagnóstico de *C. glabrata*, quando comparada com os métodos tradicionais.

Tabela 7: Relação de concordância entre os métodos convencionais e CHROMagar de para a confirmação da espécie de levedura

Identificação Tradicional	CHROMagar	concordância	Sensibilidade	Especificidade
<i>C. albicans</i> (84)	<i>C. albicans</i> (74)	88.90%	88%	94.50%
<i>C. tropicalis</i> (12)	<i>C. tropicalis</i> (8)	66.70%	53.30%	97.20%
<i>C. krusei</i> (2)	<i>C. krusei</i> (2)	100%	100%	100%
<i>C. glabrata</i> (26)	<i>C. glabrata</i> (45) *		39.13%	91.90%

*Coloração: magenta
Fonte: Moreira (2012)

4.3.2 Características Fisiológicas

O microcultivo em lâmina foi realizado em ágar fubá, acrescido de Tween 80, que permite a identificação de hifas/ pseudo-hifas e a presença de clamidoconídeos (característicos de *C. albicans* e *C. dubliniensis*). As Figuras de 4 a 10 mostram as características microscópicas apresentadas por diferentes espécies de leveduras.

As Figuras 11 a 15 mostram as diferenças entre a micromorfologia dos isolados identificados como *Candida* spp.

Após a realização do microcultivo foram realizadas provas fisiológicas.

Através dos testes bioquímicos 4/160 amostras foram identificadas como *Candida* spp por apresentar as características descritas na Tabela 8.

Nessas amostras foram realizados sequenciamento com a finalidade de se tentar identificá-las.

4.3.2.1 Diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis*

Os principais testes utilizados na rotina laboratorial para diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* são: cor de crescimento em meio cromogênico (Figuras 4 a 8); teste de termotolerância e crescimento em meio hipertônico.

No presente estudo, 14 das 82 amostras identificadas como *C. albicans* apresentaram características que sugeriam a presença de *C. dubliniensis*, conforme Tabela 9.

4.3.2.2 Complexo *C. parapsilosis* strictu sensu

O complexo *C. parapsilosis* strictu sensu engloba três espécies que apresentam perfil bioquímico similar. Na Tabela 10 estão vinte e quatro amostras que foram identificadas como *C. parapsilosis*, pelos métodos tradicionais. Os resultados do PCR e do sequenciamento estão descritos no Item 4.4.

Tabela 8: Perfil fisiológico de amostras identificadas como *Candida* spp não classificadas pelos métodos de identificação tradicional

ID		675	697	734	1017
Cromogênico		roxo	roxo	bege	roxo
Assimilação	Pep	Pos	Pos	Pos	Pos
	KNO ³	Neg	Neg	Neg	Neg
	Gli	Pos	Pos	Pos	Pos
	Ino	Neg	Neg	Neg	Neg
	Lac	Neg	Neg	Neg	Neg
	Dul	Pos	Neg	Pos	Neg
	Mal	Pos	Pos	Pos	Pos
	Raf	Pos	Pos	Pos	Neg
	Cel	Neg	Neg	Neg	Neg
	Mel	Neg	Neg	Neg	Neg
	Trea	Pos	Pos	Pos	Pos
	Xil	Pos	Pos	Neg	Pos
	Melz	Pos	Pos	Pos	Pos
Fermentação	Gli	Pos	Pos	Pos	Pos
	Lac	Neg	Neg	Neg	Neg
	Mal	Neg	Neg	Pos	Pos
	Sac	Neg	Neg	Pos	Pos
	Raf	Neg	Neg	Pos	Pos
	Trea	Neg	Neg	Pos	Pos
Crescimento	Citrato	Pos	Pos	Pos	Pos
	Ciclohex	Pos	Neg	Pos	Neg
	37°C	Pos	Pos	Pos	Pos
	45°C	Neg	Neg	Pos	Neg
Espécie		<i>Candida</i> spp	<i>Candida</i> spp	<i>Candida</i> spp	<i>Candida</i> spp

ID: identificação; Pep: peptona; KNO³: nitrato de potássio; Gli: glicose; Ino: inositol; sac: sacarose; Lac: lactose; Dul: dulcitol; Mal: maltose; Raf: rafinose; Cel: celobiose; Mel: melibiose; Trea: trealose; Xil: xilose; Melz: melizitose; Ciclohex: ciclohexemida; Pos: positivo; Neg: negativo
 Fonte: Moreira (2012)

Tabela 9: Características fenotípicas semelhantes de *C. dubliniensis*

Amostra	Cromogênico	45°C	Hipertônico
D673	verde	negativo	negativo
D697	verde	positivo	negativo
D810	verde	positivo	negativo
D897	verde	positivo	negativo
D931	verde	negativo	negativo
D940	verde	positivo	negativo
D954	verde	positivo	negativo
D965	verde	negativo	negativo
D973	verde	negativo	negativo
D981	verde	positivo	negativo
D1026	verde	positivo	negativo
D1041	verde	positivo	negativo
D1063	verde	positivo	negativo
D1082	verde	positivo	negativo

Fonte: Moreira (2012)

Essas amostras foram, então, selecionadas para a confirmação molecular de *C. dubliniensis*. Os resultados do PCR e do sequenciamento estão descritos no Item 4.4.

Tabela 10: Identificação de *C. parapsilosis* através de provas fisiológicas e características apresentadas em meio cromogênico

ID	Cromogênico	Espécie
671	azul	<i>C. parapsilosis</i>
674	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
680a	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
681	rosa	<i>C. parapsilosis</i>
682	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
687	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
689	branca	<i>C. parapsilosis</i>
699	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
703	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
710	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
742	n.c	<i>C. parapsilosis</i>
745	azul	<i>C. parapsilosis</i>
750	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
751	n.c	<i>C. parapsilosis</i>
756	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
772	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
778	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
834	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
874	azul	<i>C. parapsilosis</i>
936	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
945	n.c	<i>C. parapsilosis</i>
1039	roxa	<i>C. parapsilosis</i>
1043	n.c	<i>C. parapsilosis</i>
1048	branca	<i>C. parapsilosis</i>

ID: identificação; n.c: não apresentou crescimento; 680^a: duas amostras de uma mesma mulher

Fonte: Moreira (2012)

Nessas amostras também realizou-se o PCR da região ITS 1 e ITS 4, e o sequenciamento das regiões ITS1/ITS4 e D1/D2. Esses resultados estão descritos no Item 4.4.

4.4 PCR e Sequenciamento das *Candida* spp Seleccionadas para os Estudos Moleculares

Quarenta e um isolados foram seleccionados para realização das reações de PCR e sequenciamento, da região ITS 1 e 4. Sendo, *C. dubliniensis* (14), *Candida* spp (4), *C. parapsilosis* (23).

4.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A extração de DNA das leveduras foi realizada conforme descrito no item 3.5, em material e métodos. O DNA foi quantificado e diluído e, 40ng foi utilizado para a reação de PCR.

4.4.2 Amplificação da Região ITS pela Reação em Cadeia por Polimerase (PCR)

A Figura 16 mostra as bandas de amplificação de DNA da região ITS das leveduras.

Figura 16: Bandas exibidas por *Candida spp* em gel de agarose

Eletoforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da região ITS1 e ITS4 das diferentes leveduras. Gel A: **1 e 12.** Marcador 1Kb plus DNA Ladder **2.** ATCC *C. albicans* **3.** Amostra 1082- *C. albicans* **4.** Amostra 1017 - *C. parapsilosis*; **5.** Amostra *C. metapsilosis*; **6.** Cepa ATCC de *C. orthopsilosis*; **7:** Amostra 734- *C. haemulonii*; **8.** Amostra 804- *C. guilliermondii*; **9.** Amostra de *Pichia anomala*; **10.** Amostra de *Candida pararugosa*; **11.** Controle negativo; **12.** Marcador 1Kb plus DNA “Ladder”
Fonte: Moreira (2012)

Observa-se que os fragmentos de DNA obtidos na PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para amplificar a região ITS variou de 350 a 650 pares de bases (pb) sugerindo que há diferentes espécies entre os isolados.

4.5 Sequenciamento dos Produtos da PCR

Os produtos da PCR foram sequenciados, e as sequências obtidas foram analisadas com os programas “Sequencer 4.1.4” e foram analisadas no BLAST, que realiza a comparação entre as sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank e fornece dados quanto à homologia entre elas.

A Figura 16 e a Tabela 13 mostram os resultados das análises das sequências obtidas. Estão descritos os organismos com os quais foi encontrada homologia na região do respectivo número de acesso, o “**score**” e o valor de “E”.

O “score” indica o quanto o alinhamento foi satisfatório. Quanto maior for o valor de “score”, melhor o alinhamento. Em termos gerais, o “score” é calculado a partir de uma fórmula que considera o alinhamento de resíduos semelhantes ou idênticos, bem como, eventuais lacunas introduzidas ao alinhar as sequências.

O valor de E é um parâmetro que descreve a similaridade, ao acaso, entre as sequências. Ele é inversamente proporcional ao valor de “score”. Por exemplo, um valor de e igual a 1 pode significar que em um banco de dados de determinado tamanho espera-se encontrar alguma homologia com “score” similar simplesmente ao acaso. Isso significa que quanto menor o valor de E, ou mais próximo ao zero, maior a similaridade. Os resultados obtidos no sequenciamento estão descritos na Tabela 11.

Todos os isolados que apresentaram características fenotípicas de *C. dubliniensis* foram identificados como *C. albicans*, no sequenciamento. Dentre os isolados de *C. parapsilosis*, dois foram identificados como *C. metapsilosis*. Vale ressaltar que não há relatos dessa espécie, em secreção vaginal, no Brasil. As quatro amostras identificadas como *Candida spp*, nos testes bioquímicos foram identificadas como *C. haemulonii* pelo sequenciamento.

4.6 Identificação das leveduras

Após o sequenciamento, as identificações das 162 amostras estão descritas na Figura 17.

Tabela 11: Resultado do sequenciamento das amostras selecionadas

ID	Espécie	Letras	Acesso	Score	Cobertura	Valor de e	ID máx.
671	<i>C. parapsilosis</i>	529	GQ395610.1	970	100%	0.0	99%
673	<i>C. albicans</i>	540	FN652297.1	998	100%	0.0	100%
674	<i>C. parapsilosis</i>	524	FN652300.2	968	100%	0.0	100%
675	<i>C. haemulonii</i>	382	GQ402827.1	717	99%	0.0	99%
680	<i>C. parapsilosis</i>	524	FN652300.1	968	100%	0.0	100%
681	<i>C. parapsilosis</i>	524	FN652300.1	968	100%	0.0	100%
682	<i>C. parapsilosis</i>	524	FN652300.1	891	100%	0.0	97%
687	<i>C. metapsilosis</i>	533	AY391849.1	970	100%	0.0	99%
689	<i>C. metapsilosis</i>	534	AY391849.1	966	100%	0.0	99%
697	<i>C. haemulonii</i>	392	GQ402827	702	99%	0.0	99%
699	<i>C. parapsilosis</i>	581	GQ395610.1	1048	100%	0.0	99%
703	<i>C. parapsilosis</i>	524	FN652300.1	926	100%	0.0	98%
710	<i>C. parapsilosis</i>	524	FN652300.1	953	100%	0.0	99%
734	<i>C. haemulonii</i>	392	GQ402827	717	99%	0.0	99%
742	<i>C. parapsilosis</i>	524	FN652300.1	968	100%	0.0	100%
745	<i>C. parapsilosis</i>	526	EU564203	948	100%	0.0	99%
750	<i>C. parapsilosis</i>	524	FN652300.1	892	100%	0.0	99%
751	<i>C. parapsilosis</i>	571	GQ395610.1	1042	100%	0.0	99%
756	<i>C. parapsilosis</i>	524	FN652300.1	968	100%	0.0	100%
772	<i>C. parapsilosis</i>	524	EU564203.1	968	100%	0.0	100%
778	<i>C. parapsilosis</i>	523	EU564203.1	961	100%	0.0	99%
810	<i>C. albicans</i>	540	FN652297.1	998	100%	0.0	100%
834	<i>C. parapsilosis</i>	527	FN652300.1	953	100%	0.0	99%
874	<i>C. parapsilosis</i>	525	FN652300.1	963	100%	0.0	99%
897	<i>C. albicans</i>	541	FN652297.1	992	100%	0.0	99%
931	<i>C. albicans</i>	542	FN652297.1	977	100%	0.0	99%
936	<i>C. parapsilosis</i>	524	EU564203.1	957	100%	0.0	99%
940	<i>C. albicans</i>	540	FN652297.1	998	100%	0.0	100%
945	<i>C. albicans</i>	524	EU564203.1	968	100%	0.0	100%
954	<i>C. albicans</i>	543	FN652297.1	983	100%	0.0	99%
965	<i>C. albicans</i>	541	FN652297.1	992	100%	0.0	100%
973	<i>C. albicans</i>	539	AF455524.1	977	100%	0.0	99%
981	<i>C. albicans</i>	524	FN652297.1	987	100%	0.0	99%
1017	<i>C. haemulonii</i>	397	GQ402827.1	702	99%	0.0	99%
1026	<i>C. albicans</i>	540	FN652297.1	998	100%	0.0	100%
1039	<i>C. parapsilosis</i>	532	FN652300.1	924	100%	0.0	98%
1041	<i>C. albicans</i>	540	FN652297.1	971	100%	0.0	99%
1043	<i>C. parapsilosis</i>	524	EU564203.1	968	100%	0.0	100%
1048	<i>C. parapsilosis</i>	524	EU564203.1	963	100%	0.0	100%
1063	<i>C. albicans</i>	541	FN652297.1	992	100%	0.0	99%
1082	<i>C. albicans</i>	541	FN652297.1	987	100%	0.0	99%

Letras: número de nucleotídeos presentes na região ITS; ID: identidade Máx.: Máxima

Fonte: Moreira (2012)

Figura 17: Alinhamento dos nucleotídeos, gerados no Blast

Figura 18: Frequência de leveduras isoladas da região vulvovaginal, identificadas através de provas fisiológicas e sequenciamento

Fonte: Moreira (2012)

As quatro espécies mais frequentemente isoladas foram *C. albicans* < *C. parapsilosis* < *C. glabrata* < *C. tropicalis*.

4.6.1 Correlação Entre as Espécies e os grupos de Mulheres Assintomáticas, com CVV e com CVVR

A Figura 19 mostra a frequência das amostras, nos três grupos amostrais. Entre as amostras isoladas no grupo das assintomáticas, as espécies mais frequentemente isoladas foram *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *Rhodotorula* spp. Ao realizar uma comparação entre a frequência de isolamento de *C. albicans* com *C. parapsilosis*, $p < 0.0001$; os mesmos valores foram obtidos ao comparar *C. albicans*, com *C. glabrata* e *Rhodotorula* spp. Quando se comparou *C. glabrata* com *C. parapsilosis*, $p = 0.6375$. A diferença entre *C. parapsilosis* e *Rhodotorula* spp também não foi significativa $p = 0.00015$.

Figura 19: Frequência de leveduras, por grupo amostral

Fonte: Moreira (2012)

As espécies mais isoladas no grupo 1 foram *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Realizou-se a comparação entre a frequência dessas três espécies. Comparando-se *C. albicans* com *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, $p < 0.001$. Quando a comparação foi realizada entre *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, o valor de p foi $= 0.5291$.

No grupo 2, as quatro espécies mais isoladas foram *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Na análise entre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, o valor de p, pelo ANOVA foi $p < 0,001$. Ao comparar *C. glabrata* com *C. parapsilosis*, $p = 0.6061$ e, *C. glabrata* com *C. tropicalis* $p = 0.012$. A diferença entre *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foi pequena, neste grupo $p = 0.0029$.

Um fato interessante a ser notado é que *C. glabrata* não foi isolada no grupo CVV.

4.7 Produção de Exoenzimas

4.7.1 Proteinase

A produção de proteinase foi observada em 88% dos isolados. E, quando se avaliou a intensidade da produção, 63% foram fortemente produtores dessa enzima. A Figura 20 mostra o índice geral da produção de proteinase.

Figura 20: Índice de proteinase em todas as amostras

Índices: 1: Não produtor; 2. Produtor; 3. Fortemente produtor
Fonte: Moreira (2012)

Na Tabela 12 estão descritas a produção de proteinase, por espécie de levedura.

Tabela 12: Produção de proteinase, por espécie de levedura

Espécie	Índice		
	1	2	3
<i>C. albicans</i>	25,6% (21/82)	11,5% (7/82)	66,7% (54/82)
<i>C. glabrata</i>	20% (4/20)	15% (3/20)	65% (13/20)
<i>C. parapsilosis</i>	18,2%(4/22)	4,5% (1/22)	66,7% (17/22)
<i>C. tropicalis</i>	33,3% (3/9)	0	66,7% (6/9)
<i>C. kefyr</i>	0	0	100% (5/5)
<i>C. famata</i>	25% (1/4)	25% (1/4)	50% (2/4)
<i>C. guilliermondii</i>	25% (1/4)	50% (2/4)	25% (1/4)
<i>Rhodotorula spp</i>	75% (3/4)	0	25% (1/4)
<i>C. haemulonii</i>	25% (1/4)	50% (2/4)	25% (1/4)
<i>Trichosporon spp</i>	66,7% (2/3)	0	33,3% (1/3)
<i>C. krusei</i>	0	50% (1/2)	50% (1/2)
<i>C. metapsilosis</i>	0	100% (2/2)	
<i>C. lusitaniae</i>	100% (1/1)	0	

Fonte: Moreira (2012)

Entre as quatro espécies de *Candida* mais frequentemente isoladas, a maioria foi fortemente produtora de proteinase, com índices que variaram entre 65% e 67%. Dentre as espécies menos isoladas, a produção de proteinase também foi observada na maior parte destes. Já as leveduras não- *Candida*, como *Rhodotorula spp* e *Trichosporon spp* apresentaram pouca produção dessa enzima. Na Figura 21 está descrita a produção de proteinase, por grupo de mulheres.

Figura 21: Comparação da produção de proteinase, por grupo amostral

Fonte: Moreira (2012)

4.7.2 Correlação entre proteinase e o grupo amostral

Apesar da maior quantidade de produção de proteinase, no grupo das CVV, a análise da expressão de proteinase, pelo método Kruskal Wallis, dos três grupos amostrais não revelou que diferença estatisticamente entre eles. A análise da correlação entre a produção de proteinase, por grupo e por espécie também não revelou diferenças nos três grupos amostrais.

4.7.3 Correlação entre a produção de proteinase, as espécies e os grupos amostrais

Para esse experimento considerou-se as amostras como produtoras e não produtoras de proteinase. A primeira análise foi realizada entre a produção dessa enzima. No grupo das assintomáticas, a correlação foi possível entre *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. No grupo 1 a correlação entre a produção de proteinase foi realizada entre as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* ($p=0.0146$), pelo ANOVA. Através do teste de análise multivariada, Kruskal Wallis, a análise entre os grupos e as espécies não detectou diferença estatisticamente significativo entre eles.

Para as leveduras do grupo 2, o valor de $p=0.9746$, entre os grupos e as espécies. Ao se pretender fazer uma análise geral de espécies, produção de proteinase e grupos, não foi observada diferença estatisticamente significativa (Figura 22).

Figura 22: Produção de proteinase por espécies pertencente ao grupo das assintomáticas

Leveduras do grupo das assintomáticas **1.** *C. albicans*; **4.** *C. glabrata*; **7.** *C. parapsilosis*; ns: não significativa
 Fonte: Moreira (2012)

Figura 23: Produção de proteinase por espécies pertencente ao grupo das CVV

Leveduras isoladas no grupo das CVV: **2.** *C. albicans*; **8.** *C. parapsilosis*; **11.** *C. tropicalis* **14.** *C. famata*.

Fonte: Moreira (2012)

Figura 24: Produção de proteinase por espécies pertencente ao grupo das CVVRs

Leveduras isoladas no grupo das CVVRs 3. *C. albicans*; 6. *C. glabrata*; 9. *C. parapsilosis*; 12. *C. tropicalis*; 18. *C. kefyi*; 21. *C. haemulonii*; 23. *C. metapsilosis*.
Fonte: Moreira (2012)

4.8 Fosfolipase

A produção de fosfolipase foi avaliada nos 162 isolados. Os resultados estão descritos na Figura 25.

Figura 25: Índice geral de produção de fosfolipase pelas espécies de leveduras

Índices 1. Não produtor; 2. Produtor; 3. Fortemente produtor de proteinase
 Fonte: Moreira (2012)

A produção de fosfolipase ocorreu em trinta e nove por cento das amostras. A Tabela 13 traz os resultados da atividade fosfolipídica das 162 espécies de leveduras isoladas de conteúdo vaginal.

Tabela 13: Produção de fosfolipase, por índice e por espécie

Fosfolipase	Índice		
	1	2	3
<i>C. albicans</i>	46,9% (38/82)	30,5% (25/82)	23,2% (19/82)
<i>C. glabrata</i>	90% (18/20)	10% (2/20)	
<i>C. parapsilosis</i>	86,3 (19/22)	4,5% (1/22)	9,9% (2/22)
<i>C. tropicalis</i>	55,5% (5/9)	33,3% (3/9)	11,1% (1/9)
<i>C. kefyr</i>	40% (2/5)	40% (2/5)	20% (1/5)
<i>C. famata</i>	50% (2/4)	25% (1/4)	25% (1/4)
<i>C. guilliermondii</i>	75% (3/4)	25% (1/4)	
<i>Rhodotorula spp</i>	75% (3/4)	25% (1/4)	
<i>C. haemulonii</i>	100% (4/4)		
<i>Trichosporon spp</i>	66,6% (2/3)		33,3% (1/3)
<i>C. krusei</i>	100% (2/2)		
<i>C. metapsilosis</i>	100% (2/2)		
<i>C. lusitaniae</i>	100% (1/1)		

Fonte: Moreira (2012)

A produção de fosfolipase foi notada em 53.7% dos isolados de *C. albicans*, enquanto 90% dos isolados de *C. glabrata* não produziu essa enzima. Dentre as amostras de *C. parapsilosis*, 86,3% não foram produtores de fosfolipase e, mais da metade dos isolados de *C. tropicalis* não produziram essa enzima.

4.8.1 Correlação entre a produção de fosfolipase, as espécies e os grupos amostrais

Como praticamente metade dos isolados não foram produtores de fosfolipase, (47,3%) optou-se por realizar duas correlações: entre as amostras produtoras de fosfolipase e entre as amostras não produtoras dessa enzima.

As espécies mais produtoras de fosfolipase foram: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Não foram observadas diferenças entre a atividade fosfolipásica dos isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Porém, *C. albicans* foi mais produtora de fosfolipase do que *C. parapsilosis* ($p=0.0679$).

A realização da análise dos grupos amostrais, por espécie, somente foi possível a entre os isolados de *C. albicans* pertencentes aos três grupos amostrais. Quando se comparou a produção de fosfolipase pelos isolados do grupo das assintomáticas e das CVV, uma pequena diferença foi observada ($p=0.0172$); comparando-se o grupo das CVV com o das CVVR, não se observou diferenças estatisticamente significativas ($p=0,0052$). A maior diferença foi observada entre o grupo das assintomáticas e das CVVRs ($p=0.5869$). Na Figura 25 há a comparação entre a produção de fosfolipase, nos três grupos amostrais.

Figura 26: Comparação da produção de fosfolipase, pelos grupos amostrais

1. *C. albicans*, grupo das assintomáticas; 2. *C. albicans*, grupo das CVV; 3. *C. albicans*, grupo das CVVRs

Fonte: Moreira, (2012)

A avaliação da não produção de fosfolipase apontou que as espécies que menos produziram fosfolipase foram *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* e *C. guilliermondii*.

A maior diferença estatística foi observada entre a não produção de fosfolipase pelas amostras de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* ($p=0.1589$).

4.9 Sensibilidade aos antifúngicos

4.9.1 “Etest”

A sensibilidade dos 162 isolados foi testada, pelo método de “Etest”, frente as seguintes drogas: anfotericina B, cetoconazol, caspofungina, voriconazol, fluconazol e itraconazol. Os resultados estão sintetizados na Tabela 14 e na Tabela 15 há a diferenciação dos CIM, por espécies de leveduras..

Tabela 14: Valores de CIM apresentados amostras de leveduras pelo método do Etest

Antifúngico	CIM médio	CIM 50	CIM 90	Variação CIM	S	R	SDD
Anfotericina B	1,19	0,057	1,47	0,002 - 32	91,3	8,64	
Cetoconazol	1,12	0,007	0,013	0,002 - 32	96,91	3,09	
Caspofungina	2,77	0,149	9,5	0,002 - 32	91,35	8,64	
Voriconazol	1,45	0,006	0,125	0,002 - 32	95,68	4,32	2,27
Fluconazol	13,03	0,121	2,52	0,002 - 256	95,06	4,94	
Itraconazol	1,77	0,566	14,72	0,002 - 32	87,04	12,96	11,11

CIM: Concentração Inibitória Mínima; S: Sensível; R: Resistente; SDD:
Sensibilidade dose dependente
Fonte: Moreira (2012)

Frente a anfotericina B, o valor médio de concentração inibitória mínima foi de 1,189µg/mL. A resistência a essa droga foi notada em 8,64% dos isolados; frente ao cetoconazol, o CIM médio foi de 1,123µg/mL e a resistência foi observada em 3,09% dos isolados; frente a caspofungina, o CIM médio foi de 2,77µg/mL e a não sensibilidade observada foi de 8,64%. Em relação ao voriconazol, 4,32% dos isolados foram considerados resistentes e 2,42% apresentaram sensibilidade dependente da dose. O CIM médio do fluconazol foi de 13,03µg/mL e, a resistência foi notada em 4,94% dos isolados. Os isolados apresentaram maior resistência ao itraconazol, com 12,96% e 11,11% foram considerados como sensibilidade dose dependente. O CIM médio foi de 1,76µg/mL.

Tabela 15: Variação de CIM₅₀ e CIM₉₀, sensibilidade e resistência de isolados de leveduras

Antifúngico	Espécie	CIM medio	CIM 50	CIM 90	Variação CIM S	R	SDD	NS
Anf B	<i>C. albicans</i>	0.064	0.003	0.447	0.002-32	100	0	
	<i>C. glabrata</i>	7.957	0.190	32.000	0.002-32	75	25	
	<i>C. parapsilosis</i>	2.990	0.100	1.478	0.006-32	91	9	
	<i>C. tropicalis</i>	0.247	0.047	0.016	0.002-2	89	11	
	<i>C. kefir</i>	6.450	0.016	0.032	0.016-32	80	20	
	<i>C. famata</i>	2.028	0.004	0.094	0.004-8	75	25	
	<i>C. guilliermondii</i>	0.040	0.016	0.047	0.032-0.047	100	0	
	<i>Rhodotorula spp</i>	8.563	0.006	8.340	0.125-2	50	50	
	<i>C. haemulonii</i>	8.037	0.033	0.058	0.002-32	75	25	
	<i>Trichosporon spp</i>	1.380	0.180	0.562	0.0016-4	67	33	
	<i>C. krusei</i>	0.044	0.023	0.044	0.023 - 0.064	100	0	
	<i>C. metapsilosis</i>	0.014	0.012	0.016	0.012-0.016	100	0	
	<i>C. lusitaniae</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	100	0	
Cet	<i>C. albicans</i>	0.980	0.007	0.013	0.002-32	98	2	
	<i>C. glabrata</i>	2.174	0.034	0.250	0.002-32	95	5	
	<i>C. parapsilosis</i>	1.478	0.044	2.336	0.003-32	95	5	
	<i>C. tropicalis</i>	0.226	0.013	0.096	0.002-2	100	0	
	<i>C. kefir</i>	0.809	0.013	0.192	0.002-4	100	0	
	<i>C. famata</i>	8.250	0.002	1.000	0.002-32	75	25	
	<i>C. guilliermondii</i>	0.011	0.002	0.012	0.002-0.016	100	0	
	<i>Rhodotorula spp</i>	0.006	0.004	0.018	0.004-0.012	100	0	
	<i>C. haemulonii</i>	0.075	0.002	0.139	0.002-0.023	100	0	
	<i>Trichosporon spp</i>	5.463	0.566	1.719	0.008-16	67	33	
	<i>C. krusei</i>	0.070	0.125	0.250	0.25	100	0	
	<i>C. metapsilosis</i>	0.070	0.006	0.008	0.006-0.008	100	0	
	<i>C. lusitaniae</i>	0.040	0.004	0.004	0.004	100	0	
Casp	<i>C. albicans</i>	1.357	0.127	2.350	0.002-32	96	4	
	<i>C. glabrata</i>	2.290	0.164	0.780	0.012-32	95	5	
	<i>C. parapsilosis</i>	4.193	0.316	0.750	0.032-32	82	18	
	<i>C. tropicalis</i>	0.256	0.146	0.355	0.002-1	100	0	
	<i>C. kefir</i>	6.550	0.220	0.835	0.023-32	80	20	
	<i>C. famata</i>	0.161	0.125	0.519	0.012-0.018	100	0	
	<i>C. guilliermondii</i>	0.500	0.250	0.792	0.25-1	100	0	
	<i>Rhodotorula spp</i>	16.400	0.002	2.600	0.125-32	75	25	
	<i>C. haemulonii</i>	8.173	0.002	0.005	0.002-32	100	0	
	<i>Trichosporon spp</i>	21.349	24.000	32.000	0.047-32	33	67	
	<i>C. krusei</i>	0.250	0.030	0.125	0.016 - 0.125	100	0	
	<i>C. metapsilosis</i>	0.220	0.190	0.250	0.19-0.25	100	0	
	<i>C. lusitaniae</i>	0.380	0.380	0.380	0.38	100	0	
Vor	<i>C. albicans</i>	1.245	0.005	0.187	0.002-32	96	4	
	<i>C. glabrata</i>	2.142	0.003	0.050	0.002-32	95	5	
	<i>C. parapsilosis</i>	2.914	0.005	0.015	0.002-32	91	9	
	<i>C. tropicalis</i>	0.229	0.007	0.128	0.002-2	89	11	
	<i>C. kefir</i>	6.406	0.004	0.192	0.002-32	80	20	
	<i>C. famata</i>	0.005	0.004	0.007	0.004-0.008	100	0	
	<i>C. guilliermondii</i>	0.002	0.003	0.038	0.002-0.006	100	0	
	<i>Rhodotorula spp</i>	0.675	0.012	3.106	0.012-1.5	75	25	
	<i>C. haemulonii</i>	0.003	0.002	0.004	0.002-0.004	100	0	
	<i>Trichosporon spp</i>	0.001	0.006	0.009	0.006-0.016	100	0	
	<i>C. krusei</i>	0.187	0.006	0.125	0.125	100	0	
	<i>C. metapsilosis</i>	0.006	0.003	0.006	0.003-0.006	100	0	
	<i>C. lusitaniae</i>	0.016	0.016	0.016	0.016	100	0	
Fluc	<i>C. albicans</i>	6.660	0.684	0.698	0.003-256	96	2	1
	<i>C. glabrata</i>	17.310	0.050	0.500	0.008-256	95	5	
	<i>C. parapsilosis</i>	11.970	0.069	2.426	0.016-256	95	5	
	<i>C. tropicalis</i>	0.775	0.258	0.676	0.002-6	100	0	
	<i>C. kefir</i>	51.820	0.172	6.740	0.094-256	80	20	
	<i>C. famata</i>	0.188	0.094	0.141	0.064-0.5	100	0	
	<i>C. guilliermondii</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	100	0	
	<i>Rhodotorula spp</i>	192.300	0.750	256.000	1.5-256	25	75	
	<i>C. haemulonii</i>	0.362	0.003	0.080	0.003-1	100	0	
	<i>Trichosporon spp</i>	0.346	0.370	0.450	0.003-1	100	0	
	<i>C. krusei</i>	4.000	2.000	3.800	0.064-0.5	100	0	
	<i>C. metapsilosis</i>	0.188	0.125	0.250	0.125-0.25	100	0	
	<i>C. lusitaniae</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	100	0	
Itra	<i>C. albicans</i>	1.370	0.049	1.579	0.002-32	83	9	9
	<i>C. glabrata</i>	2.300	0.032	0.500	0.006-32	95	5	
	<i>C. parapsilosis</i>	3.097	0.085	26.130	0.004-32	77	18	5
	<i>C. tropicalis</i>	0.187	0.102	0.154	0.002-1.5	89	11	
	<i>C. kefir</i>	6.454	0.039	0.690	0.012-32	80	20	
	<i>C. famata</i>	0.060	0.004	0.074	0.004-0.19	75	25	
	<i>C. guilliermondii</i>	1.000	0.250	0.300	0.25-2	50	50	
	<i>Rhodotorula spp</i>	6.657	0.250	6.212	0.25-24	50	50	
	<i>C. haemulonii</i>	0.022	0.002	0.028	0.002-0.064	100	0	
	<i>Trichosporon spp</i>	0.750	0.006	1.125	0.125-2	67	33	
	<i>C. krusei</i>	0.315	0.250	0.250	0.25-0.38	100	0	
	<i>C. metapsilosis</i>	0.008	0.008	0.380	0.008	100	0	
	<i>C. lusitaniae</i>	0.064	0.064	0.064	0.064	100	0	

Anf B: Anfotericina B; Cet: Cetoconazol; Casp: Caspofungina; Vor: Voriconazol; Fluc: Fluconazol; Itra: Itraconazol;
 CIM: Concentração inibitória mínima; S: Sensível; R: Resistência; SDD: Sensibilidade dose dependente; NS: Não sensível

Fonte: Moreira (2012)

4.9.2 Microdiluição (Eucast Edef7.1 e CLSI)

As amostras que foram consideradas resistentes ou sensibilidade intermediária aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e fluconazol, pelo “Etest” foram submetidas a ensaios de microdiluição (EUCAST EDef7.1 e CLSI M27S3). Tendo o método do CLSI M27S3 como método de referência. Os resultados encontram-se descritos nos itens abaixo.

4.9.3 Resistência a anfotericina B

Dez isolados foram considerados como resistentes pela técnica do “Etest” e, selecionados para a realização das técnicas de microdiluição (EUCAST Edef7.1 e CLSIM27S3). Os resultados estão descritos nas Tabelas 16, 17 e 18.

Tabela 16: Comparação dos resultados obtidos pelo “Etest” com os demais métodos para a anfotericina B

Amostra	Espécie	Etest	Classif.	EUCAST Edef7.0	Classif.	CLSIM27S3	Classif.
669	<i>Rhodotorula spp</i>	32	R	0.25	S	0.5	S
696	<i>C. glabrata</i>	6	R	0.5	S	1	S
697	<i>C. haemulonii</i>	32	R	0.25	S	0.5	S
698	<i>C. kefyr</i>	32	R	0.5	S	1	S
723	<i>C. glabrata</i>	16	R	0.5	S	1	S
742	<i>C. parapsilosis</i>	32	R	0.5	S	1	S
747	<i>C. glabrata</i>	32	R	1	S	1	S
750	<i>C. parapsilosis</i>	32	R	1	S	1	S
780	<i>C. glabrata</i>	32	R	0.25	S	1	S
1046	<i>Trichosporon spp</i>	4	R	0.25	S	0.5	S

Classif.: Classificação; S: Sensível; R: resistente

Fonte: Moreira (2012)

Todos os isolados que haviam sido considerados resistentes, a anfotericina B forma sensíveis a anfotericina B, pelas duas técnicas de microdiluição.

4.9.4 Resistência ao itraconazol

Os vinte e nove isolados considerados resistentes ou sensibilidade dose dependente, ao itraconazol, pela técnica de difusão em ágar “Etest” foram submetidos aos ensaios de microdiluição. Os resultados estão na Tabela 17.

Dentre os isolados considerados SDD, no Etest, 57,6% (8/14) foram sensíveis, nos dois métodos de microdiluição; 3 foram considerados como SDD, no Eucast e sensíveis no CLSI e três foram SDD nos três métodos. Dentre os quinze isolados resistentes ao itraconazol, pelo Etest, 53% (8/15) foram sensíveis aos dois métodos de microdiluição; 3 foram SDD nos dois métodos de microdiluição; 3 foram SDD no Eucast e sensíveis, no Etest e um isolado foi resistente, nos três métodos.

Ao final desses experimentos, tendo os ensaios de microdiluição (CLSIM27S3), como referência, conclui-se que seis isolados (3,7%) foram considerados como sensibilidade dose dependente (SDD) e um isolado foi resistente ao itraconazol.

Dos seis isolados SDD, um foi de *C. albicans*; 2 *C. glabrata*; 1 de *C. guilliermondii*; 1 de *C. parapsilosis* e 1 *Trichosporon* spp. Um isolado que foi resistente foi de *C. glabrata*.

4.9.5 Resistência ao fluconazol

Doze isolados foram considerados resistentes ou SDD ao fluconazol, pelo “Etest” foram testados pelos dois métodos de microdiluição. Os resultados estão na Tabela 18.

Oito dos doze resistentes, ao fluconazol, pelo Etest, seis foram sensíveis nos dois métodos de microdiluição; dois foram resistentes, no Eucast. No CLSI, um foi considerado como SDD e um sensível a esse antifúngico.

Tabela 17: Perfil de sensibilidade dose dependente e resistência ao itraconazol das 29 amostras frente aos três métodos

ID	Espécie	Etest	Classif.	EUCAST	Edef7.0	Classif.	CLSIM27S3	Classif.
691	<i>C. albicans</i>	0,125	SDD	0,12		S	0,06	S
698	<i>C. kefir</i>	32	R	0,25		SDD	0,125	S
703	<i>C. parapsilosis</i>	2	R	0,5		SDD	0,25	SDD
717	<i>C. albicans</i>	32	R	0,015		S	0,015	S
731	<i>C. albicans</i>	1,5	R	0,25		SDD	0,12	S
742	<i>C. parapsilosis</i>	32	R	0,06		S	0,03	S
755	<i>C. guilliermondii</i>	0,25	SDD	0,5		SDD	0,25	SDD
762	<i>C. albicans</i>	0,25	SDD	0,12		S	0,06	S
780	<i>C. glabrata</i>	32	R	4		R	4	R
793	<i>C. albicans</i>	0,19	SDD	0,25		SDD	0,12	S
795	<i>C. albicans</i>	0,125	SDD	0,12		S	0,12	S
798	<i>C. glabrata</i>	1,5	R	0,5		SDD	0,25	SDD
800	<i>C. albicans</i>	0,125	SDD	0,5		SDD	0,25	SDD
804	<i>C. guilliermondii</i>	2	R	0,25		SDD	0,12	S
822	<i>C. albicans</i>	0,25	SDD	0,12		S	0,06	S
897	<i>C. albicans</i>	0,19	SDD	0,12		S	0,12	S
921	<i>C. krusei</i>	0,25	SDD	0,03		S	0,03	S
928	<i>C. albicans</i>	32	R	0,12		S	0,03	S
940	<i>C. albicans</i>	0,125	SDD	0,25		SDD	0,12	S
945	<i>C. parapsilosis</i>	32	R	0,06		S	0,06	S
946	<i>C. albicans</i>	32	R	0,06		S	0,03	S
963	<i>C. albicans</i>	0,125	SDD	0,25		SDD	0,12	S
974	<i>Rhodotorula</i>	2	R	0,12		S	0,06	S
996	<i>Trichosporon spp</i>	0,125	SDD	0,5		SDD	0,25	SDD
1010	<i>C. albicans</i>	1,5	R	0,12		S	0,06	S
1023	<i>C. albicans</i>	1	R	0,06		S	0,03	S
1040	<i>C. glabrata</i>	2	R	0,5		SDD	0,25	SDD
1045	<i>C. albicans</i>	0,25	SDD	0,12		S	0,06	S
1047	<i>C. albicans</i>	0,19	SDD	0,06		S	0,03	S

Classif.: Classificação; S: sensível; SDD: sensibilidade dose dependente; R: resistente
Fonte: Moreira (2012)

Tabela 18: Perfil de sensibilidade dose dependente e resistência ao fluconazol das 12 amostras frente aos três métodos

ID	Espécie	Etest	Classif.	EUCAST Edef7.0	Classif.	CLSIM27S3	Classif.
674	<i>C. parapsilosis</i>	16	SDD	8	R	16	SDD
698	<i>C. kefyr</i>	256	R	0.25	S	0.125	S
717	<i>C. albicans</i>	256	R	0.12	S	0.12	S
742	<i>C. parapsilosis</i>	256	R	0.5	S	0.25	S
775	<i>C. glabrata</i>	256	R	16	R	16	SDD
780	<i>C. glabrata</i>	16	SDD	16	R	16	SDD
922	<i>C. krusei</i>	16	SDD	32	R	16	SDD
946	<i>C. albicans</i>	256	R	0.5	S	0.25	S
974	<i>Rhodotorula spp</i>	256	R	0.25	S	0.12	S
977	<i>Rhodotorula spp</i>	256	R	0.25	S	0.12	S
1040	<i>C. glabrata</i>	16	SDD	8	R	4	S
1044	<i>Rhodotorula spp</i>	256	R	8	R	4	S

ID: Identificação; Classif.: Classificação; S: Sensível; SDD: Sensibilidade dose dependente; R: resistente

Fonte: Moreira (2012)

Os quatro isolados SDD no Etest foram resistentes no Eucast e, três foram SDD no CLSI, concordando com o Etest.

Após a realização dos ensaios de microdiluição, tendo o CLSIM27S3, as amostras consideradas SDD ou R, por grupo e espécie foram analisadas. Os resultados estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19: Perfil das amostras que apresentaram resistência ou sensibilidade dose dependente, através do método de referência: CLSIM27S3

	ID	Espécie	Classif.	Grupo
Fluconazol	674	<i>C. parapsilosis</i>	SDD	CVVR
	775	<i>C. glabrata</i>	SDD	CVVR
	780	<i>C. glabrata</i>	SDD	CVVR
	922	<i>C. krusei</i>	SDD	CVVR
	1040	<i>C. glabrata</i>	R*	Assintomática
	1044	<i>Rhodotorula spp</i>	R*	Assintomática
Itraconazol	703	<i>C. parapsilosis</i>	SDD	Assintomática
	755	<i>C. guilliermondii</i>	SDD	CVV
	780	<i>C. glabrata</i>	R	CVVR
	798	<i>C. glabrata</i>	SDD	CVVR
	800	<i>C. albicans</i>	SDD	CVV
	996	<i>Trichosporon spp</i>	SDD	CVVR
	1040	<i>C. glabrata</i>	SDD	Assintomática

* Isolados R no Etest e no Eucast

ID: Identificação; Classif.: Classificação; SDD: Sensibilidade dose dependente; R: Resistente

Fonte: Moreira (2012)

A sensibilidade dependente da dose, ao fluconazol foi observada em quatro isolados, pertencentes ao grupo das CVVR. Dois isolados foram considerados sensíveis ao CLSI porém, apresentaram elevados valores de CIM e, no Eucast foram resistentes.

Três isolados de *C. glabrata* apresentaram sensibilidade reduzida ao itraconazol, inclusive, o isolado 780 foi resistente a esse antifúngico. Este mesmo isolado já se apresentara SDD ao fluconazol. E, outro, de *C. glabrata* (1040), pertencente ao grupo das assintomáticas, também apresentou sensibilidade reduzida aos dois antifúngicos.

4.10 Perfil genotípico

4.10.1 Tipagem molecular das leveduras isoladas

Para o cálculo do número de amostras, para realização da cariotipagem adotou-se os valores de 5% de erro amostral, intervalo de confiança de 90%, com percentual máximo de 10%, entre as amostras, obtendo-se o número de 64 isolados. Sendo 42 *C. albicans*; 7 *C. glabrata*; 3 *C. kefir*, 8 *C. parapsilosis* e 4 *C. tropicalis*.

4.10.2 Estimativa do peso molecular das bandas de *Candida Spp*

As bandas das amostras analisadas variaram entre 275kb a 4100kb. A figura 25 exibe a documentação fotográfica de um gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio. A Figura 25 traz uma representação fotográfica de um gel.

Foram realizadas duas análises: uma análise visual, na qual realizou-se a contagem das bandas, com auxílio do “software” e outra com a construção de dendograma, realizado com auxílio do programa “Bionumerics”, com a finalidade de se verificar a similaridade entre os isolados.

Figura 26: Perfil cromossômico de diferentes isolados de *Candida spp*, através do PFGE em gel de agarose a 0,8%

Eletroforese em gel de agarose. 1) Padrão de peso molecular (*Saccharomyces cerevisiae*, de 225 a 2.200kb (Bio Rad/USA) ; 2) ATCC *C. albicans* 64548; 3) 691: *C. albicans*; 4) 656: *C. glabrata*; 5) 946: *C. albicans*; 6) 688: *C. albicans*; 7) 716: *C. albicans*; 8) 866: *C. albicans*; 9) 684: *C. albicans*; 10) 657: *C. glabrata*; 11) 680: *C. parapsilosis*; 12) 793: *C. albicans*; 13) 762: *C. albicans*; 14. Controle negativo.
Fonte: Moreira (2012)

As Figuras 27 a 32 mostram os dendogramas realizados nas espécies de *Candida spp*. A Figura 30 a apresenta o número e a variação do peso molecular das

bandas dos isolados de *C. albicans*. A maior parte dos isolados apresentara entre seis e oito bandas, com variação de peso molecular entre 275 a 4100kb.

Figura 27: Dendograma dos isolados de *Candida glabrata*, a partir das bandas eletroforéticas

Fonte: Moreira (2012)

Figura 28: Dendograma dos isolados de *Candida kefyr*, a partir das bandas eletroforéticas

Fonte: Moreira (2012)

Figura 29: Dendograma dos isolados de *Candida tropicalis*, a partir das bandas eletroforéticas

Fonte: Moreira (2012)

Figura 30: Dendrograma dos isolados de *Candida albicans*, a partir das bandas eletroforéticas

Fonte: Moreira (2012)

Figura 31: Dendograma dos isolados de *Candida parapsilosis*, a partir das bandas eletroforéticas

Fonte: Moreira (2012)

Tabela 20: Informações gerais sobre as espécies e o PFGE

Espécie	Peso molecular	Bandas	nº
<i>C. albicans</i>	4100kb - 275kb	9	3
		8	8
		7	10
		6	12
		5	3
		4	6
<i>C. glabrata</i>	2800kb - 275kb	10	1
		9	2
		8	4
<i>C. kefyr</i>	4100kb - 300kb	5	1
		7	2
<i>C. parapsilosis</i>	2500kb - 275kb	11	1
		9	1
		8	3
		6	3
<i>C. tropicalis</i>	3400kb - 300kb	4	2
		9	2

Kb: quilobases

Fonte: Moreira (2012)

Embora a análise visual pudesse sugerir que poderia haver isolados semelhantes, análise realizada através de dendograma indica que não foram observadas similaridade (>90%) entre as cepas analisadas, ou seja, cada uma das 42

amostras apresentavam perfis de cariotipos próprios. A maior similaridade foi de 77.4 e, ambos eram pertencentes ao grupo das primárias.

A maior parte dos isolados de *C. glabrata* apresentaram 8 bandas de cromossomos. O dendograma dessa espécie mostra que os isolados não apresentaram similaridade.

A análise do dendograma mostra que não houve similaridade entre os isolados de *C. kefyr* e a análise visual mostrou que 2 isolados apresentaram o mesmo número de bandas cromossômicas.

Embora a análise visual dos isolados de *C. tropicalis* sugerisse que poderia haver a similaridade entre os isolados, a análise do dendograma apontou que há uma grande distancia entre todos os isolados. O mesmo fato foi observado entre os isolados de *C. parapsilosis*.

5 DISCUSSÃO

A vagina é um ecossistema com biotipo original que apresenta características próprias, de acordo com a ecologia. Este ecossistema é dinâmico, mas possui um equilíbrio tênue. A alteração deste pode levar a uma infecção do trato genital feminino, ou a uma vaginite (KARAGOZOV et al., 2004).

O diagnóstico dessas infecções é frequentemente realizado com base nos sinais e sintomas clínicos (LANDERS et al., 2004), contudo, não realização de exames auxiliares pode ser passiva de erros, as mulheres podem ser portadoras de vários agentes etiológicos, como vírus, bactérias ou fungos ou mesmo um misto de micro-organismos.

No presente estudo observamos que 62% das mulheres que apresentavam queixa de desconforto vaginal (prurido ou leucorréia abundante), 64% apresentaram diagnóstico confirmado de leveduras (Gram e cultura positivos). Dentre as demais mulheres, 23.7% apresentavam vaginose bacteriana e 12.3% apresentaram vaginose inespecífica

A proporção de isolamento dos principais agentes etiológicos das infecções vaginais varia de acordo com os países em que os estudos são realizados. Nos Estados Unidos da América, Levi et al. (2011) analisaram 431 casos de infecções vaginais e, através da realização de Papanicolao e obtiveram 42,5% de vaginose bacteriana, 16,2% de *Candida spp* e 2,3% de *Trichomonas vaginalis*. Na Itália, Casari et al. (2010) através da utilização de oligonucleotídeos específicos para *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis* e *Candida spp* detectaram 26,7% de *Gardnerella vaginalis*, 12,1% com *Candida spp* 21% de outras bactérias associadas. Na Austrália, McClelland et al. 2006 encontraram *Candida spp* em 10% das 1570 amostras de conteúdo vaginal analisados.

Na Turquia, Buykbayrak et al. (2010) analisaram 460 mulheres, com queixa de desconforto vaginal. De acordo com os autores, 59,8% apresentaram diagnóstico clínico de vulvovaginites e, 36% apresentaram confirmação microbiológica. Dessas, 17,4% apresentaram *Candida spp* e 10,2% *Gardnerella vaginalis*. Esses dados fizeram com que esse autor sugerisse que o diagnóstico laboratorial é insuficiente para confirmação de infecções vaginais. No entanto, o baixo número de isolamento pode ser atribuído às técnicas utilizadas no estudo.

Esta variação na proporção de isolamentos pode estar associada aos diferentes hábitos de vida, adotados pelas mulheres ao redor do mundo e às diferentes técnicas seguidas pelos laboratórios para realização das análises.

De acordo com Masata et al. (2010) o exame microscópico do material clínico corado pelo método de Gram é o “gold standard” para o diagnóstico do agente causador das infecções vaginais, por ser um método rápido. No presente estudo, essa ferramenta apresentou 75% de especificidade para o diagnóstico de leveduras, corroborando com essa observação. Essa especificidade associada aos sinais e sintomas clínicos pode ser extremamente útil para detectar não só a presença de *Candida spp*, como também detectar plurietiologias, como a associação entre leveduras e bactérias.

A coloração do esfregaço pelo método de Gram não substitui a realização da cultura, pois esta apresenta maior acurácia para o diagnóstico de candidíase vulvovaginal e é indicada para os casos em que a mulheres apresentam sinais clínicos de CVV, quando, não é possível observar a presença da levedura, no esfregaço corado pelo método de Gram (SOBEL, 2007). Além disso, a realização da cultura possibilita a obtenção de isolados, que poderão ser identificados e, em casos de falha terapêutica, permite a realização de testes de suscetibilidade “in vitro” aos antifúngicos (DAN et al., 2002).

Em nosso estudo, dez por cento das pacientes, com cultura positiva para leveduras apresentaram associação com bactérias, na coloração do esfregaço pelo método de Gram. Dados semelhantes foram obtidos por Hetticarachchi et al. (2010) em que os autores observaram essa associação em 6% dos isolados. Como as bactérias e os fungos são patógenos oportunistas, para Soll (2006), não há nada de surpreendente no fato de encontrá-los associados, nos locais de infecção. Na maior parte dos casos, não é possível afirmar qual o micro-organismo que foi o responsável pela infecção primária e qual está aproveitando a disponibilidade de nutrientes existente (SOLL, 2006). Contudo, alguns autores, como McClelland et al. (2009), sugerem que algumas bactérias produzem toxinas, que poderiam ser tóxicas para o desenvolvimento fúngico, entretanto, baixos níveis de Interleucina (IL-8) poderiam atenuar a agressividade dos neutrófilos tornando possível a associação fungo/bactéria.

O equilíbrio entre as bactérias e os fungos, especialmente, *Candida spp* na microbiota de indivíduos saudáveis tem sido sugerido como responsável por diminuir a colonização de *Candida spp* e levando ao desenvolvimento da infecção após a realização de tratamentos com antibacterianos, em especial as tetraciclinas. A colonização induzida por medicamentos em locais como boca, vagina e fezes tem sido amplamente reportada na literatura e, acredita-se que são resultantes da diminuição das bactérias que são competidoras por nutrientes e que podem diminuir o crescimento de *Candida spp*. Acredita-se que as bactérias anaeróbias sejam as principais competidoras. Estudo realizado por Samon et al. (1993), mostraram em que pacientes que receberam doses de antibióticos de largo espectro, houve uma supressão das bactérias anaeróbias e, conseqüentemente, ocorreu aumento da colonização por *Candida spp*, após algumas semanas após o fim do tratamento.

A presença de leveduras, em nosso estudo foi significativa. Das 258 mulheres que participaram do estudo, 61.2% (158/168) apresentaram cultura positiva para leveduras. Na literatura vários estudos corroboram com os nossos achados. No Brasil, Moreira e Paula (2006) obtiveram 63% de positividade, na cultura, entre as mulheres com sintomas clínicos de candidíase vulvovaginal. Holanda et al. (2007) observaram que 46.7% das mulheres apresentaram cultura positiva para leveduras. Ainda no Brasil, Correa et al. (2009), observaram que 39% das mulheres examinadas, em um Hospital em São José do Rio Preto foram positivas para leveduras.

As leveduras do gênero *Candida spp* podem viver como comensal na cavidade oral, no trato gastrointestinal e no ânus. Em mulheres saudáveis ela pode ser isolada no canal vaginal e na vulva. De acordo com Odds et al.(2010) a porcentagem de pessoas saudáveis colonizadas por *Candida spp* pode variar de 26 a 34%. Em estudo realizado por Sobel (1991) foram realizadas coletas de diferentes sítios anatômicos e 56% dos indivíduos apresentaram colonização oral, 40% na região vulvovaginal e 24% na região anal.

No presente estudo, das 162 mulheres que apresentaram cultura positiva para leveduras, 34% eram mulheres que não apresentavam sintomas de candidíase vulvovaginal.

De acordo com Sobel (2007), a colonização genital e extragenital pode estar associada a vários fatores fisiológicos, como alto valor de pH a gravidez, podem contribuir para a elevação da circulação sistêmica ou local de estrogênio, afetando o crescimento e a maturação do epitélio vaginal, que funciona como uma barreira protetora contra a invasão de micro-organismo. Na presença do estrogênio, os receptores, presentes na superfície celular de *Candida spp* são estimulados, aumentando a aderência e a germinação das leveduras (SPINILLO et al., 1997). Na pós menopausa, o número de receptores de estrógeno diminui (MARAZZO et al., 2002).

A transformação da *Candida spp* como colonizante em *Candida* sintomática também ainda não é totalmente esclarecida

Landers et al. (2004) sugerem que existe uma associação entre o início dos sintomas de CVV e as relações sexuais em cerca de 15% das mulheres. Barousse et al. (2004) realizaram uma pesquisa com 163 adolescentes, das quais 22% apresentaram cultura positiva para leveduras. Esses dados parecem reforçar a hipótese de que a colonização vaginal por *Candida spp* é iniciada durante o início das relações sexuais. Em nossos achados corroborando com estas hipóteses, a média de idade das mulheres pertencentes ao grupo das positivas foi maior do que as negativas. Além disso, a idade do grupo das assintomáticas foi de 29,4 anos foi menor do que nos outros dois grupos (CVV e CVVR).

Lima-Neto et al. (2011) sugerem que a deficiência de lectina ligada à manana pode ser um dos principais fatores de susceptibilidade ao desenvolvimento de vaginites por *Candida spp*.

As causas que levam a CVVR são complexas e pouco compreendidas. Vários mecanismos podem estar associados a essa condição. Nwokolo (2000) e Watson; Calabretto (2009) apontam os seguintes mecanismos como responsáveis pela CVVR: a re-infecção vaginal a partir de uma fonte exógena, por exemplo, do trato gastrointestinal ou de um parceiro infectado e a recidiva vaginal após a erradicação incompleta dos micro-organismos, por tratamento inadequado ou de curta duração. Fidel e Sobel (1996) propuseram que a diminuição da imunidade adquirida da mucosa, bem como os mecanismos de imunidade mediada por células podem predispor a mulher à CVVR. De

acordo com Barrouse et al., a imunidade inata é considerada como estando diretamente associada a resistência e susceptibilidade da CVV ou da CVVR.

O diagnóstico de *Candida* spp pode ser realizado através de testes fenotípicos e genotípicos, a partir de cultivo em meios de cultura específicos. Dentre eles, o CHROMagar Candida é um meio cromógeno que permite a identificação presuntiva das leveduras, por conter vários substratos enzimáticos que, hidrolisados pelas hexoaminidases correspondentes, permitem a identificação da levedura de acordo com a pigmentação exibida pela colônia, em um tempo de 24 a 48 horas. O meio utilizado indica colônias verde-claras para *C. albicans*, verde-escuras para *C. dubliniensis* e azuis para *C. tropicalis* (ARAÚJO et al., 2005).

Araújo et al. 2005, observaram também 88.2% de concordância entre a coloração verde e a presença de *C. albicans*. Contudo, para algumas espécies não albicans, a sensibilidade do método foi baixa (39.13%). Este dado pode estar associado ao fato de que as colorações rosa e roxa são exibidas por várias espécies, como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, apresentam-se dessa forma. Assim sendo, o meio cromogênico deve ser utilizado apenas para obtenção de culturas puras e não como forma de identificação de leveduras do gênero *Candida*.

Dentre os 84 isolados identificados como *C. albicans* ou *C. dubliniensis*, no CHROMagar, 88,9% apresentaram coloração verde, no meio e, 14 apresentaram características fisiológicas sugestivas de *C. dubliniensis*. Contudo, o recém lançado livro "The yeasts" (KURZTMAN et al., 2011) sugerem que a diferenciação dessas espécies somente é possível através da realização de métodos moleculares. O mesmo ocorre com o complexo *C. parapsilosis* strictu sensu e de algumas leveduras que apresentam características fisiológicas que não permitem diferenciá-las de outras espécies.

Com isso, a adoção de métodos moleculares vem sendo realizadas em vários estudos. As regiões que mais estão sendo utilizadas como alvo dessas pesquisas são as regiões D1/D2 e ITS (FELL et al., 2000; KURTZMAN et al., 2011).

Em 2000, Chen et al., compararam a identificação de 401 isolados clínicos através da região ITS com as técnicas tradicionais de identificação e encontraram 99% de similaridade entre as duas técnicas. Os autores sugerem que, através de técnicas moleculares da região ITS é possível identificar mais de 34 espécies de leveduras.

Barroza-Estrada et al. (2010) compararam a eficácia de vários métodos tradicionais de identificação com a identificação através da região ITS, em 79 isolados de *Candida spp*. Os autores concluíram que os métodos moleculares foram eficazes para a identificação de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, mas foi menos eficaz para a identificação de *C. tropicalis*.

Ciardo et al. (2006) realizaram um estudo comparativo entre a identificação bioquímica tradicional (microcultivo em ágar fubá, “CHROMagar” e “ID32”) com o sequenciamento. Os autores encontraram 98% de correlação entre as técnicas, nas 113 amostras ensaiadas.

No presente estudo, para as reações de sequenciamento, utilizou-se “primers” para a região ITS1/ ITS2 e D1/ D2. Na literatura, os primeiros relatos de reações de sequenciamento foram realizados com a região D1/D2. Mannarelli e Kurtzman (1998) realizaram análises da região D1/D2 de catorze espécies de *Candida* e, conseguiram correlacionar alterações em *C. dubliniensis* que parecem estar diretamente ligadas a exposição previa ao fluconazol.

Estudos comparativos realizados “a posteriore”, como Scorzetti et al., 2002 entre as identificações pela região ITS e D1/D2 demonstraram que há uma grande variabilidade na região ITS, que é menos sujeita à mutações. Poucas mutações também foram observadas na região D1/D2.

Com isso, a utilização de quatro sequências de “primers” pode aumentar a eficácia do sequenciamento.

Nesse estudo, a realização do sequenciamento resultou em alterações das identificações das espécies. As leveduras que haviam sido presuntivamente identificadas como *C. dubliniensis*, através das provas bioquímicas realizadas, não tiveram a identificação molecular confirmada, ou seja, todas foram identificadas como *C. albicans*.

Em estudo realizado por Acikgoz et al. (2003), em Singapura, com 300 amostras de *C. albicans* isoladas de pacientes com candidíase vulvovaginal, *C. dubliniensis* foi identificada em apenas um isolado (0,17%), por PCR (Reação de polimerase em cadeia). Os primeiros relatos sobre a presença de *C. dubliniensis* foram à mucosa oral de indivíduos imunocomprometidos (MARIANO et al., 2003) e, aparentemente, esse

quadro mantém-se, já que é bastante incomum a presença dessa levedura em outros sítios anatômicos.

Estudos apontam que cerca de 80%, de todas as leveduras isoladas na mucosa vaginal são *C. albicans* (HOLLAND et al., 2003). De fato, em neste estudo, *C. albicans* esteve amplamente distribuída na população estudada, no grupo das CVV, com 70% de frequência e nos grupos das assintomáticas e CVVR, com 44 e 41%, respectivamente.

Uma provável justificativa para o alto índice de *Candida albicans* na mucosa de mulheres assintomáticas seria a presença desta espécie no trato gastrointestinal que a partir dessa fonte endógena a levedura se disseminaria (CALDERON et al., 2003).

Soll et al. (1991) sugerem que, no início da infecção por *Candida* spp, na cavidade oral de pacientes portadores de HIV existe a possibilidade de uma cepa comensal ser substituída por cepas geneticamente mais uniformes, com maior capacidade de produzir infecção.

As espécies de *Candida* não *albicans* vêm mudando o panorama clínico, apresentando-se como patógeno, especialmente pela seleção de espécies mais resistentes aos antifúngicos (NYIRJISY, 2008).

Ao realizar-se uma comparação das quatro espécies mais frequentes com os trabalhos encontrados na literatura percebeu-se que há boa concordância entre eles. Richter et al. (2005), nos EUA, em estudo realizado em 593 amostras, encontraram 420 *C. albicans*, 112 *C. glabrata*, 30 *C. parapsilosis*, 12 *C. tropicalis* e, o restante, das demais espécies. Na Varsóvia, Sojakova et al. (2004), encontraram 87,6% de *C. albicans*, 6,2% de *C. glabrata* e 2,2% de *C. krusei*.

No presente estudo, as espécies de *Candida* não *albicans* representaram 49% de todos os isolamentos. Esse índice foi bastante significativo, pois, quando comparamos com outros estudos realizados no Brasil, como o realizado por Holanda et al. (2005) que encontraram 69% de *C. albicans* e 31% de *C. não albicans* e de Correa et al. (2009), que isolaram 87% de *C. albicans* e 13% das demais espécies. Vale ressaltar que o nosso estudo foi realizado com diferentes grupos de mulheres (assintomáticas, com CVV e com CVVR) e, a porcentagem de ocorrência de espécies não *albicans* foi maior nos grupos das assintomáticas e das CVVR (55.6% e 58.82%, respectivamente).

Entre as espécies não *albicans*, o complexo *C. parapsilosis* foi mais isolado, com 15% de isolamento. Ao se realizar uma análise por grupo amostral, esta espécie foi mais frequente no grupo proveniente de mulheres portadoras assintomáticas.

De acordo com dados da literatura, a porcentagem de isolamento de *C. parapsilosis*, em secreção vaginal é baixa. Contudo, Nyirjisy 2008 isolou *C. parapsilosis* em 8.5% das amostras de secreção vaginal. Os autores sugerem que essa espécie pode ser considerada como um colonizador, transitório na vagina. A mesma opinião é compartilhada por Trofa et al. (2008). Auler et al. (2009) sugerem que essa levedura pode estar associada a utilização de método contraceptivo, como Dispositivo Intrauterino (DIU), que favorece a formação de biofilmes e dificulta o tratamento das infecções por leveduras.

Desde a década passada, a incidência de *C. parapsilosis* vem aumentando drasticamente. Vários estudos indicam que a espécie tem sido considerada como o segundo patógeno mais frequentemente isolado em vários sítios anatômicos, como em sepses, em neonatos. Em 2005, *C. parapsilosis* foi separada em três grupos: *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* (LOCKHART et al., 2008; TAVANTI et al., 2005).

Um fato interessante foi a detecção de dois isolados de *C. metapsilosis* que foram isolados de mulheres mais velhas e que apresentaram episódios de recorrência. De acordo com Lockhart et al. (2008), essa espécie tem sido isolada em abscessos, líquido ascítico, fluído de lavado broncoalveolar e em fluídos de articulações.

Na literatura há poucos trabalhos que indicam a incidência do complexo *C. parapsilosis* em amostras de secreção vaginal. Britto et al. (2006) relatam que, entre 80 isolados de hemocultura, identificados como *C. parapsilosis*, 16 foram *C. orthopsilosis* e 4 foram *C. metapsilosis*, o que mostra que essas espécies podem estar presentes entre as identificadas como *C. parapsilosis*. Na Malásia, Tay et al. (2009) isolaram *C. metapsilosis* em 4,8% das amostras de *C. parapsilosis* oriundas de hemocultura.

Ao realizarmos uma comparação entre as espécies e o grupo amostral, observamos que o complexo *C. parapsilosis* foi isolado nos três grupos estudados.

A segunda espécie não *albicans* mais frequente foi *C. glabrata*. Poucos ensaios clínicos têm sido realizados no sentido de esclarecer a fisiopatologia da candidíase

vulvovaginal por essa espécie. Fidel et al. (2007), sugerem que a alta frequência de isolamento de *C. glabrata* pode ser reflexo de um aumento de conscientização da importância da realização da cultura, ou, se este fato pode estar relacionado com o aumento da utilização de terapias de antifúngicos de longa duração, tanto por via tópica, como os regimes de tratamento orais, principalmente com drogas azólicas.

De acordo com Vermitsky et al. (2008), os fatores que predispõem a vaginite por *C. glabrata* são: idade, condições médicas subjacentes, como “diabetes *mellitus*” não controlada e uso de duchas vaginais podem contribuir para o aumento dessa incidência. Em nosso estudo, ao distribuímos as espécies entre diferentes faixas etárias verificou-se que houve um aumento nos percentuais de espécies não-*albicans* em mulheres mais velhas.

Embora, nenhum estudo em larga escala tenha sido realizado, os sintomas apresentados por mulheres com *C. glabrata* pode ser distinto dos sintomas apresentados por mulheres portadoras de outras espécies de leveduras. Geiger et al. (1995) relataram que há diferenças sutis nos sintomas apresentados por essas mulheres. Após a avaliação de 80 mulheres com candidíase, os autores observaram que as portadoras de *C. glabrata* apresentavam menos leucorréia e prurido que as demais. Contudo, a queixa de ardor era mais frequente.

Em nosso estudo ao compararmos a frequência de isolamento de leveduras com o grupo amostral percebemos que *C. glabrata* não esteve presente nas mulheres que apresentavam sintomas primários de vulvovaginite, estando apenas no grupo das assintomáticas e das que apresentavam recorrência. Esse fato talvez seja atribuído à baixa intensidade dos sintomas provocados por *C. glabrata*, que pode refletir a ausência da formação de hifa pelos blastoconídeos por essa espécie, já que nas extremidades das hifas e do tubo germinativo estão presentes as enzimas proteolíticas, que exercem um papel de alérgeno (SOBEL, 2007).

O isolamento de quatro *C. haemulonii*, em conteúdo vaginal foi bastante surpreendente. De acordo com Kutzman et al. 2011, esta espécie de levedura pode ser considerada como pertencente a mesma família da *Clavispora (Candida) lusitanae*. Na literatura, há relatos dessa espécie em ambiente marinho, já que essa é altamente tolerante a grandes concentrações de cloreto de sódio. Poucos estudos relatam a

presença de *C. haemulonii* em isolados clínicos. Sugita et al. (2006) isolaram uma amostra de *C. haemulonii* em paciente com sepse. Testes de sensibilidade “in vitro” mostraram que o isolado era resistente a anfotericina B e ao fluconazol.

Outro fator que despertou a atenção foi presença de *Rhodotorula* spp e de *Trichosporon* spp entre casos sintomáticos de CVV.

Tuon e Costa (2003) chamam a atenção para o fato de que *Rhodotorula* spp está surgindo como um patógeno emergente oportunista, particularmente em indivíduos imunocomprometidos. Muitos casos de fungemia associadas com uso de cateteres, endocardites, peritonites, meningites e endoftalmites podem ser causadas por essa levedura. A taxa de mortalidade pode chegar a 12,6%.

Outro patógeno oportunista importante é o gênero *Trichosporon* spp. As espécies denominadas anteriormente como *T. beigelli* e *T. cutaneum* foram reclassificadas como *T. asahii*. Essa espécie é a mais importante do gênero *Trichosporon* e pode causar granulocitopenia, tumores malignos e infecções de pelos pubianos (YANG et al., 2008). De acordo com Miceli et al. (2011), esse gênero é a segunda causa mais freqüente de fungemia, e apresentam resistência a anfotericina B e as equinocandinas.

Esses dados refletem a importância da realização da cultura e a identificação das leveduras presentes no conteúdo vaginal.

O primeiro passo para que ocorra a infecção é a colonização da mucosa. Alguns autores descrevem que, a capacidade de *Candida albicans* produzir tubo germinativo, torna esta espécie mais invasiva do que as outras espécies, o que também poderia explicar a alta incidência da mesma (FERRER, 2000; FOSTER, 2002). De acordo com Felk et al. 2002, isolados de *C. albicans* que não produzem hifas são menos virulentos do que os isolados que são produtores das enzimas.

Depois do processo inicial, ocorre a adesão da levedura (DE BERNARDIS et al., 2001). Essa fase é mediada por fatores de virulência, expressos pelos micro-organismos. Dentre os quais, a produção de proteinases e fosfolipases são as mais estudadas.

No presente estudo, verificou-se que 81% das amostras foram produtoras de proteinase. Ao fazermos uma comparação com outros trabalhos descritos na literatura, como o de Ribeiro et al. (2004), os nossos resultados foram menores, já que naquele

estudo a produção da proteinase foi observada em 100% dos isolados de *Candida spp* provenientes de secreção vaginal. Maffei et al. (1997) também observaram uma produção de proteinase de 100% das amostras isoladas de secreção vaginal, de pacientes gestantes.

Embora o papel exercido pelas proteinases "in vivo" ainda não esteja totalmente estabelecido, e alguns autores questionem a ação desta enzima como um fator de virulência, estudos realizados com amostras de *Candida albicans* isoladas da vagina de mulheres assintomáticas podem ser utilizadas como controle para o estudo das mesmas. De Bernardis et al. (2001), verificaram que amostras isoladas de pacientes assintomáticas apresentam uma diminuição ou ausência da secreção de proteinase "in vitro".

De acordo com Fidel e Sobel (1996), ao se inocular em animais de experimentação, amostras de *Candida spp* provenientes de portadoras assintomáticas, esses mostraram serem menos virulentos do que as amostras provenientes de pacientes sintomáticas. Com isto, isolados que produzem altas concentrações de proteinases, realmente podem influenciar na susceptibilidade dos hospedeiros às vaginites (FIDEL; SOBEL, 1996).

No presente estudo, ao realizar-se a comparação da produção de proteinase, por grupo amostral, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados.

Esse fato pode reforçar a hipótese de que a proteinase é utilizada pelos micro-organismos como um fator de sobrevivência, ou seja, para que o micro-organismo se adapte aos diferentes nichos ecológicos, retirando nutrientes necessários para a sua sobrevivência (BROWN et al., 2007) e não como um fator de agressão ao hospedeiro. Além disso, a microbiota vaginal é um ambiente que propicia a expressão de proteinase. O pH da vagina que varia de 2.5 a 5.0, é rico em proteínas e peptídeos que favorecem a expressão dos genes SAPs, especialmente a indução e expressão da SAPs 2 (CASSONE et al., 2007; CHAFFIN et al., 2008).

Assim como as proteinases, alguns autores relatam que as fosfolipases poderiam participar dos processos de patogenicidade dos micro-organismos. A atividade da fosfolipase, como um fator de virulência tem sido estudada não só em

fungos, como também em amostras de bactérias e protozoários (IBRAHIM et al., 1995; KANTARCIOGLU; YÜCEL, 2001; NAGLIK et al., 2003a).

Na literatura, a expressão de fosfolipase é controversa. Alguns autores sugerem que a expressão de fosfolipase é maior em amostras oriundas de infecções sistêmicas, enquanto outros sugerem que a presença de fosfolipase é maior entre os isolados provenientes de infecções superficiais. Penha et al. (2000) descreve a produção de fosfolipase em 83,3% dos isolados de *Candida spp* provenientes da cavidade oral. Kantarcioglu e Yücel (2001) verificaram que 62,1% das leveduras isoladas de diferentes sítios anatômicos foram produtoras de fosfolipase.

No presente estudo apenas 39% das amostras apresentaram atividade fosfolipásica. As espécies que mais produziram fosfolipase foram *C. albicans* (53,7%), *C. tropicalis* (44,4%) e *C. parapsilosis* (13,7%). Não foram observadas diferenças entre a atividade fosfolipásica dos isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Porém, *C. albicans* foi mais produtora de fosfolipase do que *C. parapsilosis*.

De acordo com Brown et al. (2007) *Candida albicans* é a espécie que possui a capacidade de expressar uma maior quantidade de genes que induzem a produção de enzimas como, produção de catalase, superóxido dismutase e proteínas de choque térmico (HPW 90) que seriam capazes de provocar um maior estresse oxidativo das células do sistema imunológico.

Em um estudo realizado por Ombrella et al. (2008), os autores pesquisaram a expressão de proteinase e fosfolipase em amostras de *Candida spp* provenientes da secreção vaginal de mulheres que possuíam a flora vaginal >4.5 e <4.5 . A expressão de fosfolipase não foi diferente entre os grupos, porém, a atividade de proteinase foi maior entre as mulheres que apresentavam pH >4.5 (96,2%~61,5%). Esse fato demonstra que a atividade de pH exerce um papel fundamental na expressão de proteinase. Já a expressão de fosfolipase é contraditória, porém, é fato de que essa atividade está diretamente relacionada ao gene PLB1, que tem sua expressão regulada por fatores nutricionais, meio ambiente (temperatura e pH) e a fase de crescimento da leveduras. Aparentemente, a expressão do gene PLB1 seria regulada pelos mesmos fatores que regulam a morfologia da levedura (OMBRELLA et al., 2008).

Quando foi realizada a comparação por grupo amostral, observou-se que as amostras isoladas do grupo das assintomáticas foram as que menos produziram fosfolipase. Esse fato talvez esteja relacionado com a ideia de Cassone et al. (2007) que para a levedura se manter como um comensal é necessário que ocorra um equilíbrio entre as respostas inata e adaptativa que restringem o crescimento fúngico e neutralizem sua virulência. De acordo com os autores, esse é o estágio inicial (estágio 1) relacionado com a transformação da levedura comensal em patogênica. No estágio dois, a integridade da membrana epitelial, os mecanismos imunorregulatórios e tolerância local ao fungo são componentes importantes para a manutenção desse equilíbrio. A doença (estágio 3) ocorre quando há um excesso de fatores de virulência, provocado por uma maior carga de micro-organismos, seja pela quebra da integridade da célula epitelial ou através da quebra da tolerância ao fungo. Essa quebra pode ocorrer, em algumas mulheres, por mecanismos ainda não totalmente estabelecidos, porém, parecem estar relacionados a fatores genéticos.

Nos últimos anos, com o aumento das vulvovaginites causadas principalmente por espécies não-*albicans*, a identificação de gênero e espécie das leveduras, bem como um estudo mais detalhado de sensibilidade "in vitro" frente às drogas antifúngicas disponíveis para o tratamento, tornou-se importante para a escolha terapêutica, especialmente em casos de recorrência (CUENCA-ESTRELLA, 2000).

Na literatura nacional e internacional há diversos trabalhos de sensibilidade aos antifúngicos realizados em centros de pesquisa (CANDIDO et al., 1999; COSTA et al., 2004; RIBEIRO et al., 2000; SOJAKOVA et al., 2004); porém, estes testes não são realizados rotineiramente em laboratórios e hospitais, onde a maior parte das pacientes recebe tratamento empírico (RITCHER et al., 2005).

O sucesso terapêutico depende de vários fatores, como a resposta imunológica do paciente (CONTI et al., 1999; SANGULARD; ODDS, 2002); os níveis de concentração da droga, no sangue; quebra de proteína (CONTI et al., 1999); penetração inadequada da droga ao local de infecção (GHANNOUM; RICE, 1999); interação com outras drogas (REX et al., 1997); e em casos de candidíase vulvovaginal, a composição da microbiota vaginal (SOBEL et al., 2003b). Os fatores relacionados aos micro-organismos, como a produção de toxinas e outros fatores de virulência, como produção de fosfolipases, em

amostras de *Candida spp* têm um impacto significativo na probabilidade de sucesso terapêutico (REX et al., 1997).

A resistência clínica pode ser definida como a falha de um agente antifúngico para curar uma infecção ou pode estar relacionada à diminuição da susceptibilidade dos isolados clínicos, frente aos antimicóticos (ESPINEL-INGROFF, 2006). A resistência de *Candida spp* aos derivados azólicos é o tipo mais prevalente de resistência antifúngica. De acordo Mardh et al. (2010), 7.5% dos isolados de *Candida spp* provenientes de secreção vaginal podem apresentar resistência “in vitro” a pelo menos um antifúngico.

O aparecimento de amostras resistentes aos antifúngicos mais utilizados na clínica médica pode estar associado à mutações na síntese da 1,3 β glucana, principal componente da parede celular dos fungos (PFALLER et al., 2004). De acordo com Katiyar et al. (2006), as amostras que apresentaram resistência “in vitro” apresentaram alterações nos genes Gsc1 (1,3 β glucana sintetase 1), em *C. albicans* e no análogo Fks2, em *C. glabrata*.

De acordo com Sanglard e Odds (2002) a resistência pode ser resultado de: a) um aumento no conteúdo celular do citocromo P450, nomeado CYP51A1, envolvidos na 14- α -demetilação de lanosterol, (b) a diminuição da afinidade para CYP51A1 azóis, (c) uma falha das células de acumular estes agentes; (d) uma via de biossíntese do ergosterol alteradas decorrentes de inativação da 5,6-desaturase do ergosterol.

Nos anos de 1990, foi desenvolvido o "Etest", um “kit” comercial que permite a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das drogas (CANDIDO et al., 1999). O “Etest” tem a vantagem de ser de fácil execução, porém, uma boa reprodutibilidade depende de uma padronização do tamanho do inóculo, da temperatura e do tempo de incubação (VAN ELDERE et al., 1996).

Na literatura, vários estudos utilizam o “Etest” para testar a sensibilidade “in vitro” aos antifúngicos. No presente estudo, utilizou-se essa ferramenta para testar a sensibilidade das leveduras a cinco antifúngicos mais utilizados em casos de candidíase vulvovaginal.

Frente a anfotericina B, 91,3% dos isolados foram sensíveis e 8,7% foram considerados resistentes. Fleck et al. (2007), na Alemanha, encontraram 96,3% de

sensibilidade à anfotericina B. Kiraz et al. (2010), obtiveram 100% de sensibilidade a esse fármaco.

Realizamos, ainda, uma comparação dos valores de CIM do nosso estudo, com o estudo realizado por Pfaller et al. (2004) e, observamos que, os autores tiveram uma variação de CIM semelhante a nossa para *C. albicans* (0,03 – 4µg/mL), uma menor variação de CIM para *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (0,003-16~324µg/mL); para *C. tropicalis* e *C. krusei*, uma variação de CIM maior do que a observada em nosso estudo (0,03-16/324µg/mL).

Para o cetoconazol, a porcentagem de amostras sensíveis foi de 96,3%. Apenas um isolado de *C. albicans* foi resistente a esse antifúngico. Em estudo realizado por Cartledge et al. (1999), os autores realizaram a sensibilidade “in vitro” de isolados de *Candida* não *albicans* provenientes de orofaringe e, observaram que todos os isolados de *C. glabrata* foram resistentes “in vitro” e “in vivo” ao cetoconazol. Em nosso estudo, nem todas as amostras de *C. glabrata* foram resistentes a esse antifúngico, e, uma sensibilidade diminuída foi observada em amostras de *C. famata*, *C. kefyr* e em *C. haemulonii*.

Frente ao fluconazol, o índice de sensibilidade foi de 94,9%. Os isolados que foram resistentes foram *C. albicans* (2), *C. glabrata* (2), *C. haemulonii* (1), *C. famata* (1) e *C. kefyr* e não *Candida* (que inclui *Trichosporon* spp e *Rhodotorula* spp). Todos os isolados de *C. krusei* foram sensíveis a esse antifúngico.

Na literatura, vários estudos que realizaram a sensibilidade ao fluconazol. Bulmer et al. (1999), nas Filipinas tiveram 94% de isolados sensíveis, 5% de SDD e 1% resistente; Mohanty et al. (2007), em Nova Delhi encontraram 30% de *Candida* spp consideradas sensibilidade dose dependente. Cardona-Castro et al. (2002), na Colombia, não observaram isolados resistentes ao fluconazol, em amostras provenientes de hemocultura. Porém, Shahid e Sobel (2008) chamam a atenção para o fato de que um longo tempo de terapia profilática com fluconazol pode levar a seleção de espécies resistentes a esse fármaco.

Em relação ao itraconazol, a resistência foi observada em 12,7% dos isolados e a sensibilidade dose dependente, em 11,1%. Essa diminuição da sensibilidade ao

itraconazol foi observada em todas as espécies. Uma pesquisa na literatura mostrou que esse não é um dado isolado.

Liu et al. (2008), na Correia, obtiveram 19,1% de isolados resistentes; Pfaller et al. (1996) relata uma grande quantidade de isolados de *C. krusei* e *C. parapsilosis* resistentes a esse antifúngico. Sojakova et al. (2004) relata que 18,5% das amostras foram resistentes ao itraconazol. Martin-Mazuelos et al. (1999) relata que 61,4% das amostras foram sensíveis ao itraconazol, indicando que a diminuição da sensibilidade ao itraconazol não é um fato novo, mas que merece grande atenção.

O voriconazol é um triazol de segunda geração, derivado do fluconazol, porém, com um espectro de ação maior do que o fluconazol. Em nosso estudo, 95,7% dos isolados foram considerados sensíveis a esse antifúngico. De acordo com Pernán et al. (2006), o voriconazol possui uma boa atividade “in vitro” sobre as leveduras do gênero *Candida*, inclusive aquelas que apresentam menor sensibilidade ao fluconazol e a anfotericina B. Os autores sugerem, inclusive, que parece não haver resistência cruzada entre fluconazol e voriconazol. Esse fato poderia auxiliar na adoção de voriconazol, em casos de resistência ao fluconazol. Um impediente para a prescrição desse fármaco é o alto custo do tratamento.

Pfaller et al. (2007) chamaram a atenção para o surgimento de resistência cruzada entre os azólicos “in vitro”. A diminuição da susceptibilidade ao fluconazol poderia preceder a resistência ao voriconazol. No presente estudo, praticamente todos os isolados resistentes ao fluconazol foram resistentes ao voriconazol (5.6%).

As equinocandinas (CEs), como caspofungina, são antimicrobianos lipopeptídeos que inibem a síntese da parede celular dos bolores e das leveduras, como *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. Nagappan et al. (2010) ressaltam a importância da utilização da caspofungina, como alternativa para tratamento de isolados resistentes ao fluconazol.

A não sensibilidade à caspofungina foi observada em 8.2% dos nossos isolados. Espinel-Ingroff et al. (2010) realizaram um estudo comparando a sensibilidade “in vitro” as equinocandinas, através do “Etest” e da microdiluição. Os autores concluíram que não houve concordância entre os resultados obtidos pelo “Etest” para as espécies *C. parapsilosis* (54,4%) e *C. guilliermondii* (82,4%), mas, para as espécies *C. albicans*, *C.*

glabrata, *C. krusei* e *C. tropicalis* a concordância foi bastante satisfatória, variando de 87.9 a 100%.

De acordo com Pfaller et al. (2004), a diminuição da sensibilidade à caspofungina pode estar associada a mudanças na síntese de β glucana. Em um estudo realizado pelo autor, apenas 1% dos isolados foram resistentes a essa droga. Para Katiyar et al. (2006), essa diminuição da sensibilidade está associada a mutação do gene F641Y, em *C. albicans* e um análogo RESY641 foi identificado em isolados de *Fusarium* spp, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*.

Quando realizamos uma comparação por espécie, *C. glabrata* foi a que apresentou menor sensibilidade a esse antifúngico, seguida por *C. haemulonii*, pelo “Etest”. De acordo com Ostrosky-Zeichner (2003), a resistência a anfotericina B, entre os isolados de *C. parapsilosis* é de 2 a 3%. Em nosso estudo, essa resistência foi vista em um isolado, que representava 4,2% do total de *C. parapsilosis* estudadas.

As amostras que foram consideradas resistentes ou sensibilidade dose dependente aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e fluconazol, pelo “Etest” foram submetidas a ensaios de microdiluição (EUCAST EDef7.1 e CLSI M27S3). O método do CLSIM27S3 é considerado “gold standard” para a detecção de resistência.

Os dez isolados que haviam sido considerados resistentes a anfotericina B pela técnica do “Etest” foram selecionados para a realização das técnicas de microdiluição (EUCAST Edef7.1 e CLSIM27S3) foram sensíveis a esse antifúngico.

Através dos dados obtidos pelo método de microdiluição proposto pelo CLSIM27S3, 57,6% que haviam sido considerados SDD, no Etest foram sensíveis, na microdiluição; 3 foram considerados SDD no Eucast e sensíveis pelo CLSI.

Dos isolados conderados SDD, 3 foram S, nos dois métodos; 3 foram SDD no Eucast e S no CLSI; 3 foram SDD nos três métodos; um isolado foi resistente, nos três métodos.

Dos doze isolados haviam sido considerados resistentes ao fluconazol, pelo “Etest”, seis foram sensíveis; dois foram resistentes no CLSI e R no Eucast e 4 foram SDD, nos três métodos.

Pfaller et al. (2006) encontraram valores maiores de CIM pelo “Etest” para *C. krusei* ATCC 6258, em ensaios comparativos com a microdiluição e, atribui essa

diferença a composição dos meios de cultura. Cantón et al. (2006) também descrevem que o CIM para o fluconazol foi maior nos ensaios em ágar do que no de referência.

Outro fato que merece atenção é que seis dos oito isolados considerados resistentes ou SDD no “Etest” ao fluconazol foram considerados como resistentes, no EUCAST EDef7.1. Corroborando com os nossos achados, Cuenca-Estrella et al. (2005) testou a sensibilidade “in vitro” do EUCAST EDef7.1 com vários métodos comerciais e concluíram que melhores resultados foram obtidos entre o EUCAST e o “Etest”.

Pelo método proposto pelo EUCAST Edef7.1, seis isolados foram considerados como resistentes ao fluconazol. Desses, quatro haviam sido considerados como SDD, pelo “Etest” e pela microdiluição (CLSIM27S3).

Em estudo realizado por Pfaller et al. (2011), comparando-se a sensibilidade de 1056 isolados de *Candida spp*, os autores concluíram que, para o fluconazol, houve discordância entre os o Eucast e o CLSI. Os valores de CIM foram maiores no EUCAST EDef7.1 Para o flucoanzol a correlação entre os dois métodos foi de 98,6%.

Arendrup et al. (2010) realizou a comparação entre os vários métodos de sensibilidade para a detecção da susceptibilidade das equinocandinas e, de acordo com os autores, os métodos que foram mais similares foram CLSI, EUCAST e “Etest”.

Cuenca-Estrella et al. (2010) realizaram um estudo comparativo entre os dois métodos de microdiluição e outros métodos comerciais, dentre eles, o “Etest”. Nesse estudo, os autores encontraram 98,4% de concordância entre o “Etest” e o EUCAST, para a anfotericina B e de 96,4% para o fluconazol. Entre o “Etest” e o CLSI, os resultados foram de 97,4% para a anfotericina B e de 95,6% para o fluconazol.

Ao final desses experimentos, tendo os ensaios de microdiluição (CLSIM27S3), como referência, conclui-se que quatro isolados do grupo das CVVR foram SDD ao fluconazol foram pertencentes ao grupo das CVVR. Frente ao fluconazol, seis isolados foram considerados SDD.

Seis isolados (3,7%) foram considerados como sensibilidade dose dependente (SDD) e nenhum isolado foi resistente ao itraconazol. Frente ao fluconazol, quatro isolados (2,4%) foram considerados SDD, pelo referido método. No Brasil, Antunes et al. (2004), através da microdiluição, encontraram 14,1% de isolados de *Candida spp* considerados SDD.

De acordo com Pfaller et al. (2003), vários trabalhos descrevem que há boa reprodutibilidade entre o “Etest” e o método “gold standard”, porém, quando se realiza uma análise em separado, das espécies não *albicans*, como *C. glabrata*, verifica-se que há uma diferença de 68% entre eles. Essa diferença está, principalmente, entre os isolados classificados como S ou SDD. Os autores chamam a atenção para o fato de que esses isolados, considerados SDD, podem adquirir resistência rápida aos antifúngicos.

Fleck et al. (2007) relatam que 96,3% dos isolados foram considerados S a anfotericina B, com CIM de 1mg/L. Os maiores valores de CIM foram vistos nos isolados de *C. glabrata* e *C. krusei*. Os autores detectaram resistência ao fluconazol em 2,5% dos isolados e a sensibilidade dependente da dose foi vista em 7,1%. Esses dados corroboram com os resultados de nossa pesquisa.

Uma amostra de *C. albicans* (1% de todos os isolados) foi considerada SDD ao itraconazol, o que demonstra que isolados dessa espécie ainda apresentam boa sensibilidade “in vitro” aos antifúngicos. Esse fato corrobora com a literatura que diz que a resistência, em *C. albicans*, é menor que 1% (GYGAX et al., 2008). Além disso, Calvet et al. (1997), através de modelo animal, concluíram que a resistência, em *C. albicans* pode ser reversível.

Uma amostra de *C. parapsilosis* foi considerada SDD ao itraconazol. Trofa et al. (2008) relatam que 1,5% dos isolados de *C. parapsilosis* podem apresentar sensibilidade diminuída aos antifúngicos, em ensaios “in vitro”.

Lima et al. (2008) chamam a atenção para o fato de que em uma mulher, HIV positiva, com onicomicose por *Candida albicans* e *C. tropicalis*, com resultado resistente “in vitro”, não apresentou resposta clínica aos antifúngicos administrados. De acordo com os autores, essa resistência teria sido provocada pela prévia exposição a fluconazol, em um outro momento, em que a mulher havia manifestado candidíase oral.

A maior parte dos isolados considerados SDD ao itraconazol e ao fluconazol foram de *C. glabrata*. Borst et al. (2005) chama atenção ao fato de que, essas amostras de *C. glabrata*, consideradas SDD “in vitro” podem rapidamente adquirir uma resistência quando expostas aos azólicos. Essa observação é importantíssima, pois, em nosso País, não é rotineiro a realização de cultura e, em menor escala ainda, a realização de

testes de sensibilidade, em casos de candidíase vulvovaginal, o que pode agravar esse quadro.

Outro fato que merece destaque é que um isolado de *C. glabrata* que apresentou sensibilidade reduzida aos dois antifúngicos fora proveniente de uma mulher assintomática, que, não havia recebido antifúngicos previamente. Esse fato pode ser indicativo do mecanismo de resistência intrínseca desse isolado às drogas antifúngicas.

Roetzer et al. (2010) sugerem que o desenvolvimento dessa resistência, prévia. aos antifúngicos poderia estar associada aos mecanismos de sobrevivência da levedura às substâncias tóxicas presentes na microbiota da mucosa vaginal. De acordo com os autores, *C. glabrata* poderia permanecer como colonizante em consequência do local escolhido para a colonização, já que é mais frequente isolar essa levedura na superfície da mucosa, agregada a biofilmes, ou em locais onde há uma escassez de nutrientes, pressão osmótica diminuída e em locais em que há outros micro-organismos e onde os mecanismos de proteção dos hospedeiros estão ativos, o que torna a espécie mais resistente.

A outra amostra de *C. glabrata* que foi considerada SDD ao fluconazol fora considerada resistente nos três outros métodos e foi isolada do conteúdo vaginal de uma mulher que de acordo com o protocolo clínico, não apresentava resposta clínica satisfatória a nenhum dos tratamentos previamente descritos (fluconazol, itraconazol e voriconazol).

As demais leveduras SDD ao itraconazol foram *C. guilliermondii* e *Trichosporon* spp. Yang et al. (2008) já chamavam a atenção para o fato de que as espécies de *Trichosporon* poderiam ser menos sensíveis aos antifúngicos.

Em um estudo realizado por Richter et al., (2005), em isolados provenientes de secreção vaginal, foi identificado a presença de um *Trichosporon* spp que foi resistente ao itraconazol. Em nosso estudo, dos três isolados, apenas apresentou sensibilidade dependente da dose a esse antifúngico. Em relação ao fluconazol, nenhum isolado foi considerado resistente “in vitro”

Os resultados obtidos revelam a importância da realização dos ensaios de sensibilidade “in vitro” aos antifúngicos, sejam pelo método “gold standard” seja pelo Etest, pois, através deles, é possível a prévia detecção da resistência “in vitro”. Outro

fato que merece destaque é o isolamento de leveduras, SDD, no grupo das assintomáticas. Apesar de não ser possível acompanhar essas mulheres, ao longo de suas vidas, esses isolados podem representar um problema grave, no futuro, pois, uma mudança na fisiologia da microbiota, provocada por alterações hormonais, principalmente, em casos de gravidez, quando essas cepas poderiam multiplicar-se, levando ao desenvolvimento de CVV.

Em caso de tratamento, essas cepas poderiam representar uma falha terapêutica, ou ainda, essas poderiam não apresentar sintomas exacerbados, de infecção, porém, poderiam colonizar a cavidade oral de recém-nascidos, o que poderia levar ao desenvolvimento de uma sepse neonatal.

A realização da cariotipagem eletroforética permite a separação de fragmentos de cromossomos de leveduras, em gel (BORIOLLO et al., 2009), o que possibilita a comparação entre as cepas e avaliação dos seus subtipos, através da avaliação visual dos diferentes números de bandas apresentadas e permite a análise cladística dessas bandas, através da construção de dendogramas. Esses, possibilitam a verificação da similaridade existente entre os isolados (CARRIÇO et al., 2005).

Em nosso estudo, selecionamos 61 isolados que apresentavam algumas características que os distinguiam dos demais, como: a baixa produção de uma enzima ou a sensibilidade diminuída aos antifúngicos, para comparar com os perfis apresentados por outras leveduras. A análise adotada foi a visual e a com auxílio de “software”.

Observamos que as amostras de *C. albicans* apresentaram bandas que variaram de 275kb a 4100kb. O número de bandas variou de 4 a 9, sendo que a maior parte dos isolados apresentou de 6 a 8 bandas. A análise do dendograma mostrou que os isolados de *C. albicans* não estão correlacionados entre si.

Estudo publicado por Merz et al. (1988), mostrou que, de 17 isolados de *C. albicans* foram encontrados catorze padrões distintos de bandas, corroborando com os nossos achados. Shin et al. (2004), em amostras de quinze pacientes com fungemia, encontraram oito padrões eletroforéticos.

Para *C. glabrata*, as amostras apresentaram de 8-10 bandas. Porém, com o auxílio de dendograma, não foi possível traçar uma similaridade entre os isolados.

Khatkat et al., (1992), através de análise visual encontraram 10 padrões de bandas cromossômicas, em dezoito isolados de *C. glabrata*. Kaufman e Merz (1989) relatam a observância de 8 a 12 bandas, variando de 445 a 3000kb e um total de 22 padrões distintos de bandas, em 33 pacientes.

Os isolados de *C. kefyr* mostram que houve variação de 300 a 2500kb e o número de bandas foi de 5 a 7. Vasquez et al. (1993) relatam que um isolado de *C. kefyr* avaliado apresentou sete bandas cromossômicas. Em nosso estudo não foi possível observar uma entre as bandas.

Dentre os isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* ocorreram os mesmos fenômenos. Na literatura, Shin et al. (2001), na Coreia, encontraram 25 padrões distintos de bandas, entre amostras de *C. parapsilosis* isoladas de pessoas com fungemia recorrente.

Pelos resultados obtidos não foi possível correlacionar as cepas entre si. De acordo com Vasquez et al. (1993) um melhor resultado poderia ter sido obtido se as amostras tivessem sido tratadas com enzima de restrição (REA), porém, esse tratamento não foi realizado.

Essa falta de correlação, entre os isolados, pode ser por não haver uma origem comum dessas cepas, já que as mulheres estudadas eram de diferentes regiões de São Paulo.

Além disso, acreditamos que, devido às diferentes composições da microbiota vaginal, cada levedura apresente diferentes perfis de cariótipos. E, ao finalizarmos os nossos estudos, podemos concluir que a presença de *Candida* spp no conteúdo vaginal e o desenvolvimento de infecções é fortemente influenciada mais por mecanismos dos hospedeiros do que pelas próprias características das leveduras.

Outra conclusão importante é que há uma grande dificuldade no tratamento dos casos de CVVR e, isso pode ser gerado por mudanças nos perfis de sensibilidade das amostras, ou pela exposição prévia a antifúngicos, porém, percebemos que, embora essas amostras apresentem-se sensíveis aos antifúngicos "in vitro", na prática, isso não se reproduz, provavelmente por causa da resposta imunológica dos hospedeiros, ou pela absorção e concentração da droga, que chega à mucosa vaginal.

Novos ensaios sobre essa biodisponibilidade da droga, aos locais de infecção devem ser realizados.

Além disso, faz-se necessário reforçar a importância da identificação laboratorial dos isolados de *Candida* spp. Talvez fosse interessante a adoção, pela comunidade médica, a prática de se realizar a cultura, nos casos em que presença de levedura fosse detectada no exame de Papanicolao, principalmente em mulheres gestantes.

6 CONCLUSÃO

- ❖ Os resultados apontam que não há diferença significativa entre as espécies isoladas, nos três grupos. Entre as amostras isoladas no grupo das assintomáticas, as espécies mais frequentes foram *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *Rhodotorula* spp. As espécies mais isoladas no grupo das CVVs foram *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. No grupo das CVVR, as quatro espécies mais isoladas foram *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, porém, não foram encontradas *C. glabrata* no grupo das CVVs;
- ❖ A identificação tradicional (morfofisiológica) mostrou-se eficaz para identificar as espécies que são mais frequentes, na mucosa vaginal. Contudo, esses testes não permitiram a identificação de quatro isolados de *Candida haemulonii*; catorze isolados apresentaram características fenotípicas semelhantes a *C. dubliniensis*, porém, o sequenciamento mostrou que elas eram *C. albicans* e, dos vinte e quatro isolados identificados como *C. parapsilosis*, dois foram classificados como *C. metapsilosis*, demonstrando que essas diferenças somente podem ser detectadas através de métodos moleculares, como o sequenciamento;
- ❖ Através da técnica de PFGE (cariotipagem em campo pulsado) não foi possível verificar a similaridade entre as espécies de leveduras, de acordo com os grupos estudados;
- ❖ Através dos resultados obtidos não foi possível verificar diferenças entre os perfis apresentados pelas leveduras, quanto a frequência, produção de enzimas (proteínase e fosfolipase), perfis cromossômicos, em relação aos grupos amostrais;
- ❖ Os ensaios realizados mostram que houve uma boa correlação entre o método de difusão em ágar (“Etest”) e os métodos de microdiluição;
- ❖ De modo geral, as amostras isoladas do grupo das CVVRs apresentaram menor sensibilidade aos antifúngicos; bem como amostras do grupo das assintomáticas, pelos três métodos (Etest, Eucast e CLSI);
- ❖ Observamos, através de nossos estudos que faz-se necessária a realização de exames laboratoriais, como a identificação das leveduras presentes no conteúdo vaginal, mesmo em casos em que a mulher não apresente sintomas clínicos de CVV, no momento da consulta; já que, mesmo as leveduras provenientes de mulheres assintomáticas podem ser resistentes aos antifúngicos usuais.

7 REFERÊNCIAS

ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 253-73, 2010.

ACIKGOZ, Z. C.; SANCAK, B.; GAMBERZADE, S.; MISIRLIOGLU, M. Prevalence of *Candida dubliniensis* among the stored vaginal *Candida* isolates in a Turkish hospital. **Mycoses**, v. 47, n. 9-10, p. 393-396, 2004.

ALBERT, T. K.; HANZAWA, H.; LEGTENBERG, Y. I.; DE RUWE, M. J.; VAN DEN HEUVEL, F. A.; COLLART, M. A.; BOELEN, R.; TIMMERS, H. T. Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4–NOT transcription repressor complex. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 3, p. 355–364, 2002.

AL-RAWI, N.; KAVANAGH, K. Characterisation of yeasts implicated in vulvovaginal candidosis in Irish women. **British Journal of Biomedical Science**, v. 56, n. 2, p. 99-104, 1999.

AL-SWEIH, N.; AHMAD, S.; KHAN, Z. U.; KHAN, S.; CHANDY, R. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive *Candida* isolates in a maternity hospital in Kuwait. **Mycoses**, v. 48, n. 5, p. 347-351, 2005.

ALVES, S. H.; MILAN, E. P.; , SANT'ANA, P. L.; OLIVEIRA, L. O.; SANTURIO, J. M.; COLOMBO, A. L. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 43, p. 85-86, 2002.

ANTUNES, A. G. V.; PASQUALOTTO, A. C.; DIAZ, M. C.; D'AZEVEDO, P. A.; SEVERO, L. C. Candidemia in a Brazilian Tertiary care Hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 239-241, 2004.

ARAUJO, C. R.; MIRANDA, K. C.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; LEMOS, JANINE A.; KHRAIS, C. H. A.; COSTA, C. R.; SILVA M. R. R.; FERNANDES, O. F. L. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno Chromagar Candida. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n.1, p. 37-42, 2005.

ARENDRUP, M.C.; GARCIA-EFFRON, G.; LASS-FLORL, C.; LOPEZ, A.G.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PERLIN, D.S. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and IsoSensitest media. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 426–439, 2010.

De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS
TÉCNICAS **NBR6023**: Informação e
Documentação: referências: elaboração. Rio
de Janeiro, 2002.

ARENDRUP, M.; LUNDGREN, B.; JENSEN, I. M.; HANSEN, B. S.; FRIMODT-MOLLER, N. Comparison of Etest and a tablet diffusion test with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Candida* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 521-526, 2001.

AULER, M. E.; Morreira, D.; Rodrigues, F. O.; Abrão, M.; MATSUMOTO, F. E.; Da Silva, E. G.; Da SILVA, B. C. M.; PAULA, C. R. Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 211-216, 2009.

BADIEE, P.; ALBORZI, A.; DAVARPANAH, M. A.; SHAKIBA, E. Distributions and antifungal susceptibility of *Candida* species from mucosal sites in HIV positive patients. **Archives of Iranian Medicine**, v. 13, n. 4, p. 282-287, 2010.

BAROUSSE, M. M.; ESPINOSA, T.; DUNLAP, K.; FIDEL, P. L. JR. Vaginal Epithelial Cell Anti-*Candida albicans* Activity Is Associated with Protection against Symptomatic Vaginal Candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 11, 2005.

BEIGI, R. H.; AUSTIN, M. N.; MEYN, L. A.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Antimicrobial resistance associated with the treatment of bacterial vaginosis. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 191, n. 4, p. 1124-1129, 2004.

BEIGI, R. H.; MEYN, L. A.; MOORE, D. M.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Vaginal yeast colonization in nonpregnant women: a longitudinal study. **Obstetrics & Gynecology**, v. 104, n. 6, p. 926-930, 2004.

BEIJERINCK, M. W. L'auxanographie, ou la methode de l'hydro diffusion dans la gelatine appliquee aux recherches microbiologique. **Arch neerland sci**, v. 23, p. 367-372, 1889.

BELLOCH, C.; BARRIO, E.; URUBURU, F.; GARCÍA, D. D.; QUEROL, A. Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial analysis. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 397-408, 1997.

BORIOLO, M. F. G.; HÖFLING, J. F.; MENDES, A.; ROSA, E. A. R. Ferramentas moleculares para caracterização de *Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923) em estudos epidemiológicos. **Revista Estudos em Biologia**, v. 27, n. 58, p. 21-42, 2005.

BORIOLO, M. F. G. **Análise da diversidade genética de amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças saudáveis por eletroforese de enzima multiloco**. 2004. Tese (Doutorado em Biologia Buco-Dental) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BORIOLO, M. F. G.; HÖFLING, J. F.; SPOLIDORI, D. M. P.; GRÉGIO, A. M. T.; RYMOVICZ, A. U. M.; CARVALHO, A. P. C.; FERREIRA, L. E. N.; SAMARANAYAKE, L. P.; ROSA, E. A. R. MOLECULAR FINGERPRINTING METHODS FOR STUDIES

INVOLVING ORAL *Candida albicans* Métodos de caracterização molecular para estudos envolvendo *Candida albicans* de origem bucal. **Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica**, v. 5, n. 3, p. 203-224, 2009.

BORST, A.; RAIMER, M. T.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 783–787, 2005.

BRANCHINI, M. L.; PFALLER, M. A.; RHINE-CHALBERG, J.; FREMPONG, T.; ISENBERG, H. D. Genotypic Variation and Slime Production among Blood and Catheter Isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 452-456, 1994.

BRITO, L. R.; GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; ROSAS, R. C.; ALMEIDA, L. P.; DA MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 44, n. 3, p. 261-266, 2006.

BROWN, S.M.; CAMPBELL, L. K.; LODGE, J. K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 320-325, 2007.

BULMER, G. S.; MARQUEZ, M. L.; CO-BARCELONA, L.; FROMTLING, R. A. Yeasts and fluconazole susceptibility in the Philippines. **Mycopathologia**, v. 146, n. 3, p. 117–120, 1999.

BUYUKBAYRAK, E. E.; KARS, B.; KARSIDAG, A. Y. K.; KARADENIZ, B. I.; KAYMAZ, O.; GENCER, S.; PIRIMOGLU, Z. M.; UNAL, O.; TURAN, M. C. Diagnosis of vulvovaginitis: comparison of clinical and microbiological diagnosis. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 282, n. 5, p. 515-519, 2010.

CALDERON, L.; WILLIAMS, R.; MARTINEZ, M.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D. A. Genetic susceptibility to vaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 41, n. 2, p. 143–147, 2003.

CALVET, H. M.; YEAMAN, M. R.; FILLER, S. G. Reversible fluconazole resistance in *Candida albicans*: a potential in vitro model. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 535-539, 1997.

CANDIDO, R. C.; TOLOI, M. R. T.; FRANCESCHINI, S. A.; GARCIA, F. R.; MINTO, E. C. M. In vitro activity of antifungal agents determined by E-test method against vaginal *Candida* species. **Mycopathologia**, v. 144, n. 1, p. 15-20, 1999.

CANTON, E.; PEMAN, J.; SASTRE, M.; ROMERO, M.; ESPINEL-INGROFF, A. Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 2829–2832, 2006.

CARDONA-CASTRO, N.; REVANKAR, S. G.; ORTIZ, P.; CUERVO, C.; KIRKPATRICK, W. R.; MCATEE, R. K.; PATTERSON, T. F. Proteinase detection, DNA typing and antimycotic susceptibility of *Candida* isolates from Colombian women with vulvovaginal candidiasis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, n. 2, p. 89-94, 2002.

CARTLEDGE, J. D.; MIDGLEY, J.; GAZZARD, B. G. Non-*albicans* oral candidosis in HIV-positive patients. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 419-22, 1999.

CARRIÇO, J.; PINTO, F.; SIMAS, C.; NUNES, S.; SOUSE, N.; FRAZÃO, N.; DE LENCASTRE, H.; ALMEIDA, J. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analysed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5483-5490, 2005.

CASARI, E.; FERRARIO, A.; MORENGHI, E.; MONTANELLI, A. *Gardnerella*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in the genital discharge of symptomatic fertile and asymptomatic infertile women. **New Microbiologica**, v. 33, p. 69-76, 2010.

CASSONE, A.; BERNARDIS, F.; SANTONI, G. Anticandidal immunity and vaginitis: novel opportunities for immune intervention. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, p. 4675-86, 2007.

CASSONE, A.; TACCONELLI, E.; DE BERNARDIS, F.; TUMBARELLO, M.; TOROSANTUCCI, A.; CHIANI, P.; CAUDA, R. Antiretroviral therapy with protease inhibitors has an early, immune reconstitution-independent beneficial effect on *Candida* virulence and oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected subjects. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 2, p. 188-195, 2002.

CHAFFIN, W. L. Cell Wall Proteins *Candida albicans*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 3, p. 495-544, 2008.

CHEN, K. W.; LO, H. J.; LIN, Y. H.; LI, S. Y. Comparison Of Four Molecular Typing Methods To Assess Genetic Relatedness Of *Candida albicans* Clinical Isolates In Taiwan. **Journal Medical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 249-258, 2005.

CHEN, Y. C.; EISNER, J. D.; KATTAR, M. M.; RASSOULIAN-BARRETT, S. L.; LAKE, K.; YARFITZ, S. L.; LIMAYE, A. P.; COOKSON, B. T. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of dna sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rna genes. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2302-2310, 2000.

CHRYSSANTHOU, E.; CUENCA-ESTRELLA, M. Comparison of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing Proposed Standard and the E-test with the NCCLS broth

microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3841–3844, 2002.

CIARDO, D. E.; SCHAR, G.; BOTTGER, E. C.; ALTWEGG, M.; BOSSHARD, P. P. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 77–84, 2006.

COSTA, M.; PASSOS, X. S.; MIRANDA, A. T. B.; ARAÚJO, R. S. C.; PAULA, C. R.; SILVA, M. R. R. Correlation of in vitro itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis. **Mycopathologia**, v. 157, n. 1, p. 43–47, 2004.

CLAUDINO, A. L.; PEIXOTO, R. F.; MELHEM, M. S.; SZESZS, M. W.; LYON, J. P.; CHAVASCO, J. K.; FRANCO, M. C. Correlation between CLSI, EUCAST and Etest methodologies for amphotericin B and fluconazol antifungal susceptibility testing of *Candida spp.* clinical isolates. **Die Pharmazie**, v. 63, n. 4, p. 286-289, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard M27-A**. Wayne, Pa.: CLSI, 1997. (Document M27-A).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard M27-A2**. Wayne, Pa.: CLSI, 2002. (Document M27-A2).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Information Supplement**. 3rd ed. Wayne, Pa.: CLSI, 2008. (Document M27-S3).

COLOMBO, A. L.; BARCHIESI, F.; MCGOUGH, D. A.; RINALDI, M. G.; Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 535-540, 1995.

COLEMAN, D.; SULLIVAN, D.; HARRINGTON, B.; HAYNES, K.; HENMAN, M.; SHANLEY, D.; BENNETT, D.; MORAN, G.; MCCREARY, C.; O'NEILL, L. Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected and AIDS patients. **Oral Diseases**, v. 3, n. 1, 1997.

CONTI, S.; FANTI, F.; BERTOLOTTI, D.; DIECI, E.; ARSENI S, SALATI, A.; POLONELLI, L. Personalized antifungal susceptibility testing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 333-338, 1999.

COOPER, C. R. JR. Yeasts pathogenic for humans and animals. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier. p. 9-19, 2011.

CORRÊA, P. R.; DAVID, P. R. S.; PERES, N. P.; CUNHA, K. C.; ALMEIDA, M. T. G. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 4, p. 177-181, 2009.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; ALASTRUEYIZQUIERDO, A.; BERNAL-MARTINEZ, L.; CUESTA, I.; BUITRAGO, M. J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for *in vitro* detection of antifungal resistance in yeast isolates. **Journal Clinical Microbiology**, v. 48, n.5, p. 1782-1786, 2010.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; GARCIA-EFFRON, G.; MONZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. *In vitro* activity of ravuconazole against 923 clinical isolates of nondermatophyte filamentous fungi. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5136-5138, 2005.

CUENCA-ESTRELLA, M.; MELLADO, E.; DÍAZ-GUERRA, T. M.; MONZÓN, A.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Susceptibility of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* spp. to echinocandin LY303366, itraconazole and amphotericin B. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 475-477.

CUESTA, I.; BIELZA, C.; CUENCA-ESTRELLA, M.; LARRANAGA, P.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Evaluation by data mining techniques of fluconazole breakpoints established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), and its comparison with those of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (EUCAST). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 4, 1541–1546, 2010.

DABAS, N.; MORSCHHÄUSER, J. A transcription factor regulatory cascade controls secreted aspartic protease expression in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 586-602, 2008.

DAN, M.; POCH, F.; LEVIN, D. High rate of vaginal infections caused by non-*C. albicans* species among asymptomatic women. **Medical Mycology**, v. 40, n. 4, p. 383-386, 2002.

DE BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; MILLÀN, R. S.; PONTÒN, J.; CASSONE, A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 37, n. 11, p. 3481-3486, 1999.

DE BERNARDIS, F.; SULLIVAN, P. A.; CASSONE, A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. **Medical Mycology**, v. 39, n. 4, 303–313, 2001.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. Tarragona: Universitat Rovira i Virgili, 2000. 126p.

DIAS, A. L. T.; MATSUMOTO, F. E.; MELHEM, M. S. X.; SILVA, E. G.; AULER, M. E.; SIQUEIRA, A. M.; PAULA, C. R. Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST – EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1693-1699, 2006.

DOI, M.; HOMMA, M.; CHINDAMPORN, A.; TANAKA, K. Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. **Journal of General Microbiology**, v. 138, n. 10, p. 2243-2251, 1992.

DURAN, M. T.; VELASCO, D.; CANLE, D.; MOURE, R.; VILLANUEVA, R. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from blood cultures in a five-year period (1997-2001). **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.21, n.9, p.488-92, 2003.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PFALLER, M. A.; RINALDI, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; VERWEIJ, P. E. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3884-3889, 2005.

ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing zygomycetes, *Aspergillus* spp., *Candida* spp., and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and amphotericin B. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3616-3622, 2006.

ESPINEL-INGROFF, A.; CANTON, E.; MARTIN-MAZUELOS, E.; PEMÁN, J. Comparison of anidulafungin MICs determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method (M27-A3 document) and Etest for *Candida* species isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1347–1350, 2010.

EUROPEAN COMITEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY. **Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts**. Taufkirchen, Germany: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2002 (document E. dis. 7.1).

ESTRADA-BARRAZA, D.; MARTÍNEZ, A. D.; FLORES-PADILLA, L.; DE ELIAS, R. M.; LUIS SÁNCHEZ-VARGAS, L. O. Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar *Candida*® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 28, n. 1, p. 36-42, 2011.

FALLON, K.; KAUSCH, K.; NOONAN, J.; HUGUENEL, E.; TAMBURINI, P. Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 551-556, 1997.

FAN, S. R.; LIAO, Q. P.; LIU, X. P.; LIU, Z. H.; ZANG, D. Vaginal allergic response in women with vulvovaginal candidiasis. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 101, n.1, p. 27-30, 2008.

FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; ALBRECHT, A.; SCHALLER, M.; BEINHAEUER, S.; NICHTERLEIN, T.; SANGLARD, D.; KORTING, H. C.; SCHÄFER, W.; HUBE, B. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. **Infection and Immunity**, USA, v. 70, p. 3689–700, 2002.

FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1351-1371, 2000.

FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 71, n. 1, p. 21-27, 2000.

FIDEL, P. L. History And Update On Host Defense Against Vaginal Candidiasis. **American Journal Of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 1, p. 2-12, 2007.

FIDEL, P. L. J.; Sobel, J. D. Immunopathogenesis of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. **Clinical Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 335-348, 1996.

FILLER, S. G. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 333–339, 2006.

FLECK, R.; DIETZ, A.; HOF, H. *In vitro* susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. **The journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 767-771, 2007.

FLOREZ, A.; ALVAREZ-MARTIN, P.; LOPEZ- DÍAZ, T.; MAYO, B. Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue- veined Cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 4, p. 350–357, 2007.

FONSECA, A. FELL, J. W.; KURTZMAN, C. P.; SPENCER-MARTINS, I. *Candida tartarivorans* sp. nov., an anamorphic ascomycetous yeast with the capacity to degrade L(M)- and meso-tartaric acid. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 389–394, 2000.

FOSTER, L. A. Utilization and cell-surface binding of hemin by *Histoplasma capsulatum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 437–442, 2002.

FRANK, A. T.; RAMSOOK, C. B.; OTOO, H. N.; TAN, C.; SOYBELMAN, G.; RAUCEO, J. M.; GAUR, N. K.; KLOTZ, S. A.; LIPKE, P. N. Structure and function of glycosylated tandem repeats from *Candida albicans* ALS adhesins. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 3, p. 405–414, 2010.

GARNER, C.; STARR, J. K.; MCDONOUGH, P. L.; ALTIER, C. Molecular Identification of Veterinary Yeast Isolates by Use of Sequence-Based Analysis of the D1/D2 Region of the Large Ribosomal Subunit. **Journal Clinical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2140-2146, 2008.

GEIGER, A. M.; FOXMAN, B.; GILLESPIE, B. W. The epidemiology of vulvovaginal candidiasis among University students. **American Journal of Public Health**, v. 85 n. 8-1, p.1146-1148, 1995.

GONCALVES, S. S.; AMORIM, C. S.; NUCCI, M.; PADOVAN, A. C.; BRIONES, M. R.; MELO, A. S.; COLOMBO, A. L. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of *C. parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 7, p. 885-887, 2009.

GONZALEZ, G. M.; PORTILLO, O. J.; USCANGA, G. I.; ANDRADE, S. E.; ROBLEDO, M.; RODRIGUEZ, C.; ELIZONDO, M. Therapeutic efficacy of voriconazole against a fluconazole-resistant *Candida albicans* isolate in a vaginal model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 3, p. 571–573, 2009.

GRIGORIOU, O.; BAKA, S.; MAKRAKIS, E.; HASSIAKOS, D.; KAPPAROS, G.; KOUSKOUNI, E. Prevalence of clinical vaginal candidiasis in a university hospital and possible risk factors. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 126, n. 1, p. 121-125, 2006.

GUZEL, A. B.; ILKIT, M.; BURGUT, R.; URUNSAK, I.F.; OZGUNEN, F. T. An evaluation of risk factors in pregnant women with *Candida* vaginitis and the diagnostic value of simultaneous vaginal and rectal sampling. **Mycopathologia**, v. 172, n. 1, p. 25-36, 2011.

GYGAX, S. E.; VERMITSKY, J. P.; CHADWICK, S. G.; SELF, M. J.; ZIMMERMAN, J. A.; MORDECHAI, E.; ADELSON, M. E.; TRAMA, J. P. Antifungal resistance of *Candida glabrata* vaginal isolates and development of a quantitative reverse transcription-PCR-based azole susceptibility assay. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3424-3426, 2008.

HENG, S.; HANNAN, N. J.; ROMBAUTS, L. J. F.; SALAMONSEN, L. A.; NIE, G. PC6 levels in uterine lavage are closely associated with uterine receptivity and significantly lower in a subgroup of women with unexplained infertility. **Human Reproduction**, v. 26, n. 4, p. 840-846, 2010.

HETTICARACHCHI, N.; ASHBEE, H. R.; WILSON, J. D. Prevalence and management of non-*albicans* vaginal candidiasis. **Sexually Transmitted Infections**, v. 82, n. 2, p. 99-100, 2010. Published erratum appears in Erratum in: **Sexually Transmitted Infections** v. 86, n. 3, p. 250, 2010.

HOLANDA, A. A. R. Candidiase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonizacao anal concomitantes. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n.1, 2007.

HOLANDA, A. A. R.; FERNANDES, A. C. S.; BEZERRA, C. M.; FERREIRA, M. A. F.; HOLANDA, M. R. R.; HOLANDA, J. C. P.; MILAN, E. P. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 1, p. 3-9, 2007.

HOLLAND, J.; YOUNG, M. L.; LEE, O.; CHEN, S. C. A. Vulvovaginal carriage of yeasts others than *Candida albicans*. **Sexually Transmitted Infections**, v. 79, n. 3, p. 249 – 250, 2003.

HUBE, B.; SANGLARD, D.; ODDS, F. C.; HESS, D.; MONOD, M.; SCHAFER, W.; BROWN, A. J.; GOW, N. A. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3529–3538, 1997.

IBRAHIM, A. S.; MIRBOD, F.; FILLER, S. G.; BANNO, Y.; COLE, G. T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS JR., J. E.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M. A. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 1993-1998, 1995.

IIDA, S.; IMAI, T.; OGURI, T.; OKUZUMI, K.; YAMANKA, A.; MORETTI-BRANCHINI, M.; NISHIMURA, K.; MIKAMI, Y. Genetic diversity of the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8 S rRNA genes among clinical isolates of *Candida parapsilosis* in Brazil and Japan. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 46, p. 133–137, 2005.

ISHIGURO, A.; HOMMA, M.; TORII, S.; TANAKA, K. Identification of *Candida albicans* antigens reactive with immunoglobulin E antibody of human sera. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 4, p. 1550-1557, 1992.

IWEN, P. C.; HINRICHS, S. H.; RUPP, M. E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. **Medical Mycology**, v. 40, n. 1, p. 87-109, 2002.

KANTARCIOGLU, A. S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. **Mycoses**, v. 45, p.160-165, 2002.

KATIHAR, S.; PFALLER, M.; EDLIND, T. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2892-2894, 2006

KAUFMANN, C. S.; MERZ, W. G. Electrophoretic karyotypes of *Torulopsis glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 21, p. 2165-2168, 1989.

KHATTAK, M. N.; BURNIE, J. P.; MATTHEWS, R. C.; OPPENHEIM, B. Clamped homogeneous electric field gel electrophoresis typing of *Torulopsis glabrata* isolates

causing nosocomial infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 8, p. 2211-2215, 1992.

KIRAZ, N.; DAG, I.; OZ, Y.; YAMAC, M.; KIREMITCI, A.; KASIFOGLU, N. Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, n. 2, p. 136-140, 2010.

KOTHAVADE, R. J.; KURA, M. M.; VALAND, A. G.; PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 873–880, 2010.

KRYSAN, D. J.; TING, E.L.; ABEIJON, C.; KROOS, L.; FULLER, R. S.. Yapsins Are A Family Of Aspartyl Protease Required For Cell Wall Integrity In *Saccharomyces Cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 8, p. 1364-1374, 2005.

KUO, D.; TAN, K.; ZINMAN, G.; RAVASI, T.; BAR-JOSEPH, Z.; IDEKER, T. Evolutionary divergence in the fungal response to fluconazole revealed by soft clustering. **Genome Biology**, v. 11, R77, 2010.

KURTZMAN, C. P.; ALBERTYN, J.; BASEHOAR-POWERS, E. Multigene phylogenetic analysis of the Lipomycetaceae and the proposed transfer of *Zygozoma* species to *Lipomyces* and *Babjevia anomala* to *Dipodascopsis*. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 6, p. 1027–1034, 2007.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeast a Taxonomic Study**. 4th. Burlington, MA, EUA. Elsevier Science, 1998. 1076p.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts, a taxonomic study**. 5th. Burlington, MA, EUA. Elsevier Science, 2011. 2354 p.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 1216-1223, 1997.

LANDERS, D. V.; WIESENFELD, H. C.; HEINE, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Predictive value of the clinical diagnosis of lower genital tract infection in women. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, v. 190, n.4, p. 1004–1010, 2004

LIAN, C. H.; LIU, W. D. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase in human vulvovaginal candidiasis. **Mycoses**, v. 50, n. 5, p. 383-390, 2007.

LEVI, A. W.; HARIGOPAL, M.; HUI, P.; SCHOFIELD, K.; CHHIENG, D. C. Comparison of Affirm VPIII and Papanicolaou tests in the detection of infectious vaginitis. **American Journal Clinical Pathology**, v. 135, n. 3, p. 442-447.

LIGUORI, G.; GALLÉ, F.; LUCARIELLO, A.; DI ONOFRIO, V.; ALBANO, L.; MAZZARELLA, G.; D'AMORA, M.; ROSSANO, F. Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida spp.* identification. **New Microbiologica**, v. 33, n. 1, p. 63-67, 2010.

LIMA, K. M.;, Rêgo, R. S. M. F. M.;, N. S. S. Espécies fúngicas responsáveis por onicomicose em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 2, p.107-110, 2008.

LIMA-NETO, R. G.; BELTRÃO, E. I.; OLIVEIRA, P. C.; NEVES, R. P. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. **Mycoses**, v. 54, n. 1, p. 23-29, 2011.

LINARES, M. J.; CHARRIEL, G.; SOLIS F.; CASAL, M. Comparison of two microdilution methods for testing susceptibility of *Candida spp.* to voriconazole. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 899-902, 2004.

LIU, O. W.; CHUN, C. D.; CHOW, E. D.; CHEN, C.; MADHANI, H. D.; NOBLE, S. M. Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell*, v. 135, n. 1, p. 174-188, 2008.

LOCKHART, S. R.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Geographic Distribution and Antifungal Susceptibility of the Newly Described Species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in Comparison to the Closely Related Species *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2659–2664, 2008.

LORETO, E. S.; SCHEID, L. A.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. *Candida dubliniensis*: Epidemiology and Phenotypic Methods for Identification. **Mycopathologia**, v. 169, n. 6, p. 431-443, 2010.

MADHAVAN, P.; JAMAL F.; CHONG, P. P. Laboratory isolation and identification of *Candida* species. **Journal of Applied Sciences**, v. 11, n. 16, p. 2870-2877, 2011.

MAFFEI, C. M.; PAULA, C. R.; MAZZOCATO, T. S.; FRANCESCHINI, S. Phenotype and genotype of *Candida albicans* strains isolated from pregnant women with recurrent vaginitis. **Mycopathologia**, v. 137, n. 2, p. 87-94, 1997.

MANNARELLI, B. M.; KURTZMAN, C. P. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 8, p. 1634-1641, 1998.

MARDH, P. A.; RODRIGUES, A. G.; GENC, M.; NOVIKOVA, N.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; GUASCHINO, S. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis-a

review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. **International Journal of STD & AIDS**, v. 13, n. 8, p. 522-539, 2002.

MARIANO, P. L. S.; MILAN, E. P.; MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 533-538, 2003.

MARINA, N. M.; FLYNN, P. M.; RIVERA, G. K.; HUGHES, W. T. *Candida tropicalis* and *Candida albicans* fungemia in children with leukemia. **Cancer**, v. 68, n. 3, p. 594-599, 1991.

MARRAZZO, J. M.; KOUTSKY, L. A.; ESCHENBACH, D. A.; AGNEW, K.; STINE, K.; HILLIER, S. L. Characterization of vaginal flora and bacterial vaginosis in women who have sex with women. **Journal Infectious Diseases**, v. 185, n. 9, p. 1307–1313, 2002.

MARTINEZ, R. C.; FRANCESCHINI, S. A.; PATTA, M. C.; QUINTANA, S. M.; CANDIDO, R. C.; FERREIRA, J. C.; DE MARTINIS, E. C.; REID, G. Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis with Fluconazole plus Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 269-274, 2009.

MARTIN-MAZUELOS, E.; GUTIERRES, M.J.; ALLER, A.I.; BERNAL, S.; MARTINEZ, N.A.; MONTEIRO, O.; QUINDOS, G. A comparative evaluation of ETEST and broth microdilution methods for fluconazole and itraconazole susceptibility testing of *Candida* spp. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 477-481, 1999.

MASATA, J.; POISLOVÁ, M.; JEDLICKOVÁ, A.; MASATOVÁ, D.; MARTAN, A. Modified classification of microscopic evaluation of vulvovaginal infections. **Ceska Gynekologie**, v. 75, n. 3, p. 199-208, 2010.

MASHBURN, J. Etiology, diagnosis and management of vaginitis. **Journal of Midwifery and Women's Health**, v. 51, n. 6, p. 423-30, 2006.

MARTIN-MAZUELOS, E.; GUTIERREZ, M. J.; ALLER, A. I.; BERNAL, S.; MARTÍNEZ, M. A.; MONTERO, O.; QUINDÓS, G. A comparative evaluation of Etest and broth microdilution methods for fluconazole and itraconazole susceptibility testing of *Candida* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 477-481, 1999.

MCCLELLAND, E. E.; BERNHARDT, P.; CASADEVALL, A. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, p. 1500–1504, 2006.

MCCLELLAND, R. S.; RICHARDSON, B. A.; HASSAN, W. M.; GRAHAM, S. M.; KIARIE, J.; BAETEN, J. M. MANDALIYA, K.; JAOKO, W.; NDINYA-ACHOLA, J. O.; HOLMES, K. K. Prospective study of vaginal bacterial flora and other risk factors for vulvovaginal candidiasis. **Journal Infectious Diseases**, v. 199, n. 12, p. 1883-1890, 2009.

MENDLING, W.; KRAUSS, C.; FLADUNG B. A clinical multicenter study comparing efficacy and tolerability of topical combination therapy with clotrimazole (Canesten, two formats) with oral single dose fluconazole (Diflucan) in vulvovaginal mycoses. **Mycoses**, v. 47, n. 3-4, p.136-42, 2004.

MENDLING, W.; SEEBACHER, C.; WORKING GROUP FOR INFECTIONS AND INFECTIMMUNOLOGY OF THE GERMAN SOCIETY FOR GYNECOLOGY AND OBSTETRICS; GERMAN SPEAKING MYCOLOGICAL SOCIETY; GERMAN DERMATOLOGICAL SOCIETY. Guideline vulvovaginal candidosis: guideline of the German Dermatological Society, the German Speaking Mycological Society and the Working Group for Infections and Infectimmunology of the German Society for Gynecology and Obstetrics. **Mycoses**, v. 46, n. 9-10, p. 365-369, 2003.

MENDLING, W. **Vulvo-vaginal Candidosis: Theory and Practice**. Berlin: Springer-Verlag, 1988.

MERZ, W. G.; CONNELLY, C.; HIETER, P. Variation of electrophoretic karyotypes among clinical isolates of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 842-845, 1988.

MICELI, M.H., DÍAZ, J.A. & LEE, S.A. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infectious Disease**, v. 11, n. 2, p. 142-151, 2011.

MOHANTY, S.; XESS, I.; HASAN, F.; KAPIL,A.; MITTAL, S.; TOLOSA, J. E. Prevalence & susceptibility to fluconazole of *Candida* species causing vulvovaginitis. **Indian Journal of Medical Research**, v.126, p.216-9, 2007.

MOREIRA, D.; PAULA C. R. Vulvovaginal candidiasis. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 92, n. 3, p. 266-267, 2006.

MOREIRA, D. **Perfil fenotípico, diferenciação molecular, produção de enzimas e sensibilidade aos antifúngicos de amostras de leveduras isoladas em três grupos amostrais: mulheres assintomáticas, com candidíase vulvovaginal primária e recorrente**. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MIYAZAKI, T.; IZUMIKAWA, K.; NAGAYOSHI, Y.; SAIJO, T.; YAMAUCHI, S.; MORINAGA, Y.; SEKI, M.; KAKEYA, M.; YAMAMOTO, Y.; YANAGIHARA, K.; MIYAZAKI, Y.; KOHNO, S. Functional characterization of the regulators of calcineurin in *Candida glabrata*. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 8, p. 621-630, 2011.

MORSCHHÄUSER, J.; VIRKOLA, R.; KORHINEN, T. K.; HACKER, J. Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. **FEMS Microbiology**, v. 153, n. 2, p. 349-55, 1997.

Nacional Center for Biotechnology Information. **GenBank**. Disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>>.

NAGAPPAN, V.; BOIKOV, D.; VAZQUEZ, J. A. Assessment of the In Vitro Kinetic Activity of Caspofungin against *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 54, n. 1, 2010.

NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O.; HUBE, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 915–926, 2004.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 400-428, 2003a.

NAGLIK, J.R.; FIDEL Jr, PL.; ODDS, F.C. Animal models of mucosal *Candida* infection. **FEMS Yeast Research**, v. 283, p.129-139, 2008.

NAGLIK, J. R.; FOSTIRA, F.; RUPRAI, J.; STAAB, J. F.; CHALLACOMBE, S. J.; SUNDSTROM, P. *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1323–1327, 2006.

NAGLIK, J. R.; RODGERS, C. A.; SHIRLAW, P. J.; DOBBIE, J. L.; FERNANDES-NAGLIK, L. L.; GREENSPAN, D.; AGABIAN, N.; CHALLACOMBE, S. J. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 3, p. 469–479, 2003b.

NOBLE, S. M.; JOHNSON, A. D. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 2, p.298-309, 2005.

NWOKOLO, N. C.; BOAG, F. C. Chronic vaginal candidiasis. Management in the postmenopausal patient. **Drugs & Aging**, v. 16, n. 5, 2000.

NYIRJESY, P. Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, p. 637-652, 2008.

NYIRJESY, P.; ALEXANDER, A. B.; WEITZ, M. V. Vaginal candida parapsilosis: pathogen or bystander? **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 13, n. 1, p. 37–41, 2005.

ODDS, F.C.; BROWN, A.J.; GOW, N.A. Antifungal agents: Mechanism of action. **TRENDS in microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

ODDS, F. C. Molecular phylogenetics and epidemiology of *Candida albicans*. **Future Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 67-79, 2010.

OMBRELLA, A. M.; RACCA, L.; RAMOS, L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 1, p. 12-16, 2008.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J. H.; PAPPAS, P. G.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; HOROWITZ, H. W.; POWDERLY, W. G.; HYSLOP, N.; KAUFFMAN, C. A.; CLEARY, J.; MANGINO, J. E.; LEE, J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3149-3154, 2003.

OZCAN, S. K.; BUDAK, F.; WILLKE, A.; FILIZ, S.; COSTUR, P.; DALCIK, H. Efficacies of caspofungin and a combination of caspofungin and meropenem in the treatment of murine disseminated candidiasis. **APMIS**, v. 114, n. 12, p. 829-836, 2006.

PAULA, C.R.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W. Yeasts from beaches in the Southern Area of São Paulo state. "Baixada Santista", Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 136-143, 1983.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; CALABUIG, E.; BOSCH, M.; VALENTÍN, A.; VIUDES, A.; GOBERNADO, M. Actividad *in vitro* del voriconazol frente a levaduras y algas con los nuevos puntos de corte del patrón de resistencia. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 19, N. 1, p. 21-33, 2006.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; LINARES-SICILIA, M. J.; ROSELLÓ, E. M.; BORRELL, N.; RUIZ-PÉREZ-DE-PIPAON, M. T.; GUINEA, J.; GARCÍA, J.; PORRAS, A.; GARCÍA-TAPIA, A. M.; PÉREZ-DEL-MOLINO, L.; SUÁREZ, A.; ALCOBA, J.; GARCÍA-GARCÍA, I. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey. **Journal Clinical Microbiology**, v. 49, n.12, p. 4158-4163, 2011.

PENHA, S. S.; BIRMAN, E. G.; SILVEIRA, F. R. X.; PAULA, C. R. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 119-122, 2000.

PFALLER, M. A.; ANDES, D.; DIEKEMA, D. J.; ESPINEL-INGROFF, A.; SHEEHAN, D.; THE GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1366–1377, 2010.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; ANDES, D.; ARENDRUP, M. C.; BROWN, S. D.; LOCKHART, S. R.; MOTYL, M.; PERLIN, D. S.; THE CLSI SUBCOMMITTEE FOR ANTIFUNGAL TESTING. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria, **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 3, p. 164-176, 2011;

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, and etest methods: report from the ARTEMIS global antifungal susceptibility program, 2001. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1440-1446, 2003.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; REX, J. H.; ESPINEL-INGROFF, A.; JOHNSON, E. M.; ANDES, D.; CHATURVEDI, V.; GHANNOUM, M. A.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; TROKE P.; WALSH, T. J.; WARNOCK, D. W. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 819-826, 2006.

PFALLER, M. A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 89-94, 1996.

PFALLER, M. A.; Sheehan, D. J.; Rex, J. H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 268-280, 2004.

PINCUS, D. H.; ORENGA, S.; CHATELLIER, S. Yeast identification-past, present, and future methods. **Medical Mycology**, v. 45, n. 2, p. 97-121, 2007.

PIROTTA, M. V.; GARLAND, S. M. Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia before and after treatment with antibiotics. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44, v. 9, p. 3213–3217, 2006.

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

QI, Q. G.; HU, T.; ZHOU, X. D. Frequency, species and molecular characterization of oral *Candida* in hosts of different age in China. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 34, n. 6, p. 352-356, 2005.

REEF, S. E. Treatment options for vulvovaginal candidiasis: background paper for development of 1993 STD treatment recommendations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, p. 580-590, 1995.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; GALGANI, J. N.; BORTLETT, M. S.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; LANCASTER, M.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; WALSH, T. J.; BARRY, A. L. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro correlation data for fluconazole, itraconazole and *Candida* infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 235-247, 1997.

RIBEIRO, M.A.; DIETZE, R.; PAULA, C. R.; DA MATA, D. A., COLOMBO, A. L. Susceptibility profile of vaginal yeastisolates from Brazil. **Mycophatologia**, v.151, n. 1, p. 5-10, 2000.

RIBEIRO, M. A.; PAULA, C. R.; PERFECT, J. R.; COX, G. M. Phenotypic and genotypic evaluation of fluconazole resistance in vaginal *Candida* strains isolated from HIV-infected women from Brazil. **Medical Mycology**, v. 43, n. 7, p. 647-650, 2005.

RIBEIRO, E.L.; GUIMARÃES, R. I.; INÁCIO, M. C. C.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S. M. S.; NAVES, P. L. F. Aspectos de leveduras do gênero *Cândida* vinculadas às infecções nosocomiais. **NewsLab**, v. 64, 2004.

RICHTER, S. S.; GALASK, R. P.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2155-2162, 2005.

RIPEAU, J. S.; FIORILLO, M.; AUMONT, F.; BELHUMEUR, P.; REPENTIGNY, L. Evidence for differential expression of *Candida albicans* virulence genes during oral infection in intact and human immunodeficiency virus type 1-transgenic mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 8, p. 1094-1102, 2002.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; GOMEZ-LOPEZ, A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; MELLADO, E.; BERNAL-MARTINEZ, L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Genotype distribution of clinical isolates of *Trichosporon asahii* based on sequencing of intergenic spacer 1. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 4, p. 435-440, 2007.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; GOMEZ-LOPEZ, A.; ARENDRUP, M. C.; GARCIA-EFFRON, G.; PERLIN, D. S.; LASS-FLÖRL, C.; CUENCA-ESTRELLA, M. Comparison of caspofungin MICs by means of EUCAST method EDef 7.1 using two different concentrations of glucose. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 3056-3057, 2010.

ROETZER, A.; GABALDÓN, T.; SCHÜLLER, C. From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 314, n. 1, p. 1-9, 2011.

ROSENBACH, A.; DIGNARD, D.; PIERCE, J.V.; WHITEWAY, M.; KUMAMOTO, C. A. Adaptations of *Candida albicans* for growth in the mammalian intestinal tract. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 7, p.1075-1086, 2010.

RUCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, T. M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 3, p. 233-244, 1982.

SANDHU, G. S.; KLINE, B. C.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2913–2919, 1995.

SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeast. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 20, n. 9, p. 462-470, 2002.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73–85, 2002.

SÁNCHEZ, R. R.; PAZ, R. F.; ALBA, M. A. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en la población mexicana. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 24, n. 10, p. 634-636, 2006.

SCHULZE, J.; SONNENBORN, U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 106, n. 51-52, p. 837–841, 2009.

SCORZETTI, G.; FELL, J. W.; FONSECA, A.; STATZELL-TALLMAN, A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large sub-unit D1D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **Fems Yeast Research**, v. 2, n. 4, p. 495-517, 2002.

SEIDMAN, L. S.; SKOKOS, C. K. An evaluation of butoconazole nitrate 2% site release vaginal cream (Gynazole-1) compared to fluconazole 150 mg tablets (Diflucan) in the time to relief of symptoms in patients with vulvovaginal candidiasis. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 13, n. 4, p. 197-206, 2005.

SHAH, D.; ZHANG, Z.; KHODURSKY, A.; KALDALU, N.; KURG, K.; LEWIS, K. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 53, 2006.

SHAHID, Z.; SOBEL, J. D. Reduced fluconazole susceptibility of *Candida albicans* isolates in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: effects of long-term fluconazole therapy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 64, n. 3, p. 354-6, 2008.

SHIN J. H.; PARK, M. R.; SONG, J. W.; SHIN, D. H.; JUNG, S. I.; CHO, D.; KEE, S. J.; SHIN, M. G.; SUH, S. P.; RYANG, D. W. Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4025-4031, 2004.

SHIN, J. H.; SHIN, D. H.; SONG J. W.; KEE, S. J.; SUH, S. P.; RYANG, D. W. Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1258-1263, 2001.

SIKORA, M.; DABKOWSKA, M.; SWOBODA-KOPEC, E.; JARZYNKA, S.; NETSVYETAYEVA, I.; JAWORSKA-ZAREMBA, M.; PERTKIEWICZ, M.; MLYNARCZYK, G. Differences in proteolytic activity and gene profiles of fungal strains isolated from the total parenteral nutrition patients. **Folia Microbiologica**, v. 56, n.2, p. 143-148, 2011.

SILVA, M. R. R.; COSTA, M. R.; MIRANDA, A. T. B.; FERNANDES, O. F. L.; COSTA, C. R.; PAULA, C. R. Evaluation Of Etest And Macrodilution Broth Method For Antifungal Susceptibility Testing Of *Candida* Sp Strains Isolated From Oral Cavities Of Aids Patients. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v.44, n.3, p. 121-125, 2002.

SHÜNJI, T.; NAKO, F.; TAKASHI, S.; TOYOICHIRO, K.; YOSHITSUGU, L.; SATOSHI, I. National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* spp in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole and micafungin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 283-289, 2004.

SOBEL, J. D. Bacterial etiologic agents in the pathogenesis of urinary tract infections. **Medical Clinics of North America**, v. 75, n. 2, p. 253, 1991.

SOBEL, J. D. **Vulvovaginal Candidosis**. *Lancet*, London, v. 369, n. 9577, p. 1961-1971, 2007.

SOBEL, J. D. Vulvovaginitis due to *Candida glabrata*. An emerging problem. **Mycoses**, v. 41, n. 2, p. 18-21, 1998.

SOBEL, J. D. Vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*: Epidemiology, clinical aspects, and therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 93-99, 1993.

SOBEL, J. D.; WIESENFELD, H. C.; MARTENS, M.; DANNA, P.; HOOTON, T. M.; ROMPALO, A.; SPERLING, M.; LIVENGOD, C.; HOROWITZ, B.; VON THRON, J.; EDWARDS, L.; PANZER, H.; .D., CHU, T. C. Maintenance Fluconazole Therapy for Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 876-883, 2004.

SOBEL, J. D.; ZERVOS, M.; REED, B. D.; HOOTON, T. SOPER, D.; NYIRJESY, P.; HEINE, M. W.; WILLEMS, J.; PANZER, H. Fluconazole Susceptibility of Vaginal Isolates Obtained from Women with Complicated *Candida* Vaginitis: Clinical Implications. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 34–38, 2003.

SOJAKOVA, M.; LIPTAJOVA, D.; BOROVSKEY, M.; SUBIK, J. Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia. **Mycopathologia**, v. 157, n. 2, p. 163-169, 2004.

SOLL, D. R.; GALASK, R.; SCHMID, J.; HANNA, C.; MAC, K.; MORROW, B. Genetic dissimilarity of commensal strains of *Candida* spp. carried in different anatomical locations of the same healthy women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n.8, p. 1702-1710, 1991.

SOUTHERN, P.; HORBUL, J.; MAHER, D.; DAVIS, A. *C. albicans* Colonization Of Human Mucosal Surfaces. **Plos One**, v. 3, n. 4, p. 2067, 2008.

SPINILLO, A.; CAPUZZOM, E.; GULMINETTI, R.; MARONE, P.; COLONNA, L.; PIAZZI, G. Prevalence of and risk factors for fungal vaginitis caused by non-albicans species. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, v. 176, n. 1, p. 138–141, 1997.

STAIB, P., KRETSCHMAR, M., NICTERLEIN, T., HOF, H. & MORSCHHAUSER, J. Transcriptional regulators Cph1p and Efg1p mediate activation of the *Candida albicans* virulence gene SAP5 during infection. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, 921–927, 2002.

ST-GERMAIN, G.; LAVERDIERE, M.; PELLETIER, R.; BOURGAULT, A. M.; LIBMAN, M.; LEMIEUX, C.; NOEL, G. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) multicenter surveillance study in Quebec, Canada. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 949–953, 2001.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; POONWAN, N.; MEKHA, N. *Candida pseudohaemulonii* sp. nov., an amphotericin B- and azole-resistant yeast species, isolated from the blood of a patient from Thailand. **Microbiology and Immunology** v. 50, n. 6, p. 469–473, 2006.

SULLIVAN, D. J.; MORAN, G. P.; COLEMAN, D. C. *Candida dubliniensis*: Ten years on. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, n. 1, p. 9–17, 2005.

SULLIVAN, D. J.; WESTERNENG, T. J.; HAYNES, K. A.; BENNET, D. E.; COLEMAN, D. C. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, v. 141, n. 7, p. 1507-1521, 1995.

SUNDSTROM, P. Adhesion in *Candida* spp. **Cellular Microbiology**, v. 8, p. 461–469, 2002.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J. ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284-292, 2005.

TAY, S. T.; ABIDIN, I. A.; HASSAN, H.; NG, K. P. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. **Medical Mycology**, v. 49, n. 5, p. 556-560, 2011.

TORTORANO, A. M.; VIVIANI, M. A.; BARCHIESI, F.; ARZENI, D.; RIGONI, A. L.; COGLIATI, M.; COMPAGNUCCI, P.; SCALISE, G. Comparison of Three Methods for Testing Azole Susceptibilities of *Candida albicans* Strains Isolated Sequentially from Oral Cavities of AIDS Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1578–1583, 1998.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606–625, 2008.

TRTKOVA, C. J.; RACLAVSKY, V. Molecular-Genetic Approaches To Identification And Typing Of Pathogenic *Candida* Yeasts. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 150, n. 1, p. 51–61, 2006.

TUON, F. F.; COSTA, S. F. Rhodotorula infection: a systematic review of 128 cases from literature. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 135-140, 2008.

US, E.; CENGİZ, S. A. Prevalence and phenotypic evaluation of *Candida dubliniensis* in pregnant women with vulvovaginal candidosis in a university hospital in Ankara. **Mycoses**, v. 50, n. 1, p. 13-20, 2007.

VAN ELDER, J.; JOOSTEN, L.; VERHAEGHE, A.; SURMONT, I. Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method compared with Etest and semiautomated broth microdilution test. **Journal Of Clinical Microbiology**, v.34, n. 4, p. 842-847, 1996.

VAZQUEZ, J. A.; SANCHEZ, V.; DMUCHOWSKI, C.; DEMBRY, L. M.; SOBEL, J. D.; ZERVOS, M. J. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 1, p. 195-201, 1993.

VERMISKY, J. P.; SELF, M. J.; CHADMICK, S. G.; TRAMA J. P.; ADELSON, M. E.; MORDECHAI, E.; GYGAX, S. E. Survey of vaginal flora *Candida* species isolates from women of different age groups by use of species specific PCR detection. **Journal Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1501-1503, 2008.

WATSON, C.; CALABRETTO, H. Comprehensive review of conventional and non-conventional methods of management of recurrent vulvovaginal candidiasis. **The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 47, n. 4, p. 262–272.

WHITE, T. C.; AGABIAN, N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases : isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 18, p. 5215-5221, 1995.

WHITE, S. J.; ROSENBACH, A.; LEPHART, P.; NGUYEN, D.; BENJAMIN, A.; TZIPORI, S.; WHITEWAY, M.; MESCAS, J.; KUMAMOTO, C. Self-regulation of *Candida albicans* population size during GI colonization. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. 184, 2007.

WILLIAMS, D.; LEWIS, D. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **Journal of Oral Microbiology**, v. 3, p. 5771-5782, 2011.

XU, Z.; CAO, Y. B.; ZHANG, J. D.; CAO Y. Y.; GAO, P.H.; WANG, D. J.; FU, X.P.; YING, K.; CHEN, W. S.; JIANG, Y.Y. cDNA array analysis of the differential expression change in virulence-related genes during the development of resistance in *Candida albicans*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 7, p. 463-472, 2005.

YANG, R.; WANG, W.; AO, J.; HAO, Z.; ZHANG, J.; WANG, C. Pathogenicity of *Trichosporon asahii* in a murine model of disseminated trichosporonosis. **Chinese Medical Journal**, v. 121, n. 24, p. 2557-2560, 2008.

ZIARRUSTA, G. B. Vulvovaginitis candidiásica. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 19, p. 22-24, 2002.

ZHAO, X.; OH, S. H.; CHENG, G.; GREEN, C. B.; NUESSEN, J. A.; YEATER, K. M.; LENG, R. P.; BROWN, A. J. P.; HOYER, L. L. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. **Microbiology**, v. 150, p. 2415–2428, 2004.

ANEXOS

Anexo B

Protocolo de Avaliação Clínica

Nº Registro

Data:

Data menstruação:

Histórico de recorrência () Sim () Não

Uso de medicação (preencher no ato da coleta)

Antibióticos () Sim () Não Qual? _____

Corticóide () Sim () Não Qual? _____

Antifúngico () Sim () Não Qual? _____

Hormônios () Sim () Não Qual? _____

Anticoncepcionais () Sim () Não Qual? _____

Avaliação Clínica (preencher durante a consulta)

Irritação vulvar com ardor () Presente () Ausente

Prurido () Presente () Ausente

Eritrema () Presente () Ausente

Corrimento () Presente () Ausente Cor:

Placas na vagina () Presente () Ausente

pH vaginal _____

Anexo C

Avaliação Laboratorial

Nº Registro

Data:

Exame direto: Leveduras () Presente () Ausente

Trichomonas () Presente () Ausente

Coloração de Gram

1. Células epiteliais () Presente () Ausente nº.....

2. *Lactobacillus* sp () Presente () Ausente nº.....

3. Clue cells () Presente () Ausente nº.....

4. *Mobilluncus* () Presente () Ausente nº.....

5. Cocos Gram positivos () Presente () Ausente nº.....

6. Leveduras () Presente () Ausente nº.....

7. Hifas () Presente () Ausente nº.....

8. Outros

Cultura

Ágar Sabouraud dextrose () Negativa () Positiva

Aspecto:

CHROMagar Candida () Negativa () Positiva

Cor:

Espécie:

Anexo A

Instituto de Ciências Biomédicas da USP/SP

Termo de consentimento livre e esclarecido

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução nº 196 de 10/10/96 – CNS)

1. Dados de identificação do Paciente ou responsável legal

Nome do Paciente _____

Nº Identidade _____ Data Nascimento ____ / ____ / ____

Endereço: _____ nº _____

Complemento _____ Cep: _____

Cidade _____ Estado _____ Telefone _____

2. Dados sobre o estudo

Título: Candidíase vulvo vaginal:

Perfil fenotípico, genotípico, produção de proteinase (em meio sólido e líquido) e sensibilidade aos antifúngicos de amostras de leveduras isoladas como colonizantes e como agentes de candidíase vulvovaginal primária e recorrente

Pesquisador Responsável Principal: **Débora Moreira**

Coordenador do Projeto: Profª Drª Claudete Rodrigues Paula

Início do Estudo: **05/09/09**

Duração: **5 anos**

3. Explicações do pesquisador ao paciente ou representante legal

a) Esclarecimentos às mulheres

Candidíase vulvovaginal é uma das causas mais frequentes de infecções que acometem as mulheres, atingindo aproximadamente 75% de todas as mulheres. Os principais sintomas provocados pelas infecções vaginais são corrimento, ardor intenso e coceira. A maior parte das mulheres apresentam infecções esporádicas, porém, algumas desenvolvem infecções difíceis de tratar, com vários episódios durante o ano, fato que compromete a qualidade de vida dessas mulheres.

b) Justificativa e objetivo do projeto:

Este projeto tem como objetivos verificar os fatores que podem causar candidíase e o que pode ser feito para melhorar os sinais e sintomas.

c) Procedimentos que serão utilizados e propósitos

Durante a consulta o médico colherá três amostras de secreção vaginal, com auxílio de um cotonete próprio para este fim. Além disso, a cada vez que você apresentar crises de vaginites, basta que você entre em contato com a nossa equipe e uma nova coleta será realizada.

d) Complicações e riscos esperados

A coleta da secreção vaginal é um procedimento indolor e não oferece riscos à sua saúde.

e) Benefícios obtidos

A sua participação, no estudo, não acarretará em custos e nem em pagamento de divisas, porém, além de receber um correto diagnóstico da infecção vaginal, você estará contribuindo para possíveis melhorias na qualidade de vida de outras mulheres.

4. RESPONDA:

1. Fui esclarecida sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e tratamento?

() SIM () NÃO

2. Fui esclarecida sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento ou qualquer outro atendimento médico neste serviço?

() SIM () NÃO

3. Fui esclarecida que não haverá remuneração financeira para minha inclusão no estudo?

() SIM () NÃO

4. Fui esclarecida de que não haverá indenização além das previstas por lei, em reparação a dano imediato aos envolvidos no estudo?
() SIM () NÃO
5. Fui esclarecida sobre a segurança de que minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial?
() SIM () NÃO
6. Estou ciente de que os resultados desta pesquisa sejam favoráveis ou não, serão tornados públicos, sujeito a publicação científica?
() SIM () NÃO
7. Fui esclarecida quanto aos benefícios e riscos destes tratamento e neste momento estou dando meu consentimento para participar dele como voluntária?
() SIM () NÃO
8. Fui esclarecida de que as amostras colhidas poderão ser armazenadas e utilizadas em estudos posteriores?
() SIM () NÃO

V. Consentimento pós informado

Declaro que, após ter sido devidamente esclarecida sobre o projeto de pesquisa acima e informada sobre os riscos e benefícios do estudo, consinto em participar, na qualidade de paciente, deste projeto de pesquisa

São Paulo, ____ de _____ de _____

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador

Fone: 30917294; 88784534