

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GHENIFFER FORNARI

Perfil de suscetibilidade *in vitro* e caracterização molecular de leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes com vulvovaginite

Curitiba

Março de 2013

GHENIFFER FORNARI

Perfil de suscetibilidade *in vitro* e caracterização molecular de leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes com vulvovaginite

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof^o Dr. Flávio Queiroz Telles Filho.

Co-orientadores: Prof^a Dr^a Vânia Aparecida Vicente e Prof^o Dr. Newton Sérgio de Carvalho.

Curitiba

2013

DEDICO

**Dedico este trabalho as pessoas que são a razão da
minha existência Meus Pais: Nelcy e Ari,
Meu irmão Geovani,
E meu amor Ricardo.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o. Dr Flávio Queiroz Telles Filho pela amizade, disposição e orientação.

À Prof^a Dr^a. Vânia Aparecida Vicente pela amizade e disposição constante neste tempo de convívio, pelo apoio nos momentos difíceis e orientação.

Ao Prof^o. Dr. Newton Sérgio de Carvalho pela orientação e colaboração.

Aos colegas do Labmicro – Biomol, pelo incentivo e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Micologia pela indispensável orientação e apoio, pelas importantes contribuições metodológicas no desenvolvimento de algumas etapas.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e ao Corpo Docente do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Aos funcionários, aos residentes do departamento de Toco-ginecologia do Hospital de Clínicas.

Aos pacientes que colaboraram e foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa de estudo e suporte financeiro .

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A candidíase vulvovaginal afeta mulheres em idade reprodutiva representando aproximadamente 15 a 25% dos casos de vaginites. As diferentes espécies de *Candida* relacionadas à infecção podem ser encontradas na mucosa vaginal como colonizadoras e, em condições apropriadas, aceleram o processo de multiplicação e expressam fatores de virulência. O objetivo deste trabalho foi isolar leveduras de pacientes com ausência de sintomas clínicos (grupo colonizado) e de portadores da infecção. O perfil de sensibilidade *in vitro* destes isolados foi estabelecido e marcadores moleculares utilizados para identificar a distribuição das espécies. Um total de 40 isolados foram obtidos e identificados através do Cromoagar, sistema API20aux e pelo seqüenciamento das regiões ITS e D1/D2 do gene DNAr. Diferentes isolados de *C. albicans* foram genotipados pelo sistema ABC. A análise multilocus confirmou isolados das espécies *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr* e *Saccharomyces cerevisiae*. A espécie prevalente foi a *C. albicans*. No grupo colonizado foi encontrado *C. albicans* (60%), *C. glabrata* (25%), *C. guilliermondii* (5%), *C. kefyr* (5%) e *Saccharomyces cerevisiae* (5%). No grupo com infecção não complicada todos os isolados eram *C. albicans* (100%) e no grupo de infecção complicada a maioria eram *C. albicans* (90,9%), seguido de *C. dubliniensis* (9,1%). Os diferentes isolados de *C. albicans* foram divididos em dois grupos genotípicos (A e B). Em relação ao perfil de sensibilidade *in vitro* dos isolados das diferentes espécies de *Candida* procedentes dos diferentes grupos estudados, pode se afirmar que os isolados obtidos a partir do grupo com infecção complicada apresentaram resistência a nistatina e eram sensíveis ao fluconazol, anfotericina B e cetoconazol, enquanto que os isolados do grupo com infecção não complicada e colonizada e indivíduos colonizados apresentaram sensibilidade dose dependente aos antifúngicos fluconazol, anfotericina B e cetoconazol. Os isolados de *C. albicans* pertencentes aos diferentes grupos genotípicos (A e B) não apresentaram correlação com os testes de suscetibilidade *in vitro*.

Palavras-chave: candidíase vulvovaginal; suscetibilidade *in vitro*; variabilidade genética.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis affects women of reproductive age representing approximately 15 to 25% of vaginitis cases. Different *Candida* species related to infection can be found colonizing the vaginal mucosa, and under appropriate conditions boost the reproduction process and express virulence factors. This study aimed to isolate yeasts of patients with clinical symptoms absence (colonized group) and also the ones with infection. The susceptibility of *in vitro* profile from these isolates was established and molecular markers were used to identify the species distribution. A total of 40 isolates were obtained and identified through the Chromagar API20aux system and by sequencing of ITS regions and D1/D2 from the DNAr gene. Different *C. albicans* strains were genotyped by the ABC system. The multilocus analysis confirmed Isolates of *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr* and *Saccharomyces cerevisiae*. The most prevalent species was *C. albicans*. In the colonized group it was found *C. albicans* (60%), *C. glabrata* (25%), *C. guilliermondii* (5%), *C. kefyr* (5%) and *Saccharomyces cerevisiae* (5%). In the uncomplicated infection group all isolates were *C. albicans* (100%) and in the complicated infection group most of the isolates were *C. albicans* (90.9%), followed by *C. dubliniensis* (9.1%). The different isolates of *C. albicans* were divided into two genotypic groups (A and B). Regarding the profile of sensibility *in vitro* of the isolates of different species of *Candida* derived from distinct groups that were studied, it can be confirmed that the isolated obtained from the complicated infection group present resistance to nystatin and were sensitive to fluconazole, amphotericin B and ketoconazole, while the colonized presented dose-dependent sensitivity to the antifungal agents fluconazole, amphotericin B and ketoconazole. The *C. albicans* isolates which belong to different genotypic groups (A and B) did not show any correlation with the susceptibility tests *in vitro*.

key-words: vulvovaginal candidiasis; susceptibility *in vitro*; variability genetic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 ÁRVORE FILOGENÉTICA DE MAXIMUM LIKELIHOOD BASEADA NO ALINHAMENTO DA REGIÃO COMPLETA DE ITS1/ITS2 E D1/ D2 CONSTRUÍDA COM 100 BOOTSTRAP	39
FIGURA 2: GEL ABC GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS DE C. ALBICANS DOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ISOLADOS CLÍNICOS HOSPITAL DE CLÍNICAS, UFPR.....	30
TABELA 2: ISOLADOS REFERÊNCIA.	32
TABELA 3: CRITÉRIOS DE LEITURA PARA OS VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA OS ANTIFÚNGICOS FLUCONAZOL, NISTATINA E ITRACONAZOL E ANFOTERICINA B.	35
TABELA 4: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC), PARA OS GRUPOS ESTUDADOS FRENTE AOS ANTIFÚNGICOS.....	42

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

CVV- Candidíase vulvovaginal

CVVR- Candidíase vulvovaginal recorrente

C- controle

INC- infecção não complicada

IC- infecção complicada

μL - Microlitro

18S - Subunidade ribossomal menor

26S - Subunidade ribossomal maior

DNA_r - Ácido desoxiribonucléico ribossomal

DNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

ITS - Internal transcribed Spacer

mg- Miligramas

ng - Nanogramas

pb - Pares de bases

PCR - Polymerase Chain Reaction

CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures

NaCl – Cloreto de sódio

CTAB - Cetyltrimethylammonium bromide

dNTP - didesoxirribonucleotídeo trifosfato

CIA - Clorofórmio Álcool isoamílico

SDD- sensibilidade dose-dependente

R- resistente

S- sensível

ALS- Agglutinin-Like Sequence

D1/D2- região 26S do gene que codifica RNA ribossômico

HWP1- Hyphal Protein One

ECS- células epiteliais

TLRS- dectina 1 e receptores *Toll-like*

SAP- *Amyloid P component*

CDC - *Center for Disease control*

ACOG - *American College of Obstetricians and Gynecologists*

CIM - concentração inibitória mínima

RFLP - polimorfismo de Fragmentos de Restrição

RAPD- DNA polimórfico amplificado aleatoriamente

PFGE- eletroforese de campo pulsado

NCBI - National Center for Biotechnology Information

CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Objetivos	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. Revisão da Literatura	17
3.1 O gênero <i>Candida</i>	17
3.2 Mecanismos de Colonização e Infecção do Hospedeiro	18
3.3 Infecções Vulvovaginais por Leveduras do Gênero <i>Candida</i>	21
3.4 Tratamento, Testes de Suscetibilidade e Fatores de Resistência.....	23
3.5 Caracterização molecular de leveduras do gênero <i>Candida</i>	27
4. Materiais e Métodos	30
4.1 Isolados utilizadas	30
4.2 Casuística.....	30
4.3 Coleta, isolamento e identificação fenotípica	32
4.4 Caracterização molecular dos isolados de <i>Candida</i> spp.....	33
4.5 Alinhamento e construção filogenética	34
4.6 Testes de suscetibilidade <i>in vitro</i>	34
5. Resultados	36
6. Discussão	41
7. Conclusões	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE	61

1. Introdução

A candidíase vulvovaginal (CVV), ou candidose é uma micose oportunista primária ou secundária, endógena ou exógena também conhecida como doença sexualmente transmissível (DST) causada por leveduras do gênero *Candida* (SOBEL, 2007; BARBEDO e SGARBI, 2010). É caracterizada por uma inflamação da mucosa genital devido ao aumento da proliferação de leveduras (ROSA e RUMEL, 2004; CARVALHO *et al.*, 2002).

O gênero *Candida* abriga aproximadamente 300 espécies heterogêneas em suas características morfofuncionais, as quais são componentes da microbiota humana, habitando de forma sapróbia pele, trato digestivo, tegumento cutâneo e mucoso, incluindo o trato geniturinário (FERRAZZA *et al.*, 2005; MAHMOUDI *et al.*, 2010). A CVV é causada predominantemente pela espécie *C. albicans*, sendo que a prevalência desta levedura pode atingir 85-95% (SOBEL, 2007). No entanto, infecções por *Candida* não-*albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kyfer* e *C. lusitaniae*) estão aumentando, em algumas populações, *C. albicans* foi encontrado em apenas 50% dos casos (FERRAZZA *et al.*, 2005).

As leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota da mucosa vaginal e estão presentes em 20% a 80% da população em idade adulta considerada saudável, com manifestações clínicas aparentes em 10% das mulheres na pré-menopausa, 5 a 10% na menopausa e 30% das gestantes (CORRÊA *et al.*, 2009). Em um estudo realizado por Gondo *et al.*, (2010), no interior do estado de São Paulo - Brasil, avaliando a flora vaginal de 289 mulheres grávidas, verificaram que 11,8% apresentavam sintomas clínicos da doença.

Candida spp. está relacionada etiologicamente com infecção vulvovaginal (CVV) que afeta mulheres em idade reprodutiva representando aproximadamente 15 a 25% dos casos de vaginites (GALLE e GIANINNI, 2004). Estes microrganismos costumam permanecer abrigados na mucosa vaginal apenas como colonizadores e, em condições apropriadas, aceleram o processo de multiplicação e expressam fatores de virulência, culminado com a invasão da mucosa e ocasionando a CVV sintomática (BARRENETXEA, 2002).

Estima-se que 75% das mulheres apresentarão ao menos um episódio da infecção no decorrer de sua vida, 40-50% terão um segundo episódio e 5-8% delas terão infecção complicada ou recorrente caracterizada pela apresentação de quatro episódios em um ano (SOBEL *et al.*, 1988; SOBEL, 2007). A espécie *C. albicans* é responsável por 70 a 90% dos casos de CVV. As espécies não-albicans representam 10 a 30% dos casos restantes (GE *et al.*, 2010).

A CVV pode apresentar-se em episódios esporádicos ou recorrentes, como infecção primária ou secundária, associada a diversas causas como desequilíbrio hormonal, distúrbios metabólicos, uso de medicamentos como antibióticos e contraceptivos, e doenças associadas com imunossupressão. Estudos sugerem que pode haver uma predisposição genética em mulheres que apresentam episódios esporádicos ou frequentes (ACHKAR e FRIES, 2010).

Os sinais clínicos característicos da CVV possuem intensidades variáveis, mas sintomatologia semelhante, com a presença de disúria, eritema, edema vulvar, escoriações, fissuras, ardência, prurido vulvar, corrimento persistente espesso esbranquiçado e dispareunia. Entretanto estes sinais e sintomas são inespecíficos e apresentam uma etiologia variável, podendo esta ser de natureza infecciosa ou não. (BOATTO *et al.*, 2007; PAPPAS, *et al.*, 2009).

A identificação de leveduras envolvidas em CVV é importante para esclarecer a distribuição de *Candida albicans* e não-albicans em diferentes populações, além de proporcionar o tratamento adequado em relação à escolha do antifúngico baseado no perfil de sensibilidade da espécie (ASTICCIOLI *et al.*, 2009). O diagnóstico pode ser realizado através de colpocitologia de rotina, entretanto não é possível a identificação da espécie envolvida (MUSIAL *et al.*, 2009).

A CVV é uma doença não notificada, por isso sua incidência exata é desconhecida. Uma vez que o diagnóstico é realizado, o tratamento medicamentoso é iniciado sem os testes confirmatórios. Por esta razão, torna-se de grande relevância um estudo epidemiológico que possa esclarecer os mecanismos envolvidos na infecção (ACHKAR e FRIES, 2010).

O tratamento de infecções fúngicas é limitado aos derivados poliênicos e azólicos (GHANNOUM e RICE, 1999). Para os derivados poliênicos como a nistatina (NIS) que tem sido utilizada há quase três décadas, tem-se observado uma alta frequência de isolados de amostras de secreção vaginal com suscetibilidade dose-dependente (SDD) a esta droga (DOTA *et al.*, 2008). Anfotericina B é uma excelente

opção terapêutica pela sua alta eficácia. No entanto é altamente tóxica, e por isso, apenas formulações tópicas são utilizadas em CVV (DOTA *et al.*, 2008). Entre os azólicos, o fluconazol (FLU) é um dos mais utilizados em CVV, porém observa-se um aumento do perfil de resistência em *C. albicans* e não-*albicans* (SOBEL, 2007; SOBEL *et al.*, 1998). Portanto há diferenças no que diz respeito às espécies de leveduras isoladas de amostras vaginais bem como, em seus perfis de suscetibilidade aos antifúngicos.

De acordo com Sanguinetti *et al.*, (2005) métodos de identificação de leveduras na prática clínica são realizados baseados em marcadores morfológicos e bioquímicos (assimilação de hidratos de carbono e fermentação de açúcares). Estes métodos fenotípicos, incluindo os automatizados, podem levar a erros de identificação em nível de espécie (LOCKHART *et al.*, 2008). Métodos moleculares têm sido utilizados na identificação e detecção de variabilidade baseados no sequenciamento de regiões ITS1, 5,8 e ITS2 do DNA ribossomal e do domínio variável (D1/D2) da região 26S do gene que codifica RNA ribossômico (WILLIAMS *et al.*, 1995).

A determinação da suscetibilidade *in vitro* e a identificação das espécies de *Candida* sp. têm sido recomendadas para alguns casos de candidíase de orofaringe, micoses sistêmicas e candidíase vulvovaginal recorrente, em consequência ao crescente problema de resistência aos antifúngicos usuais (ZARDO e MEZZARI, 2004).

Devido ao fato da espécie *C. albicans* apresentar sensibilidade variável aos derivados azólicos, torna-se necessário identificar o perfil de sensibilidade a diferentes drogas, para uma melhor conduta terapêutica (DALAZEN *et al.*, 2011). Com a evolução dos fungos e a ampla utilização de derivados azólicos, houve um aumento no desenvolvimento de fatores de resistência aos fármacos. Mutações espontâneas ou induzidas podem ocorrer levando a alteração nos aminoácidos no domínio protéico responsáveis pela interação entre o fármaco e o alvo, diminuindo a concentração da droga (FERREIRA *et al.*, 2005). Poucos estudos têm focado na correlação de suscetibilidade aos antifúngicos com os resultados clínicos em CVV (MONROY-PEREZ *et al.*, 2012).

A *C. albicans* possui diversos fatores de virulência incluindo formação de hifas, secreção de enzimas hidrolíticas e aderência a células epiteliais. Membros da família do gene ALS (Agglutinin-Like Sequence) codificam glicoproteínas de parede

celular, que estão altamente relacionadas com a adesão na superfície do hospedeiro. Além disso, Sundstrom *et al.*, (2002) demonstraram o papel da proteína HWP1 (Hyphal Protein One) na aderência de *C.albicans* em células epiteliais durante a fase parasitária (micelial). Monroy-Perez *et al.*, (2012) utilizando PCR em tempo real demonstraram que todos os genes da família ALS e o gene HWP1 eram expressos durante a infecção vaginal e que a interação destes genes pode representar um papel importante nesta expressão. Kurtzman e Robnett (1997) propuseram um método de genotipagem baseado nas variações decorrentes de inserções e deleções do gene 26S de *C. albicans* denominado de sistema ABC, o qual pode ser utilizado para identificar genótipos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar através de métodos moleculares isolados do gênero *Candida* procedentes de pacientes com ausência de sintomas clínicos de vaginite e portadores da infecção, atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná; visando identificar a distribuição e a sensibilidade *in vitro* das espécies de *Candida* spp. em mulheres colonizadas pela levedura e portadoras da infecção.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar leveduras do gênero *Candida* de pacientes com ausência de sintomas clínicos de vaginite e portadores da infecção, atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná;
- Caracterizar por meio de marcadores fenotípicos API 20aux e Cromoágar os isolados clínicos de CVV;
- Identificar as espécies relacionadas à CVV utilizando análise multilocus das regiões gênicas ITS1, 5.8S, ITS2 e D1/D2 do rDNA;
- Estabelecer o perfil de suscetibilidade *in vitro* a antifúngicos utilizados na clínica;
- Correlacionar o perfil genotípico ABC dos isolados clínicos de CVV e o seu perfil de suscetibilidade a antifúngicos.

3. Revisão da Literatura

3.1 O gênero *Candida*

Leveduras do gênero *Candida* são ascomicetos, taxonomicamente organizadas dentro do Reino Fungi como Eumicetos (Divisão Eumicota), pertencentes à Classe Hemiascomycetes e Ordem Saccharomycetales reunidas dentro da Família Saccharomycetaceae no gênero *Candida* (GUARRO *et al.*, 2000). Embora estas leveduras sejam comensais na maioria dos indivíduos, sob certas circunstâncias podem crescer demasiadamente causando uma variedade de doenças, denominadas oportunistas. Estas doenças vão desde as infecções superficiais da mucosa vaginal e bucal, a infecções sistêmicas que acomete corrente sanguínea e órgãos (MORAN *et al.*, 2012).

O gênero *Candida* compreende, portanto espécies caracterizadas pelo polimorfismo e desenvolvimento sapróbio e coradas de gram positivas (SOBEL *et al.*, 1998; SPINILLO *et al.*, 1999). *Candida albicans* é amplamente reconhecida como a causa mais comum de infecções superficiais e sistêmicas. Outras espécies, como a *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* também têm sido associadas a infecções, a distribuição relativa de cada espécie pode variar, dependendo da localização geográfica, grupo de pacientes, e exposição prévia a drogas antifúngicas (RUHNKE, 2006; BARTELLI *et al.*, 2013).

Estudos sugerem que a levedura *C. albicans* é um organismo diplóide obrigatório com oito cromossomos. Isolados clínicos identificados como sendo haploides (estirpes raras) podem sofrer alterações transformando-se em um organismo diplóide. Apesar de possuir toda a maquinaria necessária para realizar meiose, essa divisão celular nunca foi observada nessa espécie (KRUPPA, 2008; NEIL e GOW, 2013). Leveduras do gênero *Candida* são fungos encontrados nos mais variados substratos desde solo, plantas vivas ou mortas além de espécies que habitam normalmente mucosas humanas (GUARRO *et al.*, 2000). As espécies do gênero *Candida* são heterotróficas, aeróbias e fermentadoras, não assimilam mio-Inositol e creatinina (GUARRO *et al.*, 2000), porém podem se desenvolver sob condições de microaerofilia, o que pode explicar, por exemplo, a colonização destes

agentes em determinados sítios como o cólon humano (SCHULZE e SONNENBOURN, 2009).

O gênero *Candida* apresenta como características morfológicas colônias cremosas de coloração branca ou bege constituídos por células de aproximadamente 3-8 x 2-7 μ m. A caracterização das estruturas microscópicas é frequentemente realizada a partir dos meios Ágar fubá e Ágar batata dextrose, podendo visualizar estruturas como blastoconídios com ou sem brotamentos, clamidoconídios e pseudo-hifas que se alongam a partir das células de origem (BERARDINELLI e OPHEIM, 1985; ODDS e BERNAERTS, 1994; GUARRO *et al.*, 2000).

Mecanismos reguladores do crescimento refletem diretamente na concentração de células da população destas leveduras sob um determinado sítio do hospedeiro, o que parece influenciar na manutenção do equilíbrio entre colonização e desenvolvimento da doença (WHITE *et al.*, 2007). Além dos mecanismos biológicos do agente, existe uma série de fatores associados ao desenvolvimento da infecção de natureza oportunista causada por estes agentes, entre os quais estão à alteração da imunidade causada por estresse, drogas supressoras, doenças infecciosas e autoimunes; além de predisposição genética do hospedeiro, associadas às alterações do meio ambiente como diminuição do pH vaginal devido a diabetes, variações hormonais e uso de antibióticos que desequilibram a microbiota normal (KIRKPATRICK, 1984; ROSA e RUMEL, 2004; ASTICCIOLI *et al.*, 2009; ACHKAR e FRIES, 2010).

3.2 Mecanismos de Colonização e Infecção do Hospedeiro

A condição em que se encontra o sistema imune inato do hospedeiro é bastante relevante no que se refere à infecção. A interação da *C. albicans* com as células fagocitárias promove uma regulação diferencial de mais de 500 genes da levedura, adaptando esse organismo através de alterações em importantes vias metabólicas, como a repressão da glicólise e a ativação de vias requeridas em condição de baixa fonte de carbono como a β -oxidação e a gluconeogênese (RAMÍREZ e LORENZ, 2007).

Estudos das vias metabólicas de *C. albicans* têm revelado que o ciclo do glioxilato, uma via alternativa de metabolismo de Acetil-CoA, é necessário para que a levedura se torne totalmente virulenta. Esse mecanismo está presente em outros

fungos e ainda em algumas espécies de bactérias. No entanto, além do ciclo do glioxilato, pouco se conhece sobre as vias metabólicas envolvidas na utilização de nutrientes durante a infecção (ENE *et al.*, 2013).

Cassone *et al.*, (2007), destacam que mecanismos da resposta imune inata e humoral conseguem restringir o crescimento do fungo e neutralizar seus fatores de virulência e apontam prováveis falhas nestes mecanismos associadas ao desenvolvimento de manifestações clínicas como as CVV (ACHKAR e FRIES, 2010; SOBEL, 2007; SIMÕES *et al.*, 2006).

Em estudos realizados por Sobel (2007), estes eventos são multifatoriais e envolvem fatores genéticos relacionados ao hospedeiro e aos microrganismos. Alguns autores apontam que o desenvolvimento de CVV é resultante de um aumento exagerado no número de *Candida* spp. os quais relacionam o uso de antifúngicos e duchas vaginais como uma das causas para esse super crescimento (CHENG *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2009), justificando que tais medidas poderiam afetar o equilíbrio da microbiota, levando á diminuição do número de lactobacilos e conseqüentemente afetando a competitividade e favorecendo o crescimento das leveduras. Análise proteômica mostra que a parede celular de *C. albicans* sofrem importantes alterações em resposta a mudanças ambientais como variação do pH e alteração na fonte de carbono. Muitas proteínas que sofrem alteração contribuem para a aderência, estresse e resistência a drogas antifúngicas (ENE *et al.*, 2012).

A primeira barreira em nível de mucosa vaginal contra as leveduras do gênero *Candida* são as células epiteliais (ECS), estas células expressam diferentes receptores de reconhecimento como a dectina 1 e receptores Toll-like (TLRS) (STEELE e FIDEL, 2002; HORNEF e BOGDAN, 2005). As ECS ativam várias células do sistema imunológico, liberando citocinas pró-inflamatórias ou quimiocinas que ativam neutrófilos e posteriormente inicia os sintomas de inflamação (FIDEL, 2007; JAEGER *et al.*, 2013).

De acordo com Naglik *et al.*, (2006), as ECS reconhecem as leveduras do gênero *Candida*, mas a ativação de secreção de quimiocinas somente ocorre quando as leveduras invadem a mucosa através da formação de hifas. Nos estudos realizados *in vitro* demonstrou que as ECS inibem o crescimento de *Candida* spp. (BAROUSSE, 2001; JAEGER *et al.*, 2013).

A CVV é uma inflamação da mucosa genital, que compromete principalmente vulva e vagina, desenvolve-se em decorrência de infecção por leveduras colonizadoras destas mucosas. De acordo com a literatura (FERRAZA *et al.*, 2005), as leveduras podem ser carreadas para a vagina por meio de processo de auto-transmissão como por exemplo pela região perianal, tendo como fonte a microbiota normal do próprio intestino ou através da via sexual (CORRÊA *et al.* 2009). Entretanto, estes microrganismos costumam permanecer abrigados na mucosa apenas como colonizadores e, uma vez encontrando condições apropriadas, aceleram o processo de multiplicação e expressam fatores de virulência, culminado com a invasão da mucosa e ocasionando a CVV sintomática (FERRAZA *et al.*, 2005).

A habilidade da *C. albicans* em causar doenças está relacionada a alterações no nível de transcrição de vários genes em resposta a diferentes ambientes e estresses. Por exemplo, a expressão de genes que controlam modificações na morfologia das células dessa levedura (oval ou filamentosa) está ligada a virulência e ocorrem em resposta a estímulos específicos. Análises utilizando a tecnologia de RNA-seq avaliaram a expressão de genes em 9 condições de crescimento diferentes. Genes associados à virulência como o ALS3 e o Hwp1 tem sua expressão regulada de acordo com a condição de crescimento (VICENT *et al.*, 2010).

A família gênica ALS (*agglutinin-like sequence*) é composta de nove genes distintos no genoma de *C. albicans* relacionados a diversos fatores de virulência incluindo formação de hifas, secreção de enzimas hidrolíticas e aderência de células epiteliais (ZHAO *et al.*, 2004).

Outro fator de virulência conhecido é a “Proteína 1” de parede (Hwp1), uma adesina importante para *Candida* spp.. Esta somente é encontrada na superfície do tubo germinativo e provavelmente é responsável pela ligação entre levedura e células do hospedeiro. Em um estudo realizado por Naglik *et al.*, (2006) com amostras provenientes de mulheres assintomáticas e sintomáticas para CVV, verificou-se que houve expressão do gene Hwp1 em ambos os grupos, enquanto que nas mulheres do grupo controle (negativo) não houve expressão.

As espécies do gênero *Candida* apresentam adaptabilidade a alterações rápidas na expressão de genes em resposta a diversos estímulos ambientais. Estes

mecanismos favorecem a aderência, formação de hifas, liberação de enzimas hidrolíticas e formação de biofilmes (NAGLIK *et al.*, 2003; ACHKAR e FRIES, 2010).

A família de genes SAP exerce um papel fundamental na virulência, contribuindo para a invasão de mucosa e está bem caracterizada em níveis de expressão. É composta por dez genes os quais foram sequenciados e caracterizadas (NAGLIK, 2008). Os genes SAP1 e SAP3 estão relacionadas à infecção de mucosa, SAP 4 e 6 à infecções sistêmicas (GHANNOUM e RICE, 1999). Em um estudo realizado na China com mulheres colonizadas e sintomáticas para CVV, foi possível detectar através da RT-PCR a expressão de SAP1 e SAP3 no grupo sintomático e SAP1 e SAP7 nas colonizadas (LIAN e LIU, 2007).

Futuros estudos são necessários para avaliar a interação entre hospedeiro e genomas de fungos e a interação do complexo ecológico e evolutivo que podem levar à associação do potencial de certos isolados de *Candida* com a constituição genética do hospedeiro (JAEGER *et al.*, 2013).

3.3 Infecções Vulvovaginais por Leveduras do Gênero *Candida*

A vulvovaginite é uma expressão para diversas patologias que acometem o trato genital inferior feminino, sendo reconhecida como distúrbio potencialmente grave para a saúde genital das mulheres (LINHARES *et al.*, 2010). No entanto, é importante ressaltar que sinais e sintomas não determinam a presença do agente etiológico. De acordo com o CDC (*Center for Disease control*) e o ACOG (*American College of Obstetricians and Gynecologists*), o diagnóstico etiológico deve ser feito pelo exame microscópico da secreção a fresco e verificação do pH vaginal (CAVALCANTI e MARTINS, 2007).

Estas manifestações clínicas podem ser classificadas em inespecíficas e específicas. Na primeira, nenhum agente etiológico específico é identificado e são geralmente relacionadas à contaminação secundária e precariedade de higiene. As vulvovaginites específicas são causadas por agentes etiológicos bem definidos. Embora alguns agentes não estejam relacionados à transmissão não sexual, as vulvovaginites costumam ser observadas em mulheres adolescentes sexualmente ativas (LOURENÇO, 2009).

A sintomatologia da doença é caracterizada por intensidades variáveis como prurido, ardor na micção e durante relação sexual, corrimento grumoso, edema vulvar podendo haver formação de fissuras. Algumas pacientes podem desenvolver

uma infecção contínua ou apresentar recidivas regulares. Clinicamente não é possível distinguir entre a infecção por *C. albicans* das outras espécies (LOPES-CONSOLARO *et al.*, 2004).

Estes microrganismos costumam permanecer abrigados na mucosa vaginal apenas como colonizadores e, uma vez encontrando condições apropriadas, aceleram o processo de multiplicação e expressam fatores de virulência, culminado com a invasão da mucosa e ocasionando a CVV sintomática (FERRAZA *et al.*, 2005).

Estudos sobre a prevalência de CVV com diagnóstico pós-cultura indicam que, embora a espécie mais frequente seja *C. albicans* (80% de ocorrência), a frequência de outras espécies denominadas de “não albicans” está aumentando, sendo as espécies *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* as mais encontradas (CORREA *et al.*, 2009). Alguns autores (ODDS *et al.*, 1994) apontam o uso de antifúngicos em grande escala como um dos prováveis fatores responsáveis por este fenômeno.

Em um estudo realizado por Dai *et al.*, (2010) em Sichuan na província da China, a prevalência de CVV foi de 6,5%, os resultados sugeriram que a idade foi o fator mais fortemente associada com vaginite na área tibetana. Um estudo prospectivo realizado Hospital Mahdieh (Teerã, Irã), foram avaliados 191 isolados obtidos a partir de 175 amostras vaginais, *Candida albicans* representou 67% dos isolados, incluindo infecções simples e mistas. As demais espécies identificadas foram *Candida glabrata* (18,3%), *Candida tropicalis* (6,8%), *Candida krusei* (5,8%), *Candida parapsilosis* (1,6%), e *Candida guilliermondii* (0,5%), respectivamente. Infecção mista com duas espécies de *Candida* ou mais foi visto em 10,3% dos pacientes (MAHMOUDI *et al.*, 2010). FERRAZA *et al.* (2005) avaliaram a distribuição e prevalência de espécies no Sul do Brasil e verificaram que no estado de Santa Catarina, 77,4% dos casos eram causados por *C. albicans*, enquanto que no estado do Paraná, o predomínio desta espécie era de 50%. Souza *et al.*, (2009) em um estudo retrospectivo realizado no Sistema Único de Saúde (SUS) e da rede privada (RP) em Maringá/Paraná, um total de 94.203 relatos de citologia foram avaliados, com uma prevalência de *Candida* sp. de 4,94%. Um estudo realizado em Unidades Básicas de Saúde de Ilhéus e Itabuna na Bahia foi coletado 286 amostras, um total de 47,9% das mulheres com suspeita clínica obteve confirmação de candidíase pelos exames laboratoriais (ANDRIOLI *et al.*, 2009). Recentemente foram

examinados a incidência, prevalência e fatores de risco para candidíase vulvovaginal em um estudo de coorte de 898 mulheres no sul da Índia, a prevalência encontrada foi de 12% para CVV (RATHOD *et al.*, 2012).

3.4 Tratamento, Testes de Suscetibilidade e Fatores de Resistência

O tratamento para *Candida* spp. inclui os derivados imidazólicos (miconazol e cetoconazol), os triazólicos de 1ª geração (itraconazol e fluconazol) e os de 2ª geração (voriconazol, posaconazol e ravuconazol). Dentre estes, destaca-se o fluconazol, pela eficácia terapêutica, custo relativamente baixo, boa tolerância e baixa incidência de efeitos adversos, sendo frequentemente prescrito de forma empírica, às pacientes com suspeita de candidíase (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; CHEN e SOBEL, 2005; PFALLER e DIEKEMA, 2007; FERREIRA, 2005).

O tratamento de CVV deve ser realizado de acordo com o histórico individual da mulher, sendo importante a classificação da CVV para a determinação da duração do mesmo (SOBEL *et al.*, 2004). As infecções vulvovaginais devem ser tratadas por via oral e tópica. O manejo das formas não complicadas, tem sido realizado com dose única de 150mg de fluconazol ou com 200mg de itraconazol por 3 dias. Nos casos complicados, a recomendação é de 10 a 14 dias de tratamento com um derivado azólico tópico ou oral (PAPPAS *et al.*, 2009; COLOMBO *et al.*, 2012).

Em casos de CVV o tratamento é limitado a azólicos com ação fungistática inibindo a síntese de ergosterol, maior componente da célula fúngica. A eficácia do tratamento principalmente em casos de infecção por *C. albicans*, parece estar relacionada com a manutenção da terapia. Os antifúngicos que tem apresentado eficácia no tratamento são fluconazol, clotrimazol e o cetoconazol. O fluconazol tem penetração rápida e concentrações elevadas no tecido vaginal, apresenta elevada solubilidade em água, o sucesso do tratamento depende da meia vida prolongada na mucosa vaginal que deve estar acima da concentração inibitória mínima (MIC) por um período de aproximadamente 96 horas (ROSA *et al.*, 2013).

O cetoconazol não é o mais utilizado principalmente em tratamento em longo prazo, devido ao risco de maior hepatotoxicidade comparado aos azóis e triazóis modernos (BOLOURI *et al.*, 2009).

O mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos é baseado na inibição da síntese de citocromo oxidase P450-mediada de ergosterol (conversão do lanosterol

para o ergosterol), que é um componente essencial da membrana citoplasmática dos fungos (CHARLIER *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2013).

O itraconazol é administrado por via oral tem ação fungicida conforme sua concentração atua na inibição da biossíntese de ergosterol ou outros esteróis, além disso, inibe a biossíntese de triglicérides e fosfolípídeos dos fungos e a atividade enzimática oxidativa e peroxidativa. Em *Candida albicans*, bloqueia a transformação dos blastóporos em sua forma invasora. A meia-vida em equilíbrio dinâmico é de cerca de 30 horas (GOODMAN *et al.*, 2003).

Nistatina é proveniente de *Streptomyces noursei*, seu mecanismo de ação é baseado na ligação ao ergosterol que promove a instabilidade da membrana havendo a liberação de potássio, açúcares e metabólitos. A instabilidade da membrana promovida pelo fármaco é responsável pela morte da célula fúngica (BRAUTASET *et al.*, 2011). Em CVV, este fármaco é utilizado de forma tópica (LAVRA *et al.*, 2008). O mecanismo de ação da anfotericina B é baseado na formação de complexos entre antifúngico e membrana. As moléculas do fármaco se ligam hidrofobicamente com o ergosterol do fungo, alterando a permeabilidade e promovendo o extravazamento dos componentes citoplasmáticos, provocando a morte da célula fúngica (GHANNOUM e RICE, 1999).

A determinação da suscetibilidade *in vitro* e a identificação das espécies de *Candida* sp. têm sido recomendada em casos de candidíase de orofaringe, micoses sistêmicas, pacientes soropositivos e candidíase vulvovaginal recorrente, em consequência ao crescente problema de resistência aos antifúngicos usuais (ZARDO e MEZZARI, 2004). Devido ao fato de *C. albicans* apresentar sensibilidade variável aos derivados azólicos, torna-se necessário à realização de testes que busquem identificar o padrão de sensibilidade a diferentes drogas, para a obtenção de uma melhor conduta terapêutica, pois o perfil de sensibilidade não é o mesmo nas diferentes populações (DALAZEN *et al.*, 2011). Para esta determinação utilizam-se as técnicas de macro ou microdiluição (CLSI, 2008).

Estudos mostraram que o pH do meio, *in vitro* nos testes de susceptibilidade podem alterar o CIM dos antifúngicos azólicos, e que um pH ácido tende a aumentar a CIM de fluconazol para leveduras do gênero *Candida* (MARR *et al.*, 1999; DANBY *et al.*, 2012). Em um estudo realizado por YUAN *et al.*, (2010) que analisou o tratamento de 80 casos recorrentes de candidíase vulvovaginal foi possível concluir

que as medidas eficazes para curar RVVC estão na escolha do medicamento, na terapia de manutenção e restauração do ambiente ácido da vagina.

Com a evolução dos fungos e a utilização contínua de triazóis e azóis, houve um aumento no desenvolvimento de fatores de resistência aos fármacos. Mutações espontâneas ou induzidas podem ocorrer, alteração nos aminoácidos no domínio protéico responsável pela interação entre o fármaco e o alvo diminuindo a concentração da droga (FERREIRA *et al.*, 2005). A resistência é um fenômeno que ocorre *in vivo* e pode estar ou não associada à falha terapêutica. Fatores relacionados à farmacocinética, farmacodinâmica do antifúngico, hospedeiro e espécie estão envolvidos nas diferenças entre suscetibilidade *in vitro* e resposta clínica ao tratamento (PFALLER *et al.*, 2006; PFALLER e DIEKEMA, 2007). A preocupação em longo prazo é o número de antifúngicos disponíveis para o tratamento que continua extremamente limitado (ANDERSON, 2005).

A resistência a antifúngicos é considerada independente para cada classe. A incidência de resistência é diferente entre as espécies de fungos e a distribuição em todo o mundo. A resistência clínica nem sempre está associada à resistência *in vitro*. Os principais mecanismos que envolvem a resistência antifúngica baseiam-se na neutralização dos efeitos fungicidas e fungistáticos de todas as classes de antifúngicos como: a redução do acúmulo de fármaco no interior da célula fúngica; diminuição da afinidade da droga ao alvo e compensar as modificações do metabolismo para o efeito do fármaco (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

O grupo dos azóis é o mais utilizado na prática clínica e, portanto o mais estudado. Os estudos da resistência nesta classe foram baseados nos mecanismos de *C. albicans*. Estes incluem alterações na biossíntese de esterol; mutações no gene ERG11; superexpressão de ERG11 e redução do acúmulo da droga intracelular (MORSCHHAUSER, 2002; MORSCHHAUSER, 2010).

Diversos genes de *Candida albicans* foram identificados relacionados com mecanismos de resistência, entre eles os genes CDR1 e CDR2, genes transportadores, MDR1 facilitador de efluxo, ERG11 e ERG3 genes da biossíntese do ergosterol. Em *Candida* spp. o alvo dos agentes azólicos é a proteína ERG11 envolvida na biossíntese de ergosterol. ERG11 é uma lanosterol 14 α -demetilase. A inibição de lanosterol 14 α -demetilase resulta na inibição na síntese de ergosterol e acúmulo de 14 α -metilergosta-8,24-dieno-3 β ,6 α -diol um esterol metilado que inibe o crescimento das células fúngicas. Este mecanismo é inativado pela enzima esterol

Δ 5,6-dessaturase que atua a jusante da lanosterol 14 α -demetilase na via biossintética do ergosterol, convertendo 14 α -metilfecosterol em 14 α -metil-3,6-diol. Como o esterol 14 α -metilfecosterol suporta o crescimento fúngico e 14 α -metil-3,6-diol é tóxico para a célula, a inativação do esterol Δ 5,6-dessaturase promove a resistência aos azóis (SHYADEHI *et al.*, 1996; FAVRE *et al.*, 1999; SANGLARD, 2002; AKINS, 2005; CHAU, *et al.*, 2005).

As substituições foram encontradas em aproximadamente 140 aminoácidos do gene ERG11, isto sugere que lanosterol demetilase é permissivo a mudanças estruturais, as substituições foram encontradas aleatoriamente no gene, localizadas em três regiões *hot-spot* 105-165; 266-287, e 405-488, vários estudos evidenciam que estas alterações não contribuem para a resistência em azólicos (MARICHAL *et al.*, 1999; MORIO *et al.*, 2010).

Outro mecanismo envolvido na resistência aos azólicos é a ativação de genes que codificam bombas de efluxo, estas exportam o fármaco do meio intracelular para o extracelular reduzindo a concentração dentro da célula fúngica, este mecanismo é um dos principais mecanismos envolvidos na resistência. Duas classes de bombas de efluxo de drogas são distintas em leveduras, os transportadores ABC (ATP- *binding cassette*) codificadas pelos genes CDR1 e CDR2 (*Candida drug resistance*) e os transportadores principais MF (*Major Facilitador*) codificadas por um único gene o MDR1 (*Multi Drug resistance*) (MARIE e WHITE, 2009).

CDR1 e CDR2 são regulados pelo fator de transcrição Tac1 (*Transcriptional Activator of CR genes*), a ativação deste fator é conferida por mutações *gain-of-function* que promovem a expressão de CDR1 e CDR2 (MICHELI *et al.*, 2002; COSTE *et al.*, 2006). A bomba de efluxo codificada pelo gene MDR1 utiliza do gradiente eletroquímico para a expulsão dos substratos (ALARCO, 1999; NOEL, 2012).

A resistência deve ser considerada um problema para o tratamento antifúngico futuro, por isso os testes de sensibilidade são de extrema importância para o desenvolvimento de novos fármacos. A diferença na sensibilidade e nos mecanismos de resistência aos azólicos tem sido observada entre as espécies. Os mecanismos de resistência não estão ainda totalmente elucidados e desta forma, pesquisas adicionais são necessárias (GUPTA e TOMAZ, 2003). O aumento de relatos de resistência de *Candida* não-albicans é considerada preocupante e pode

estar associado ao aumento significativo destes isolados, porém fatores genéticos, imunológicos, de base comportamental e nutricional entre outros devem ser avaliados na pré-disposição para a doença (ACHKAR e FRIES, 2010).

3.5 Caracterização molecular de leveduras do gênero *Candida*

Os avanços da biologia molecular, genoma, proteômica e bioinformática estão ajudando a esclarecer no diagnóstico mais sensível, específico e rápido de microrganismos patogênicos. As ferramentas utilizadas na biologia molecular têm contribuído na seleção de antígenos fúngicos para a produção de proteínas recombinantes para testes sorológicos. As técnicas moleculares tem sido empregadas na identificação e estudos taxonômicos das leveduras do gênero *Candida* principalmente nos casos de espécies estreitamente relacionadas. O avanço desta área tem aumentado a capacidade de estudos relacionados às inúmeras infecções fúngicas, principalmente as oportunistas (LAIN, 2008; COSTA, 2007; CORNET *et al.*, 2011).

Com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR) Einsele *et al.* (1997) conseguiram detectar através de sondas moleculares e PCR específica a presença de patógenos fúngicos no sangue, como espécies de *Candida* spp. e *Aspergillus* sp., possibilitando a detecção de infecções causadas por mais de um patógeno fúngico.

A *C. albicans* é a espécie mais estudada entre as leveduras do gênero *Candida*, essa espécie teve o início do genoma sequenciado em outubro de 1996 e finalizado em 2004 na Universidade de Stanford Genome Technology Center, onde foi possível reunir 412 contigs. Seu genoma completo possui 15,6Kb em 8 cromossomos (JONES *et al.* 2004). O cromossomo 7 de 1MB de tamanho é o melhor caracterizado até o momento (CHIBANA *et al.*, 2005; GOW, 2013). O genoma de *C. albicans* tem sido analisado extensivamente para a identificação de variabilidade intraespecífica. Vários marcadores moleculares foram desenvolvidos para distinguir isolados clínicos e auxiliar na identificação da fonte de contaminação (CLIFF *et al.*, 2008; FANELLO *et al.*, 2001).

Marcadores baseados em sequências altamente específicas como os DNA “fingerprinting” (impressão genética), os baseados em polimorfismo de Fragmentos de Restrição (RFLP), DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), eletroforese de campo pulsado (PFGE) e os *Southern blotting* tem sido amplamente

utilizados para a caracterização molecular de *C. albicans* (RUIZ-DIEZ *et al.*, 1997; FANELLO *et al.*, 2001; NOUMI *et al.*, 2009; HEO *et al.*, 2011). A técnica de *Southern blotting* vem sendo utilizada para estudar o grau de proximidade entre os isolados de *Candida*. Em *C. albicans*, BARTELLI *et al.* em 2013 utilizou o marcador para indicar o alto grau de polimorfismo de tamanho do cromossomo, inclusive em cromossomos homólogos. Entretanto a interpretação dos resultados desta técnica tem sido questionada devido aos ambíguos e subjetivos diferentes padrões em relação à intensidade e tamanho das bandas.

Um esclarecimento sobre as relações evolutivas filogenéticas das leveduras do gênero *Candida* é extremamente relevante para a compreensão da ecologia, da clínica e diagnóstico dessas leveduras. O método molecular mais confiável é o baseado no sequenciamento, várias abordagens moleculares foram desenhadas principalmente para DNA ribossômico (DNAr), como o domínio D1 e D2 da subunidade 26S e as regiões espaçadoras transcritos ITS1 e ITS2 (WILLIAMS *et al.*, 1995; PINCUS, ORENGA, CHATELLIER, 2007; DESNOS *et al.*, 2008; PUTIGNAN *et al.*, 2008; LAU *et al.*, 2009). Há relatos que as impressões digitais IGS são confiáveis para distinguir *C. famata* de *C. flareri* e 21 outras espécies do gênero *Debaryomyces* (NGUYEN, GAILLARDIN, NEUVEGLISE, 2009). Mas as sequências D1/D2 não são capazes de identificar as relações intergênicas como no caso de espécies estreitamente relacionadas como *Pichia guilliermondii* e *P. caribbica*, *C. mucifera* e *Stephanoascus ciferrii*, bem como *Kluyveromyces marxianus* e *K. lactis* (DANIEL e MEYER, 2003).

Estudos demonstram que a *C. parapsilosis* são mais heterogêneas que outras espécies de *Candida*, por isso a *C. parapsilosis* foi dividida em três grupos com base em diferenças do perfil de amplificação de marcadores RAPD, no sequenciamento e morfotipagem (SZABO *et al.*, 2009; EFFRON *et al.*, 2011). De acordo com Tavanti *et al.*, (2005), os três grupos de *C. parapsilosis* devem ser substituído por três diferentes espécies relacionadas denominada *C. parapsilosis* sensu strito, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Formas atípicas de *C. albicans*, como a *C. africana* encontrados por Tietz, *et al.*, em 2001 a partir de amostras clínicas de vaginite em pacientes africanos, alemães, espanhóis e italianos a princípio foi denominada como uma nova espécie. No entanto estudos baseados em marcadores moleculares mostraram que a *C. africana* era uma variante de *C. albicans* (FORCHE, *et al.*, 1999; ROMEO e CRISEO, 2009). Recentemente, um

método molecular específico foi descrito para diferenciar *C. albicans*, *C. africana* e *C. dubliniensis*, com a utilização de apenas um par de oligonucleotídeos de segmentação do gene Hwp1 e os seus homólogos em um ensaio baseado em PCR, portanto com a utilização deste método foi possível discriminar as espécies de forma fácil e rápida permitindo determinar verdadeira incidência destas espécies em infecções (ROMEO e CRISEO, 2009).

Pesquisas demonstraram que as sequências de genes de actina ofereceram uma melhor resolução filogenética entre as espécies de *Candida* (DANIEL *et al.*, 2001). Clement *et al.*, (2008) conseguiram identificar *C. albicans*, *C. dubliniensis* e as espécies do complexo *C. glabrata* (*C. glabrata*/ *C. bracarensis* e *C. nivariensis*) analisando sequências das regiões espaçadoras intergênicas. Para as espécies *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, *C. famata* de *C. guilliermondii*, *C. carpophila* e *C. fermentati* a identificação foi possível usando o gene IGS.

Atualmente a análise de sequência em multilocos (MLST) que se baseia na análise de pelo menos seis genes housekeeping nucleares têm sido o método mais confiável (ROBLES *et al.*, 2004). Em um trabalho realizado por Clement *et al.* (2008) foi utilizado análise multilocus em espécies de leveduras do gênero *Candida* clinicamente relevantes, utilizando 5 genes e através destes genes foi possível reconstruir a filogenia dos fungos isolados. De acordo com Bartelli *et al.* (2013) a alta variabilidade, o fácil isolamento das leveduras do gênero *Candida* e as ferramentas moleculares podem auxiliar na re-avaliação taxonômica e uma futura delimitação de gêneros monofiléticos.

4. Materiais e Métodos

4.1 Isolados utilizadas

Nesse trabalho foram estudados isolados clínicos de conteúdo vaginal de mulheres atendidas pelo ambulatório da Toco-ginecologia no Hospital de Clínicas da UFPR, Paraná (TABELA 1). O período avaliado foi de novembro de 2011 a outubro de 2012. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Através do termo de consentimento foi possível coletar amostras de 133 mulheres. Os isolados utilizados para análises filogenéticas estão sumarizadas na tabela 1 e 2.

4.2 Casuística

Neste estudo foram incluídas pacientes entre 18 a 56 anos com e sem sintomas clínicos da CVV que ainda não haviam sido submetidas a nenhum tipo de tratamento no período de 6 meses. A população de estudo foi dividida em dois grupos, conforme os critérios definidos por Sobel (2007): Grupo colonizado: mulheres com ausência de sintomas clínicos e Grupo com infecção: mulheres que apresentaram três ou mais dos seguintes sintomas clínicos: corrimento característico, prurido vulvovaginal, ardência vulvovaginal, disúria e dispaurenia. O grupo com infecção foi subdividido em dois subgrupos: infecção complicada onde foram incluídas mulheres com histórico de recorrência, e infecção não complicada pacientes com episódios esporádicos. Os fatores de exclusão foram faixa etária (menor de 18 e acima de 56), gestação, doenças imunossupressoras e sob efeitos de tratamento.

TABELA 1: ISOLADOS CLÍNICOS HOSPITAL DE CLÍNICAS, UFPR.

	Nome	Número de referência	Substrato	Origem geográfica	Genbank	
					ITS	D1D2
1	<i>Candida glabrata</i>	HC01C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HC02C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
3	<i>Candida albicans</i>	HC03C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
4	<i>Candida albicans</i>	HC04C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
5	<i>Candida albicans</i>	HC05C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
6	<i>Candida albicans</i>	HC06C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
7	<i>Candida glabrata</i>	HC07C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
8	<i>Candida guilliermondii</i>	HC08C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
9	<i>Candida kefyr</i>	HC09C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
10	<i>Candida glabrata</i>	HC10C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
11	<i>Candida albicans</i>	HC11C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
12	<i>Candida albicans</i>	HC12C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
13	<i>Candida albicans</i>	HC13C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
14	<i>Candida albicans</i>	HC14C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
15	<i>Candida albicans</i>	HC15C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
16	<i>Candida albicans</i>	HC16C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
17	<i>Candida albicans</i>	HC17C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
18	<i>Candida albicans</i>	HC18C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
19	<i>Candida albicans</i>	HC19C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
20	<i>Candida albicans</i>	HC20C	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
21	<i>Candida albicans</i>	HC01IC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
22	<i>Candida albicans</i>	HC02IC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
23	<i>Candida dubliniensis</i>	HC03IC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
24	<i>Candida albicans</i>	HC04IC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
25	<i>Candida albicans</i>	HC05IC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
26	<i>Candida albicans</i>	HC06IC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
27	<i>Candida albicans</i>	HC07IC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
28	<i>Candida albicans</i>	HC08IC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
29	<i>Candida albicans</i>	HC09IC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
30	<i>Candida albicans</i>	HC10IC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
31	<i>Candida albicans</i>	HC11IC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
32	<i>Candida albicans</i>	HC01INC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
33	<i>Candida albicans</i>	HC02INC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
34	<i>Candida albicans</i>	HC03INC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
35	<i>Candida albicans</i>	HC04INC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
36	<i>Candida albicans</i>	HC05INC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
37	<i>Candida albicans</i>	HC06INC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
38	<i>Candida albicans</i>	HC07INC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
39	<i>Candida albicans</i>	HC08INC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	
40	<i>Candida albicans</i>	HC09INC	Conteúdo vulvovaginal	Brasil	1608930	

TABELA 2: ISOLADOS REFERÊNCIA.

	Nome	Número de referência	Substrato	Origem geográfica	Genbank/acesso	
					ITS	D1/D2
1	<i>Candida albicans</i>	CBS 562	Isolado clínico	Austrália	EF567995	U45776
2	<i>Candida dubliniensis</i>	CBS 7987	Isolado clínico	Japão	AB035589	U57685
3	<i>Candida inconspícua</i>	CBS 180	Isolado clínico	Austrália	AJ853766	U71062
4	<i>Candida intermedia</i>	CBS 572	Isolado clínico	Austrália	EF568011	U44809
5	<i>Candida glabrata</i>	CBS 138	-	Irlanda	AY198398	U44808
6	<i>Candida haemulonii</i>	CBS 5149	-	Espanha	JX459660	U44812
7	<i>Candida tropicalis</i>	CBS 94	Isolado clínico	Japão	AB437068	U45749
8	<i>Clavispora lusitaniae</i>	CBS 6986	Urina	Bulgária	EF568049	U44817
9	<i>Debaryomyces carsonii</i>	CBS 2285	Isolado clínico	EUA	AJ853767	U45743
10	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	CBS 712	Isolado clínico	Austrália	EF568057	U94924
11	<i>Kluyveromyces lactis</i>	CECT1961	Ambiente	EUA	AJ401704	U94922
12	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CBS 2030	Isolado clínico	Austrália	EF568003	U45709
13	<i>Pichia fermentans</i>	L1B	Isolado ambientais	Reino Unido	FJ713081	U75726
14	<i>Pichia membranifaciens</i>	23	-	Espanha	JQ410476	AJ508586
15	<i>Pichia segobiensis</i>	CECT 10-210	-	Espanha	DQ40916	U45742
16	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	CBS 1146	Isolado clínico	Austrália	EF568083	AJ508558
17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NRRL Y-12632	-	EUA	AM90040	AY048154
18	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NRRL Y-12796	-	EUA	AY 251633	U40085

- dado não informado.

4.3 Coleta, isolamento e identificação fenotípica

A coleta foi realizada através de swabs, cada amostra foi semeada em meio Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a $\pm 30^{\circ}\text{C}$ por um período de 48 à 120 horas de acordo com o desenvolvimento de cada isolado. Características macro e micromorfológicas foram utilizadas para a identificação inicial. Colônias com morfologia característica de leveduras foram submetidas à coloração com Lactofenol (New Prov®) e observadas em microscópio óptico (Nikon/YS2-T) (ANILA *et al.*, 2011). Uma colônia de cada placa foi repicada em tubos contendo Ágar Batata Dextrose (LACAZ *et al.*, 2002). Os isolados foram mantidos em Ágar Batata Dextrose e em tubos do tipo *ependorfs* contendo *Skin Milk* (ANVISA, 2006) em triplicata mantidos a -20°C .

A identificação presuntiva dos isolados foi realizada em CHROMagar à 37°C por 48 horas. Os resultados foram baseados na alteração de coloração do meio, de acordo com o padrão estabelecido pelo fabricante para a diferenciação das espécies albicans e não-albicans (ECKERT *et al.*, 2013). Alguns isolados foram identificados pelo sistema API 20 aux (Biomerieux, França) e após a incubação à 37°C durante 48 horas foi realizada a leitura através da turbidez dos poços frente a um padrão (API 20 aux, Biomerieux).

4.4 Caracterização molecular dos isolados de *Candida* spp.

Para a extração de DNA foi utilizado a metodologia descrita por Vicente *et al.*, (2008) utilizando maceração física com sílica:celite (2:1) em CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) e CIA (solução ácida de clorofórmio álcool isoamílico) para extração. Após a precipitação o DNA foi quantificado através do NanoDrop 1000 (Spectrophotometer Thermo Scientific), seguida da quantificação em gel.

Para a ribotipagem, os fragmentos de DNA foram amplificados com os pares de oligonucleotídeos iniciadores V9G (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') e LS266 (5'-GCATTCCCAAACAACACTCGACTC-3') (GERRITS VAN DEN ENDE E DE HOOG 1999), e a amplificação de fragmentos do domínio variável de D1/D2 26s iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'Donnell,1993) utilizado as condições de reações baseadas em VICENTE (2008) consistindo de um ciclo de 94°C por 2 minutos, trinta ciclos 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e para finalizar um ciclo 72 °C por 3 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, utilizando o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (1000pb *Ludwing Biotec*). Na reação de sequenciamento, foram utilizados os "primers" ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3-') (WHITE *et al.*, 1990), NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'Donnell,1993). O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI3130. Para a genotipagem ABC, foi utilizado os seguintes iniciadores: CAIN-L (5'—

ATAAGGGAAGTCGGCAAATAGATCCGTAA3') e CAINT-R (5'-CCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATAGAT3 ') (MCCULLOUGH *et al.* 1999).

4.5 Alinhamento e construção filogenética

A edição das sequências obtidas foi realizada com o auxílio do programa Staden versão 1.6 (BONFIELD *et al.*, 2002). As sequências foram comparadas com sequências de isolados referência depositadas no banco de dados (NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) para a detecção de similaridade entre as sequências. Para o alinhamento foi utilizado o programa Mafft (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) realizando inspeção visual pelo programa MEGA versão 5.1 (TAMURA *et al.*, 2011). Para a análise filogenética foram utilizadas sequências de 40 isolados do gênero *Candida*, utilizando como grupo externo *Schizosaccharomyces pombe* baseado em Kang *et al.*, 2003. A árvore filogenética de Maximum Likelihood foi construída com 100 bootstrap, usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros com o programa MEGA versão 5.1 para edição final (TAMURA *et al.*, 2011).

4.6 Testes de suscetibilidade *in vitro*

Os testes de suscetibilidade *in vitro* foram realizados de acordo com a norma M27-A3 pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), pelo método da microdiluição em caldo. Os antifúngicos testados foram anfotericina B (Sigma-Aldrich 110 Quimica, Madrid, Spain), cetoconazol (Pharma Nostra, Brasil), itraconazol (Fragon), fluconazol (Pfizer, Madrid, Spain) e nistatina (Pharma Nostra, Brasil). As amostras foram diluídas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) 1640 (Sigma) e incubada a 37°C por 48 horas. Segundo os critérios do CLSI o perfil de sensibilidade da espécie ao antifúngico deve ser classificado como sensível, sensibilidade dose dependente e resistente (TABELA 3).

TABELA 3: CRITÉRIOS DE LEITURA PARA OS VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PARA OS ANTIFÚNGICOS FLUCONAZOL, NISTATINA E ITRACONAZOL E ANFOTERICINA B.

Perfil de suscetibilidade				
Droga	Fluconazol	Nistatina	Itraconazol	Anfotericina B
Sensível (S)	< 8ug/mL	< 4ug/mL	≥ 0,125ug/mL	< 1ug/mL
Sensibilidade Dose-dependente (SDD)	16-32ug/mL	8-32ug/mL	0.25-0,5ug/mL	-
Resistente (R)	≥ 64ug/mL	≥ 64ug/mL	≥ 1ug/mL	>1ug/mL

FONTE: o autor (2013)

5. Resultados

Das 133 amostras de conteúdo cérvico vaginal analisados foram obtidos 39 isolados de diferentes espécies do gênero *Candida* e um isolado de *Saccharomyces cerevisiae* identificados pelo CHROMagar, sistema API 20 e por meio do sequenciamento das regiões ITS e D1/D2 do rDNA (TABELA 1). Destes, vinte eram procedentes de amostras do grupo colonizado, onze do grupo com infecção complicada e nove de infecção não complicada. Através do CRHOMagar e sistema API 20 aux (Biomerieux) identificou-se trinta e três isolados de *Candida albicans*, cinco *C. glabrata*, um *C. guilliermondii* e um *C. kefyr*.

A identificação dos isolados foi confirmada através de uma análise multilocus de máxima verossimilhança usando o melhor modelo evolutivo para o conjunto de dados (Kimura 2 parâmetros, distribuição gama) com 100 *bootstrap*. Um total de 1959 sítios foram avaliados, destes, 786 pertenciam a sítios conservados, 1092 sítios variáveis, 712 sítios parcimoniosos informativos (Pi) e 361 sítios únicos, a frequência das bases foram pi (A): 0.225836, pi(C): 0.283009, pi(G): 0.238533, pi(T): 0.252622.

A árvore filogenética foi gerada utilizando dezoito linhagens referências, incluindo as linhagens tipo de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. haemulonii*, *C. intermedia*, *C. lusitanae*, *C. inconspicua*, *C. glabrata*, *D. carsonii*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *Pichia segobiensis*, *P. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *P. fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspota delbrueckii*. A linhagem *Schizosaccharomyces pombe* foi utilizada como *outgroup*. Os isolados de CVV avaliados agruparam-se em seis diferentes clados suportados com valores de *bootstrap* (FIGURA 1) e foram identificados como pertencentes às espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *Saccaromyces cerevisiae* e *C. glabrata*.

Os dados filogenéticos corroboram com os dados bioquímicos do sistema API 20aux, exceto para o isolado HC03IC identificado como *C. albicans* no sistema API 20aux e na análise filogenética como *C. dubliniensis* (FIGURA 1).

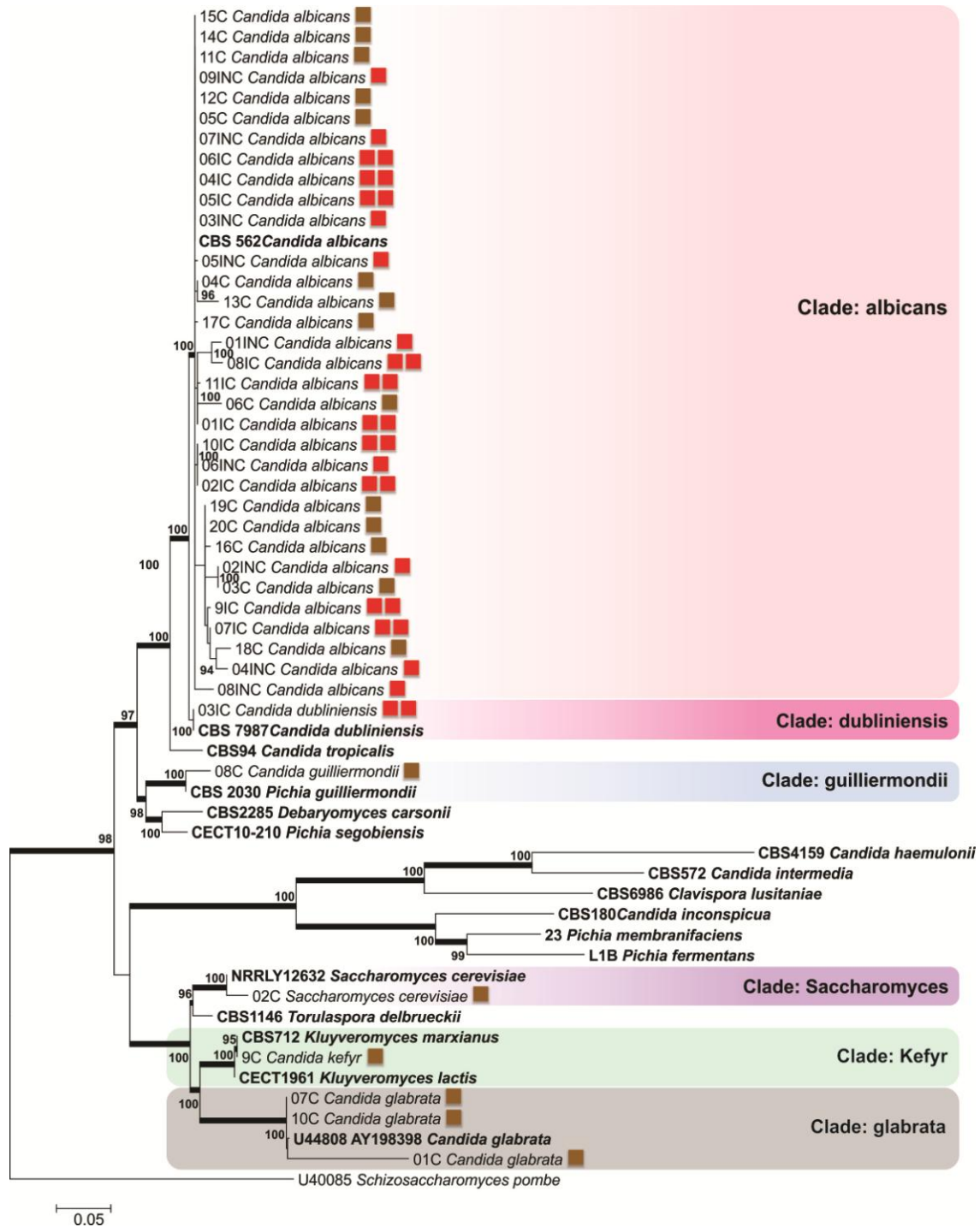


FIGURA 1: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE MAXIMUM LIKELIHOOD BASEADA NO ALINHAMENTO DA REGIÃO COMPLETA DE ITS1/ITS2 E D1/ D2 CONSTRUÍDA COM 100 BOOTSTRAP, USANDO O MODELO EVOLUTIVO KIMURA 2 PARÂMETROS COM PROGRAMA MEGA VERSÃO 5.1. SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE FOI UTILIZADO COMO GRUPO EXTERNO. A ÁRVORE MOSTROU 06 CLADOS (ALBICANS; DUBLINIENSIS; GUILLIERMONDII; SACCHAROMYCES; KEFYR; GLABRATA) DIFERENCIADOS DE ACORDO COM AS ESPÉCIES ISOLADAS. PARA MELHOR ENTENDIMENTO OS GRUPOS AVALIADOS NESTE ESTUDO FORAM REPRESENTADOS POR QUADRADOS COLORIDOS PARA A DIFERENCIAÇÃO: QUADRADO MARROM REFERE-SE A ISOLADOS DO GRUPO COLONIZADO; UM (01) QUADRADO VERMELHO ISOLADOS DO GRUPO COM INFECÇÃO NÃO COMPLICADA E DOIS (02) QUADRADOS VERMELHOS ISOLADOS DO GRUPO COM INFECÇÃO COMPLICADA.

FONTE: o autor (2013)

A maioria dos isolados clínicos avaliados pertencem à espécie *C. albicans*. Um total de trinta e três (33) dos 40 isolados agruparam-se no clado *albicans* (bs, 100%) juntamente com a linhagem tipo de *C. albicans* (NRRL Y-12983). A partir da análise não foi possível separar as espécies de *C. albicans* quanto aos grupos estudados: colonizado, infecção complicada e infecção não complicada.

Ainda de acordo com a figura 1, o clado *guilliermondii* (*bootstrap*, 99%) consiste de um isolado clínico (HC08C) e a linhagem tipo de *P. guilliermondii* (NRRL Y-2075). O isolado (HC02C) do grupo colonizado e a linhagem tipo de *Saccharomyces cerevisiae* agruparam-se no clado *Saccharomyces* (bs, 100%). O clado *kefyr* é formado por um isolado de *Kluyveromyces marxianus* (NRRL Y-8281) teleomórfo de *Candida kefyr*, um isolado de *Kluyveromyces marxianus* var *Kluyveromyces lactis* (NRRL Y- 8279) e o isolado HC09C. No clado *glabrata* foram agrupados três isolados (HC01C, HC07C e HC10C) pertencentes ao grupo colonizado e a linhagem tipo de *C. glabrata* (5478) com *bootstrap* de 100%.

A partir da identificação molecular realizada, verificou-se que entre as 40 amostras estudadas *C. albicans* foi a espécie de maior prevalência (82,5%), seguida por *C. glabrata* (7,5%), *C. guilliermondii* (2,5%), *C. kefyr* (2,5%), *C. dubliniensis* (2,5%) e *Saccharomyces cerevisiae* (2,5%). Considerando os grupos estudados separadamente, verificou-se no grupo colonizado um total de vinte isolados pertencentes a cinco espécies diferentes, *C. albicans* (60%), *C. glabrata* (25%), *C. guilliermondii* (5%), *C. kefyr* (5%) e *Saccharomyces cerevisiae* (5%). Nas amostras procedente do grupo infecção não complicada, foram obtidos nove isolados, todos pertencentes à espécie *C. albicans* (100%). Nas amostras de infecção complicada, foram obtidos onze isolados de duas espécies diferentes, *C. dubliniensis* (9,1%) e *C. albicans* (90,9%). Quanto à genotipagem ABC de *C. albicans* foi observado pelo menos dois genótipos diferentes (A e B), sendo que vinte e cinco isolados pertencem ao tipo A e sete isolados ao tipo B e não foi possível estabelecer uma correlação entre os genótipos encontrados e o perfil de suscetibilidade aos fármacos testados (FIGURA 2).

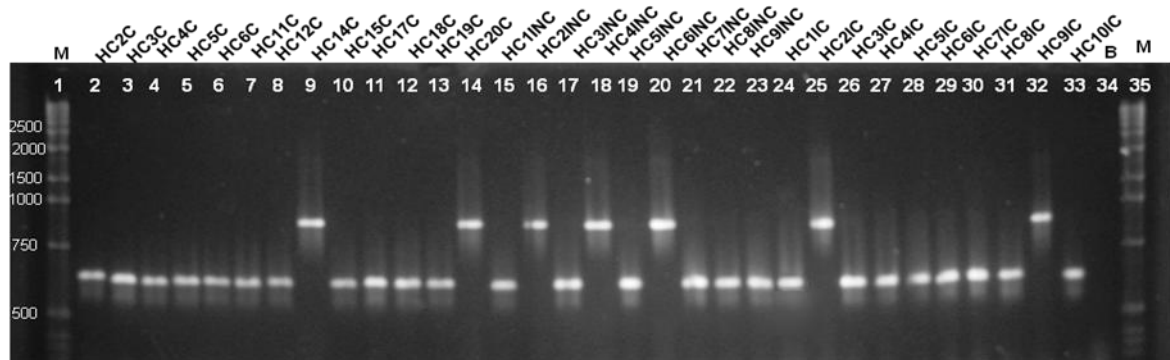


FIGURA 2: GEL ABC GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS DE *C. ALBICANS* DOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS. DAS AMOSTRAS 2 A 14 SÃO ISOLADOS PROVENIENTES DO GRUPO COLONIZADO; 15 A 23 AO GRUPO COM INFECÇÃO NÃO COMPLICADA E 24 A 33 GRUPO COM INFECÇÃO COMPLICADA; O POÇO 34 CORRESPONDE AO CONTROLE; 1 E 35 CORRESPONDEM AO MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1KB.

FONTE: o autor (2013)

Os resultados dos testes de suscetibilidade dos diferentes grupos estudados para cada espécie isolada estão sumarizados (TABELA 4). No grupo colonizado (grupo 1) os quatorze isolados de *C. albicans* apresentaram sensibilidade dose-dependente (SDD) para a nistatina (8ug/mL), e sensibilidade (S) para o itraconazol (0,0625ug/mL), fluconazol (0,125ug/mL), anfotericina B (0,03-1,0ug/mL) e cetoconazol (0,0625ug/mL). Os três isolados de *C. glabrata* (HC01C, HC02C e HC07C) foram resistentes (R) ao itraconazol (4ug/mL), SDD para o fluconazol (4-16ug/mL) e nistatina (8ug/mL) e S para anfotericina B (0,03-1,0ug/mL) e cetoconazol (1-4ug/mL). O isolado de *C. guilliermondii* (HC16C) apresentou SDD para a nistatina (8ug/mL), resistência para a anfotericina B (2ug/mL) sensibilidade para itraconazol (0,0625ug/mL), fluconazol (0,125ug/mL) e cetoconazol (0,0625ug/mL). O isolado *C. kefyr* (HC09C) apresentou SDD para itraconazol (0,25) e para a nistatina (4ug/mL), e S para o fluconazol (0,25ug/mL), anfotericina B (1ug/mL) e cetoconazol (0,0625ug/mL). Para o isolado de *S. cerevisiae* (HC02C) foi SDD para a nistatina (8ug/mL) e S para itraconazol (0,0625ug/mL), fluconazol (0,125ug/mL), anfotericina B (0,03-1,0ug/mL) e cetoconazol (0,0625ug/mL).

Para o grupo com infecção complicada (grupo 2) um isolado de *C. albicans* (HC011C) foi SDD para itraconazol (0,0625- 0,25ug/mL), todos os isolados (10) foram R para a nistatina (\geq 64ug/mL) e S para fluconazol (0,125-2,0ug/mL), anfotericina B (1ug/mL) e cetoconazol (0,625ug/mL). O isolado de *C. dubliniensis* (HC031C) R para a nistatina (\geq 64ug/mL) e S para o itraconazol (0,625ug/mL),

fluconazol (0,125-2ug/mL), anfotericina B (0,5-1ug/mL) e cetoconazol (0,625ug/mL). No grupo com infecção não complicada (grupo 3) os nove isolados de *C. albicans* foram SDD para nistatina (8ug/mL) e S para o itraconazol (0,625ug/mL), fluconazol (0,125-2ug/mL), anfotericina B (0,5-1ug/mL) e cetoconazol (0,625ug/mL).

TABELA 4: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC), PARA OS GRUPOS ESTUDADOS FRENTE AOS ANTIFÚNGICOS.

Espécies isoladas	Total de amostras	Itraconazol	Fluconazol	Nistatina	Anfotericina B	Cetoconazol
<i>C. albicans</i> (grupo 1)	14	0,0625-0,0625	0,125-0,125	8,0-8,0 (SDD=14)	0,03-1,0	0,0625-0,0625
<i>C. albicans</i> (grupo 2)	10	0,0625-0,25 (SDD= 1)	0,125-2,0	≥ 64 (R=10)	0,5- 1,0	0,0625-0,25
<i>C. albicans</i> (grupo 3)	09	0,125-0,125	0,125-0,125	8,0-8,0 (SDD=9)	1,0-1,0	0,0625-0,0625
<i>C. glabrata</i> (grupo 1)	03	2,0- 4,0 (R= 3)	4,0-16,0 (SDD= 1)	8,0-8,0 (SDD=3)	0,03-1,0	1,0-4,0
<i>C. guilhermondi</i> (grupo 1)	01	0,0625-0,0625	0,125-8,0	8,0 (SDD=1)	0,25-2,0 (R=1)	0,0625-2,5
<i>C. Kefyr</i> (grupo 1)	01	0,25 (SDD=1)	0,25	4,0 (SDD=1)	1,0	0,0625
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (grupo 1)	01	0,0625-0,0625	0,125-0,125	8,0-8,0 (SDD=1)	0,03-1,0	0,0625-0,0625
<i>C. dubliniensis</i> (grupo 2)	01	0,0625-0,0625	0,125-2,0	≥ 64 (R=1)	0,5- 1,0	0,0625-0,25

LEGENDA: SDD: SENSIBILIDADE DOSE-DEPENDENTE; R: RESISTENTE; S: SENSÍVEL/ GRUPO 1: COLONIZADO; GRUPO 2: COM INFECÇÃO COMPLICADA; GRUPO 3: COM INFECÇÃO NÃO-COMPLICADA.

FONTE: o autor (2013)

6. Discussão

Candida spp. são importantes patógenos oportunistas, a identificação dos agentes causais da CVV é importante para esclarecer a distribuição de *C. albicans* e não-*albicans* nas populações, além de proporcionar o tratamento adequado baseado no perfil de sensibilidade da espécie em questão (ASTICCIOLI *et al.*, 2009). Nesse trabalho foi avaliado isolados de leveduras procedentes de pacientes com ausência de sintomas clínicos de vaginite e de portadores da infecção os quais foram caracterizados através de marcadores fenotípicos, moleculares, e quanto à sensibilidade *in vitro* a antifúngicos.

De um total de 133 amostras analisadas, 39 (97,5%) apresentaram leveduras do gênero *Candida* e em uma amostra (2,5%) foi obtido 01 isolado de *Saccharomyces cerevisiae*. Em um estudo realizado por Spinillo *et al.*, na Itália em 1999, mostrou que a prevalência de vulvovaginite por *Candida* sp. foi de 34,1%. No Brasil, os dados epidemiológicos são escassos, mas em um estudo transversal realizado em 1996, no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, foi relatada a prevalência de CVV de 25%, por meio de estudos baseados em macro e micro morfologia (ROSA e RUMEL, 2004). Um trabalho realizado por Consolaro *et al.* (2004) em mulheres de Maringá no Estado do Paraná a taxa de isolamento de leveduras do gênero *Candida* foi de 21,7%. Em outro estudo realizado em Paiçandu no estado do Paraná, a prevalência de isolamento de *Candida* spp. foi de 12,2%, estes dados de frequência reforçam a importância destes estudos para estabelecer a distribuição geográfica e das espécies nos casos de CVV (MARTINS *et al.*, 2012). Além das diferenças geográficas, Paulitsch *et al.*, 2006 e Wei, Feng, Luo, 2010 relataram que diferenças culturais e étnicas também podem influenciar na taxa de isolamento de leveduras vaginais.

Nas amostras avaliadas neste estudo, a espécie de maior prevalência foi a *C. albicans* (82,5%), seguida por *C. glabrata* (7,5%), *C. guilliermondii* (2,5%), *C. kefyr* (2,5%), *C. dubliniensis* (2,5%) e *Saccharomyces cerevisiae* (2,5%). Embora nos últimos anos um aumento de infecções ocasionadas por *Candida* não-*albicans* venha sendo registrado (LINHARES *et al.*, 2001; TAVERNA *et al.*, 2013), a *C. albicans* é a espécie isolada com maior frequência nos casos de CVV (CHONG *et al.*,

2007; ACHKAR e FRIES, 2010; GUZEL *et al.*, 2011; MOREIRA, 2012).

Considerando os grupos estudados neste trabalho a partir do grupo colonizado, obteve-se um total de 20 isolados, sendo *C. albicans* (60%), *C. glabrata* (25%), *C. guilliermondii* (5%), *C. kefir* (5%) e *Saccharomyces cerevisiae* (5%). Nas amostras procedentes do grupo infecção não complicada obteve-se 09 isolados, sendo todos os isolados de *C. albicans* (100%). Nas amostras de infecção complicada, obteve-se 11 isolados, dos quais *C. dubliniensis* (9,1%) e *C. albicans* (90,9%). O grupo colonizado apresentou maior diversidade de espécies e estas espécies encontradas são relatadas na literatura como patogênicas causadoras de CVV. Moreira (2012) relatou que entre os isolados do grupo colonizado as espécies mais frequentes foram a *C. albicans* e *C. glabrata*. Mahmoudi Rad *et al.* (2010) relatou a ocorrência de diferentes espécies no grupo com infecção complicada como *C. tropicalis* (7,2%), *C. glabrata* (8,4%), *C. krusei* (4,8%) e *C. parapsilosis* (1,2%). Guzel *et al.* em 2011 isolaram *C. glabrata* e *C. kefir* em amostras de CVV e CVVR (Candidíase Vulvovaginal Recorrente). Dessa forma, a microbiota encontrada nas mulheres colonizadas avaliadas neste estudo é composta por espécies, comumente relatadas como agentes causais de CVV (Sobel, 2007).

No grupo colonizado foi identificado um isolado de *Saccharomyces cerevisiae* (HC02C). De acordo com Echeverría-Irigoyen *et al.* (2011) vaginite causada por *S. cerevisiae* é rara. Pádua, Guilhermetti e Svidzinski (2003), isolaram *S. cerevisiae* de uma paciente assintomática corroborando com os dados encontrados neste trabalho.

A maioria dos isolados clínicos avaliados pertencem a espécie *C. albicans*, 33 dos 40 agruparam-se no clado *albicans* (bs, 100%) juntamente com a linhagem *type* de *C. albicans* (NRRL Y-12983), os isolados clínicos não formaram um único grupo monofilético e ficaram distribuídos por toda a árvore estes resultados assemelham-se com os encontrados por Fr'ealle *et al.*, (2006); Clement *et al.*, (2008) e Diezmann *et al.*, (2004) (FIGURA 1).

O isolado HC03IC foi identificado como *C. albicans* pelo sistema API 20aux, nas análises filogenéticas o mesmo isolado foi identificado como *C. dubliniensis*. A falta de concordância entre a identificação fenotípica e molecular da amostra pode ser justificado pelas limitações dos sistemas de identificação comerciais utilizados em laboratórios clínicos, que não permitem a identificação de leveduras que apresentam pequena diferença fenotípica (FLOREZ *et al.*, 2005; VIJGEN *et al.*,

2011). Clement *et al.* (2008) realizou uma análise multigênica em espécies clínicas relevantes de *Candida* spp. e concluiu que a utilização de análise em multilocus aumenta os valores de confiança na análise filogenética, bem como, a subdivisão de clados filogeneticamente heterogêneos. Dessa forma, sugere-se a utilização de dados moleculares em estudos epidemiológicos de CVV.

Através do sistema ABC de genotipagem foi possível observar dois genótipos diferentes para *C. albicans* (A e B), com vinte e cinco isolados do genótipo A e sete isolados do genótipo B. Não foi possível estabelecer uma correlação entre os dois genótipos de isolados de *C. albicans* e o perfil de suscetibilidade, pois verificou-se isolados de ambos os genótipos sensíveis e resistentes aos fármacos testados. O ABC genotipagem contém quatro genótipos A (*C. albicans*- 450pb), B (*C. albicans*- 840pb), C (*C. stellatoidea* - 840pb) e D (*C. dubliniensis*- 1080pb), desenvolvida com base na presença ou ausência de uma inserção no DNA que codifica o gene do RNA ribossomal 26S (MCCULLOUGH, CLEMONS e STEVENS, 1999). Chaves, Santos e Colombo (2012) realizaram um estudo analisando a persistência de um único genótipo de *C. albicans* em pacientes criticamente enfermos, e se este poderia prever informações sobre a transição do comensalismo a infecção, foi possível concluir que pacientes que apresentaram genótipo do tipo B progrediram para a infecção invasiva. No trabalho realizado por Mccullough, Clemons e Stevens (1999) o genótipo B foi menos suscetível a flucitosina, indicando uma correlação entre os grupos de *Candida* e susceptibilidade antifúngica. No nosso estudo foi possível observar que os isolados com genótipo A e B apresentaram sensibilidade dose-dependente (SDD) e resistência (R) para a nistatina.

No grupo colonizado os quatorze isolados de *C. albicans* apresentaram sensibilidade dose-dependente (SDD) para a nistatina (8ug/mL), e sensibilidade (S) para o itraconazol (0,0625ug/mL), fluconazol (0,125ug/mL), anfotericina B (0,03-1,0ug/mL) e cetoconazol (0,0625ug/mL). Ferraza *et al.* (2005) observou em seu estudo que os isolados de *C. albicans* apresentaram altos índices de suscetibilidade ao fluconazol e anfotericina B, porém 51,1% destas leveduras apresentaram SDD para nistatina, corroborando com os dados encontrados neste trabalho. Resultados semelhantes também foram encontrados por Lattif (2011) onde todos os isolados de *C. albicans* obtidos do grupo controle foram sensíveis ao fluconazol. Os isolados de *C. glabrata* (HC01C, HC02C e HC07C) foram resistentes (R) ao itraconazol

(4ug/mL), SDD para o fluconazol (4-16ug/mL) e nistatina (8ug/mL) e S para anfotericina B (0,03-1,0ug/mL) e cetoconazol (1-4ug/mL). Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram encontrados no estudo de Oliveira *et al.* (2011), um isolado de *C. glabrata* foi resistente ao fluconazol e outros dois isolados apresentaram sensibilidade dose-dependente.

O isolado de *C. guilliermondii* (HC16C) apresentou SDD para a nistatina (8ug/mL), resistência para a anfotericina B (2ug/mL) sensibilidade para itraconazol (0,0625ug/mL), fluconazol (0,125ug/mL) e cetoconazol (0,0625ug/mL). A literatura tem apontado que as infecções ocasionadas por *C. guilliermondii* não são frequentes e que o tratamento vem apresentando problemas devido à diminuição de sensibilidade para algumas classes de antifúngicos, principalmente para o fluconazol, itraconazol e anfotericina B (BARBEDO e SGARBI, 2010). O isolado *C. kefyr* (HC09C) foi SDD para itraconazol (0,25) e para a nistatina (4ug/mL), e S para o fluconazol (0,25ug/mL), anfotericina B (1ug/mL) e cetoconazol (0,0625ug/mL). O isolado de *S. cerevisiae* (HC02C) foi SDD para a nistatina (8ug/mL) e S para itraconazol (0,0625ug/mL), fluconazol (0,125ug/mL), anfotericina B (0,03-1,0ug/mL) e cetoconazol (0,0625ug/mL). No estudo realizado por Papaemmanouil *et al.* (2011) os isolados de *S. cerevisiae* foram resistentes ao fluconazol, posaconazol e itraconazol. Estes dados diferem dos encontrados neste trabalho onde o isolado de *S. cerevisiae* foi sensível à maioria dos antifúngicos testados (itraconazol, fluconazol, anfotericina B e cetoconazol) apresentando apenas sensibilidade dose-dependente a nistatina.

Para o grupo com infecção complicada (grupo 2) um isolado de *C. albicans* (HC01IC) foi SDD para itraconazol (0,0625- 0,25ug/mL), todos os isolados (10) foram R para a nistatina (\geq 64ug/mL) e S para fluconazol (0,125-2,0ug/mL), anfotericina B (1ug/mL) e cetoconazol (0,625ug/mL). No estudo de Ferraza *et al.* (2005) a *C. albicans* mostrou maior tendência de resistência à nistatina (52,8%) do que as espécies não-*albicans* (44,4%) este dado é similar ao encontrado em nosso estudo. O isolado de *C. dubliniensis* (HC03IC) foi R para a nistatina (\geq 64ug/mL) e S para o itraconazol (0,625ug/mL), fluconazol (0,125-2ug/mL), anfotericina B (0,5-1ug/mL) e cetoconazol (0,625ug/mL). No grupo com infecção não complicada (grupo 3) os nove isolados de *C. albicans* foram SDD para nistatina (8ug/mL) e S para o itraconazol (0,625ug/mL), fluconazol (0,125-2ug/mL), anfotericina B (0,5-1ug/mL) e cetoconazol (0,625ug/mL). Resultados semelhantes foram obtidos Lopes-Consolaro

et al. 2005, relatando a ausência de resistência de espécies do gênero *Candida* procedentes de conteúdo vaginal e alta frequência de isolados SDD para nistatina e sensível aos outros fármacos testados também Camargo *et al.* (2011) observaram isolados sensíveis ao fluconazol, e ao itraconazol (94%), dos quais 6% apresentaram sensibilidade dose-dependente à nistatina.

Em relação ao perfil de sensibilidade observado para este estudo é importante ressaltar no grupo colonizado onde se observou uma diversidade maior de espécies obteve-se isolados com um perfil variado quanto à sensibilidade aos antifúngicos testados. Os isolados (03) de *C. glabrata* apresentaram resistência ao itraconazol, enquanto o isolado (1) de *C. guilliermondii* foi SDD para nistatina e resistente para a anfotericina B e sensível ao itraconazol e o isolado (1) *C. kefyr* apresentou SDD para itraconazol e nistatina (TABELA 4). Dentro do grupo de pacientes com manifestação clínica da doença todos os isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* do grupo infecção complicada foram resistentes a nistatina enquanto que os isolados de *C. albicans* procedentes do grupo com infecção não complicada apresentaram sensibilidade dose dependente ao mesmo fármaco. Também, observou-se que estes isolados eram sensíveis ao itraconazol e fluconazol, drogas normalmente utilizadas no tratamento das vulvovaginites causadas por leveduras do gênero *Candida*. Tais resultados indicam que o perfil de sensibilidade aos antifúngicos para os isolados neste estudo podem não ser o fator relacionado às recidivas da doença.

De acordo com a literatura, existe uma diversidade de fatores que pode influenciar na resposta clínica ao tratamento, uma vez que diversos estudos relatam diferenças entre suscetibilidade *in vitro* e resposta *in vivo* ao fármaco (FERREIRA *et al.*, 2005; PFALLER *et al.*, 2006; PFALLER E DIEKEMA, 2007). Sendo assim, estudos de sensibilidade *in vitro* associados à identificação precisa do isolado, podem nortear condutas de tratamento e inferir a respeito da epidemiologia das CVV.

7. Conclusões

O Cromoagar utilizado como teste presuntivo juntamente com o API 20aux demonstraram ser excelentes marcadores fenotípicos na identificação de leveduras do gênero *Candida* demonstrando serem eficazes no diagnóstico.

Candida albicans foi à espécie isolada com maior frequência seguida de *C. glabrata*. Os dados filogenéticos corroboram com os dados bioquímicos do sistema API 20aux, exceto para o isolado HC031C identificado como *C. albicans* no sistema API 20aux e na análise filogenética o mesmo isolado foi identificado como *C. dubliniensis*. A partir da análise não foi possível separar as espécies de *C. albicans* quanto aos grupos estudados: colonizado, infecção complicada e infecção não complicada. O grupo colonizado apresentou maior diversidade de espécies e estas espécies encontradas são relatadas na literatura como patogênicas causadoras de CVV.

Através do ABC genotipagem foi possível observar dois genótipos diferentes para *C. albicans* A e B, e não foi possível estabelecer uma correlação entre a variabilidade dos dois genótipos e o perfil de suscetibilidade aos fármacos testados.

Através dos testes de suscetibilidade *in vitro* foi possível observar que houve resistência a nistatina, itraconazol e anfotericina B. O cetoconazol foi sensível a todos os isolados, mas devido à facilidade de aceitação ao tratamento o fluconazol continua sendo a droga de eleição para o tratamento de CVV.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, J.M.; FRIES, B. C. *Candida* Infections of the Genitourinary Tract. **Clinical Microbiology Reviews**. p. 253–273, 2010.
- AKINS, R. A. Uma atualizações sobre alvos antifúngicos e mecanismos de resistência em *Candida albicans*. **Med. Mycol.** v. 43, p. 285-318, 2005.
- ALARCO, A.M. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**. v. 181, p. 700–708, 1999.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHAHG, J.; ZHAHG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. Nucleic Acids Research, Oxford, Vol.25, p. 3389- 402, 1997.
- ANDERSON, J.B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. **Nat Rev Microbiol.** v. 3, p. 547-56, 2005.
- ANILA, K.; HALLIKERI, K.; SHUBHADA, C.; NAIKMASUR, V. G.; KULKARNI, R. D. Comparative study of *Candida* in oral submucous fibrosis and healthy individuals / Estudo comparativo de *Candida* em fibrose submucosa oral e indivíduos saudáveis. **Revista Odonto e Ciência**, v. 26, n. 1, p. 71-76, 2011.
- ANVISA. Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a antimicrobianos. n.37, Março 2006: Acesso em Janeiro de 2013 http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/manuais/manual_testes_antimicrobianos.pdf
- API 20 C AUX. França, bioMérieux® SA, 2007. Bula kit comercializado.
- 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 e convencionais e pelo método cromógeno Chromagar *Candida*. **Revista de Patologia Tropical**. v. 34, p. 37-42, 2005.
- ASTICCIOLI, S.; SACCO, L.; DATURI, R.; MATTI, C.; NUCLEO, E.; ZARA, F.; PAGANI, L. Trends in frequency and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of *Candida* isolates from women attending the STD outpatients clinic of a tertiary care hospital in Northern Italy during the years 2002-2007. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 31, 2009.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidiasis. **DST - J bras Doenças Sex Transm.** v. 22, p. 22-38, 2010.

BAROUSSE, M. M.; STEELE, C.; DUNLAP, K.; ESPINOSA, T.; BOIKOV, D.; SOBEL, J. D.; FIDEL, P. L. JR. Growth inhibition of *Candida albicans* by human vaginal epithelial cells. **J Infect Dis.** v. 184, p. 1489-93, 2001.

BARRENETXEA, Z. G. Vulvovaginitis candidiásica. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 19, p. 22-24, 2002.

BARTELLI, T. F.; FERREIRA, R. C.; COLOMBO, A. L.; BRIONES, M. R. S. Intraspecific comparative genomics of *Candida albicans* mitochondria reveals non-coding regions under neutral evolution. **Infection, Genetics and Evolution.** v. 14, p. 302–312, 2013.

BERARDINELLI, S.; OPHEIM, D.J. New germ tube induction medium for the identification of *Candida albicans*. **J Clin Microbiol.** v. 22. P. 861-862, 1985.

BOATTO, H. F.; MORAES, M. da S.; MACHADO, A. P.; GIRAO, M. J. B. C.; FISCHMAN, O. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 2, p. 80-84, 2007.

BOLOURI, F. N. M.; TABRIZ, F.D.; TANHA *et al.* Effectiveness of Fluconazole for suppressive maintenance therapy in patients with RVVC: a Randomized Placebo-Controlled Study. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research.** v. 8, p. 307–313, 2009.

BONFIELD, J.; BEAL, K.; JORDAN, M.; CHEN, Y.; STADEN, R. The Staden Package Manual. Editora: Copyright, 2002.

BRAUTASET, T.; SLETTA, H.; DEGNES, K. F.; SEKUROVA, O. N.; BAKKE, I.; VOLOKHAN, O.; ANDREASSEN T.; ELLINGSEN, T. E.; ZOTCHEV, S. B. New nystatin-related antifungal polyene macrolides with altered polyol region generated via biosynthetic engineering of *Streptomyces noursei*. **Appl Environ Microbiol.** v. 18, p. 6636-6643, 2011.

CAMARGO, G. S.; PEREIRA, D. C.; VAZ, C. B.; FARIA, A. G.; FOGAÇA, R.; FUENTEFRIA, A. M.; Avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos de *Candida* vulvovaginal e oral. **Rev. HCPA**, v. 31, 2011.

CARVALHO, N. S.; BARACAT, E. C.; NAUD, P. S. V.; GIRALDO, P. C.; SIMÕES, J. A.; DUARTE, G.; LINHARES, I. M. Estudo multicêntrico comparativo entre fluconazol e itraconazol no tratamento da candidíase vulvovaginal. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 59, n. 4, p. 244-249, 2002.

CASSONE, A.; BERNARDIS, F.; SANTONI, G. Anti*Candidal* immunity and vaginitis: novel opportunities for immune intervention. *Infection and Immunity.* v. 75, p. 4675-4686, 2007.

CAVALCANTI, E. F. A.; MARTINS, H. S. **Clínica médica: dos sinais e sintomas ao diagnóstico e tratamento**. Barueri, SP: Manole, p. 958, 2007.

CHARLIER, C. E.; HART, A.; LEFORT *et al.* Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 384–410, 2006.

CHAU, A. S.; MENDRICK, C. A.; SABATELLI, F.J.; LOEBENBERG, D.; MCNICHOLAS, P.M. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 48, p. 2124-2131, 2004.

CHAVES, G. M.; SANTOS, F. P.; COLOMBO, A. L. The persistence of multifocal colonisation by a single ABC genotype of *Candida albicans* may predict the transition from commensalism to infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 107, p.198-204, 2012.

CHEN, A.; SOBEL, J.D. Emerging azole antifungals. **Expert. Opin. Emerg. Drugs**. v. 10, p. 21-33, 2005.

CHEN, S. C.; HALLIDAY, C. L.; MEYER, W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction- based assays. **Med Mycol**. v. 40, p. 333-357, 2002.

CHEN, Y. C.; EISNER, J. D.; KATTAR, M. M.; RASSOULIAN-BARRETT, S. L.; LAFE, 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 rRNA genes. **J Clin Microbiol**. v. 38, p. 2302-2310, 2000.

CHENG, Y. C.; Lin, Y. H.; Chen, K. W.; Lii, J.; Teng, H. J.; Li, S. Y. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 68, p. 284-292, 2010.

CHIBANA, H.; OKA, N.; NAKAYAMA, H.; AOYAMA, T.; MAGEE, B. B.; MAGEE, P. T.; MIKAMI, Y. Sequence Finishing and Gene Mapping for *Candida albicans* Chromosome 7 and Syntenic Analysis Against the *Saccharomyces cerevisiae* Genome. **Genetics**. v. 170, p. 1525–1537, 2005.

CHONG, P. P.; HADI, S. R. A.; LEE, Y. L.; PHAN, L. C.; TAN, B. C.; NG, K. P.; SEOW, H. F. Genotyping and drug resistance profile of *Candida spp.*. In recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-albicans species with non-pregnant status. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 7, p. 449–456, 2007.

CLEMENT, K. M. T.; HEIDE, M. D.; VINCENT, R.; WIELAND, M. Re-examining the phylogeny of clinically relevant *Candida* species and allied genera based on multigene analyses. **FEMS Yeast Res**. v. 8, p. 651–659, 2008.

CLIFF, P. R.; SANDOE, J. A.; HERITAGE, J.; BARTON, R. C. Use of multilocus sequence typing for the investigation of colonisation by *Candida albicans* in intensive care unit patients. **J Hosp Infect.** v. 69, p. 24-32, 2008.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard . ed. CLSI document M27-A3. v. 28, n. 14, 2008.

COLOMBO, A. L.; GUIMARAES, T.; CAMARGO, L. F. A.; RICHTMANN, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; SALLES, M. J. C.; CUNHA, C. A.; YASUDA, M. A. S.; MORETTI, M. L.; NUCCI, M. *on behalf of the Consenso Brasileiro de Infecções por Candida Group*. Brazilian guidelines for the management of candidiasis: a joint meeting report of three medical societies – Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Braz J Infect Dis.** v. 16, suppl.1, 2012.

COLOMBO, A.L.; GUIMARAES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida spp.*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba. v. 36, p. 599-607, 2003.

CORNET, M.; SENDID, B.; FRADIN, C.; GAILLARDIN, POULAIN, D.; NGUYEN, H. V. Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. *Journal of Molecular Diagnostics.* v. 13, p. 12-21, 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 Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 4, p. 177-181, 2009.

COSTA, K. R. C.; CANDIDO, R. C.; Diagnóstico laboratorial de Candidíase oral. *NewsLab*, v. 83, p.138-145, 2007.

COSTE, A. *et al.* A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. **Genetics.** v. 172, p. 2139-56, 2006.

DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N. L.; FUENTEFRIA, A. M. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida spp.* orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** v. 47, p. 33-38, 2011.

DANBY, C. S.; BOIKOV, D. A.; RINA, R. R.; SOBEL, J. Effect of pH on *In vitro* Susceptibility of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to 11 Antifungal Agents and Implications for Clinical Use. **Infection and Immunity.** v. 81, p. 238-248, 2013.

DANIEL, H. M.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. Partial sequences analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 51, p. 1593–1606, 2001.

DANIEL, H. M.; MEYER, W. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. **Intl J Food Microbiol.** v. 86, p. 61–78, 2003.

DESNOS-OLLIVIER, M.; RAGON, M.; ROBERT, V. RAOUX, D.; GANTIER, J. C.; DROMER, F. *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). **J Clin Microbiol.** v. 46, p. 3237–3242, 2008.

DOTA, K. F. D. SHINOBU, C. S.; PATUSSI, E. V.; CONSOLARO, M. E. L.; SVIDZINSKI, T. I. E. Susceptibility to vaginal yeast in most used antifungal in Maringá, Paraná, Brazil. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* v. 42, p. 561-566, 2008.

ECHEVERRÍA-IRIGOYEN, M. J.; ERASO, E.; CANO, J.; GOMÁRIZ, M.; GUARRO, J.; QUINDÓS, G. *Saccharomyces cerevisiae* vaginitis: microbiology and *in vitro* antifungal susceptibility. **Mycopathologia.** v. 172, p. 201-5, 2011.

ECKERT, C.; BURGHOFFER, B.; LALANDE, V.; BARBUTA, F. Evaluation of the Chromogenic Agar chromID *C. difficile*. **J. Clin. Microbiol.** v. 51, 2013.

EFFRON, G. G.; CANTON, E.; PEMA'N, J.; DILGER, A.; ROMA, E.; PERLIN, D. S. Assessment of Two New Molecular Methods for Identification of *Candida parapsilosis* Sensu Lato Species. **Journal Of Clinical Microbiology.** v. 49, p. 3257–3261, 2011.

EINSELE, H. *et al.*; Detection and Identification of Fungal Pathogens in Blood by Using Molecular Probes. *Journal of Clinical Microbiology,* v. 35, n. 6, p. 1353-1360, Jun. 1997.

ELLEPOLA, A. N.; MORRISON, C. J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **J Microbiol.** v. 43, p. 65-84, 2005.

ENE, I. V.; CHENG, S. C.; NETEA, M. G.; BROWN, A. J. Growth of *Candida albicans* cells on the physiologically relevant carbon source lactate affects their recognition and phagocytosis by immune cells. **Infect Immun.** v. 81, p. 238-48, 2013.

FANELLO, S.; BOUCHARA, J. P.; JOUSSET, N.; DELBOS, V.; LEFLOHIC, A. M. Nosocomial *Candida albicans* acquisition in a geriatric unit: epidemiology and evidence for person-to-person transmission. **J Hosp Infect.** v. 47, p. 46-52, 2001.

FAVRE, B.; DIDMON, M.; RYDER, N. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 α -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology.** v. 145, p. 2715-25, 1999.

FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, A.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematic 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.

FERRAZZA, M. H. S. H.; MALUF, M. L.; CONSOLARO, M. E. L.; SHINOBU, C. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BATISTA, M. R. Caracterização de leveduras isoladas da

vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.27, n. 2, p. 58-63, 2005.

FERREIRA, M. A.; COLOMBO, A. L.; PAULSEN, A.; REN, Q.; WORTMAN, J.; HUANG, J.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN, G. H.; The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol.** v. 43, p. 313-319, 2005.

FLOREZ, J.; MENDEZ, A. S.; CANO, J.; GUARRO, J.; PEREZ, R. E.; ARÉVALO, M. P. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. **J. Clin. Microbiol.** v. 43, p. 4107-4111, 2005.

FORCHE, A., G.; SCHO"NIAN, Y.; GRA"SER, R.; VILGALYS, T.; MITCHELL. G. Genetic structure of typical and atypical populations of *Candida albicans* from Africa. **Fungal Genet. Biol.** v. 28, p. 107–125, 1999.

FRUTOS, R. L.; ESPINAR, T. M. F.; QUEROL, A. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **Antonie van Leeuwenhoek.** v. 85, p. 175–185, 2004.

GALLE, L. C.; GIANINNI, M. J. S. M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 4, p. 229-236, 2004.

GE, H. S.; WAN, Z.; LI, J.; XU, J.; LI, Y. R.; BAI, Y. F. Correlation between Azole Susceptibilities, Genotypes, and *ERG11* Mutations in *Candida albicans* Isolates Associated with Vulvovaginal Candidiasis in China. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3126-3131, 2010.

GERRITS VAN DEN ENDE, AHG, HOOG, S. G. Variabilidade e diagnóstico molecular da espécie neurotrópica *Cladophialophora bantiana*. **Stud. Mycol.** v 43, p. 151-162, 1999.

GHANNOUM, A.; RICE, L. B. Agentes antifúngicos: modo de ação, mecanismos de resistência, e correlação desses mecanismos com a resistência bacteriana. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 4, p. 501-517, 1999.

GONDO, D. C. A. F.; DUARTE, M. T. C.; SILVA, M. G.; PARADA, C. M. G. L. Abnormal Vaginal Flora in Low-Risk Pregnant Women Cared for by a Public Health Service: Prevalence and Association with Symptoms and Findings from Gynecological Exams. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 18, n. 5, p. 919-927, 2010.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1647 p.

GOW, N. R. Multiple mating strategies. **Nature.** v. 494, p. 45-46, 2013.

GUARRO, J.; HOOG, G. S.; GENE, M. J; FIGUERAS. Atlas of Clinical Fungi. ed. 2, 2000.

GUPTA, A. K.; TOMAS, E. New antifungal agents. **Dermatol Clin.** v. 21, p. 565-576, 2003.

GUZEL, A. B.; JJKIT, M.; AKAR, T.; BURGUT, R.; DEMIR, C. Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID *Candida* agar versus CHROMagar *Candida* for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. **Med. Mycol.** v. 49, p. 16-25, 2007.

HEO, S. M.; SUNG, R. S.; SCANNAPIECO, F. A.; HAASE, E. M. Genetic relationships between *Candida albicans* strains isolated from dental plaque, trachea, and bronchoalveolar lavage fluid from mechanically ventilated intensive care unit patients. **J Oral Microbiol.** v. 3, 2011.

HOOG, G.S.; ATTILI-ANGELIS, D.; VICENTE, V.A.; QUEIROZ-TELLES, F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. **Medical Mycology**, v. 42, p. 405-416, 2004.

JAEGER, M.; PLANTINGA, T. S.; JOOSTEN, L. A. B.; KULLBERG, B. J.; NETEA, M. G. Genetic Basis for Recurrent Vulvo-Vaginal Candidiasis. **Curr Infect Dis Rep.** 2013.

JONES, T.; FEDERSPIEL, N. A.; CHIBANA, H.; DUNGAN, J.; KALMAN, S.; MAGEE, B. B.; NEWPORT, G.; THORSETENSON, Y. R.; AGABIAN, N.; MAGEE, P. T.; DAVIS, R. W.; SCHERER, S. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. **PNAS.** v. 101, p. 7329-7334, 2004.

KIRKPATRICK, C. H. Host factors in defense against fungal infections. **American Journal of Medicine**, v. 77, n. 413, p. 1-12, 1984.

KURTZMAN C.P. AND ROBNETT C.J. Identification of Clinically Important Ascomycetous Yeasts Based on Nucleotide Divergence in the 59 End of the Large-Subunit (26S) Ribosomal DNA Gene. **Journal Of Clinical Microbiology.** v. 35, p. 1216–1223, 1997.

KURZTMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. The yeasts a taxonomic study. Elsevier Science. 5th, p. 2354, 2011.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINZ_VACCARI E.M., MELO, N.T. Tratado de Micologia Médica Lacaz. 9a edição, 2002. São Paulo, SP: Sarvier.

LAIN, A. *et al.*; Use of recombinant antigens for the diagnosis of invasive Candidiasis. Clinical and Developmental Immunology. 2008.

LATTIF, A. A. Molecular typing and *in vitro* fluconazole susceptibility of *Candida* species isolated from diabetic and nondiabetic women with vulvovaginal candidiasis

- in India. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 44, p. 166-171, 2011.
- LAU, A.; CHEN, S.; SLEIMAN, S. SORRELL, T. Current status and future perspectives on molecular and serological methods in diagnostic mycology. **Future Microbiol.** v. 4, p. 1185–1222, 2009.
- LAVRA, Z. M. M.; SONEGO, F.; SILVA, R. M. F.; MEDEIROS, F. P. M. Desenvolvimento e validação de método analítico para nistatina creme vaginal por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*** vol. 44, n. 4, 2008.
- LIAN, C. H.; LIU, W. D. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase in human vulvovaginal candidiasis. **Mycoses.** v. 50, p. 383–390, 2007.
- LINHARES, L. M.; WITKIN, S. S.; MIRANDA, S. D.; FONSECA, A. M.; PINOTTI, J. A.; LEDGER, W. J. Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. **Infect Dis Obstet Gynecol.** v. 9, p. 221-5, 2001.
- LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. C.; BARACAT, E. C. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.56, n. 3, p. 370-374, 2010.
- LOCKHART, S. R.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Geofraphic distribution and antifungal susceptibility of the Newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* im Comparasion to the closely related species *Candida parapsilosis*. **Journal Of Clinical Microbiology.** v. 46, p. 2659-2664, 2008.
- LOPES-CONSOLARO, M. E.; ALINE-ALBERTONI, T.; SHIZUE-YOSHIDA, C.; PERALTA, R. M.; ESTIVALET-SVIDZINSKI, T. I. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringa, Parana, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 21, p. 202-05, 2004.
- LOURENÇO, B. Vulvovaginite Na Infancia E Adolescencia. São Paulo, 2009. Disponível em : <http://www.medcenter.com/Medscape/> Acesso em janeiro 2013.
- MAHMOUDI, R. A. D. M.; ZAFARGHANDI, S.; ABBASABADI, B.; TAVALLAEE, M. The epidemiology of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.** v. 155, n. 2, p. 199-203, 2010.
- MALUCHE, M.E.; SANTOS, J. I. *Candida sp.* e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **RBAC**, v. 40, p. 65-67, 2008.
- MARICHAL, P.; KOYMANS, L.; WILLEMSSENS, S.; BELLENS, D.; VERHASSELT, P.; LUYTEN, W.; BORGERS, M.; RAMAEKERS, F. C.; ODDS, F. C.; BOSSCHE, H. V. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p,

Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, v.145, p. 2701–2713, 1999.

MARIE, C. & WHITE, T.C. Genetic Basis of Antifungal Drug Resistance. **Curr Fungal Infect Rep.** v. 3, p. 163-169, 2009.

MARR, K. A.; RUSTAD, T. R.; REX, J. H.; WHITE, T. C. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 43, p. 1383–1386, 1999.

MARTINEZ , R. C.; FRANCESCHINI, S. A.; PATTA, M. C.; QUINTANA, S. M.; CANDIDO, R. C.; FERREIRA, J. C.; DE MARTINS, E. C.; REID, G. Improved treatment of vulvovaginal candidiases with fluconazole plus probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14. **Letters in Applied Microbiology.** v. 48, p. 269-274, 2009.

MARTINS, H. P.; SILVA, M. C.; PAIVA, L. C. F.; ESTIVALET, T. I.; CONSOLARO, M. E. L. Efficacy of Fluconazole and Nystatin in the Treatment of Vaginal *Candida* Species. **Acta Derm Venereol.** v. 92, p. 78-82, 2012.

MCCULLOUGH, M. J.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. **J Clin Microbiol.** v. 37, p. 417-21, 1999.

MICHELI, M., BILLE, J., SCHUELLER, C. & SANGLARD, D. A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2, two genes involved in antifungal drug resistance. **Mol Microbiol.** v. 43, p. 1197-214, 2002.

MONROY-PEREZ, E.; SAINZ-ESPUNES, T.; PANIAGUA-CONTRERAS, G.; NEGRETE- ABASCAL, E.; RODRIGUEZ-MOCTEZUMA, J. R.; VACA, S. Frequency and expression of ALS and HWP1 genotypes in *Candida albicans* strains isolated from Mexican patients suffering from vaginal candidosis. **Mycoses.** v. 55, p. 151–e157, 2012.

MORAN, G. P.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why is *C. albicans* more pathogenic? **Journal of microbiology.** 2012.

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. Tese de doutorado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, 2012.

MORIO, F., LOGE, C., BESSE, B., HENNEQUIN, C. & LE PAPE, P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 66, p. 373-84, 2010.

MOROY-PEREZ, E.; SAINÉZ-ESPUNES, T.; PANIAGUA-CONTRERAS, G.; NEGRETE-ABASCAL, E.; RODRIGUEZ-MOCTEZUMA, J. R.; VACA, S. Frequency and expression of ALS and HWP1 genotypes in *Candida albicans* strains isolated from Mexican patients suffering from vaginal candidosis. **Mycoses**. v. 55, p. 151-157, 2012.

MORSCHHAUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genet Biol.** v. 47, p. 94-106, 2010.

MORSCHHÄUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Biochim Biophys Acta**. v.1587, 240-8, 2002.

MUSIAL, D. C.; OLIVEIRA, J. E.; LIMA, E. L. W.; ISHIDA, K.; SCOARIS, D. O. Frequência de leveduras em exames colpocitológicos oferecidos pelo SUS em duas cidades do Norte Paranaense. **Revista de Saúde e Biologia**, v.4, n.2, p.1-5, 2009.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiol Mol Biol R.** v. 67, p. 400-428, 2003.

NAGLIK, J. R.; FIDEL, J. P.; ODDS, F. C. Animal models of mucosal *Candida* infection. *Fem 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. **J Med Microbiol**. v. 55, p. 1323–7, 2006.

NGUYEN, H. V.; GAILLARDIN, C.; NEUVEGLISE, C. Differentiation of *Debaryomyces hansenii* and *Candida famata* by rRNA gene intergenic spacer fingerprinting and reassessment of phylogenetic relationships among *D. hansenii*, *C. famata*, *D. fabryi*, *C. flareri* (*D. subglobosus*) and *D. prosopidis*: description of *D. vietnamensis* sp. nov. closely related to *D. nepalensis*. **FEMS Yeast Res.** v. 9, p. 641– 662, 2009.

NOËL, T. The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs **Journal de Mycologie Médicale**. v. 22, p. 173—178, 2012.

NOUMI, E.; SNOUSSI, M.; SAGHROUNI, F.; BEN SAID, M.; DEL CASTILLO, L.; VALENTIN, E.; BAKHROUF, A. Molecular typing of clinical *Candida* strains using random amplified polymorphic DNA and contour-clamped homogenous electric fields electrophoresis. **J Appl Microbiol**. v. 107, p. 1991-2000, 2009.

O'DONNELL K. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR & Taylor JW (Eds) *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. p 225–233, 1993.

OLIVEIRA, P. M.; MASCARENHAS, R. E.; LACROIX, C.; FERRER, S. R.; OLIVEIRA, R. P. C.; CRAVO, E. A.; ALVES, A. P. R.; GRASSI, M. F. R. *Candida*

species isolated from the vaginal mucosa of HIV-infected women in Salvador, Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis.* v.15, p. 239-244, 2011.

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* v. 32, p.1923-9, 1994.

PÁDUA, R. A. F.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T. I. E. *In vitro* activity of antifungal agents on yeasts isolated from vaginal secretion. *Acta Scientiarum. Health Sciences.* v. 25, p. 51-54, 2003.

PAPAEMMANOUIL, V.; GEORGOGIANNIS, N.; PLEGA, M.; LALAKI, J.; LYDAKIS, D.; DIMITRIOU, M.; PAPADIMITRIOU, A. Prevalence and susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* causing vaginitis in Greek women. *Anaerobe.* v. 17, p. 298-9, 2011.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D. K.; CALANDRA, T. F.; EDWARDS, J.E. J.; FILLER, S. G.; FISHER, J. F.; ULLBERG, B. J.; ZEICHNER, L. O.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, p. 503-535, 2009.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; SHEEHAN, D. J. Interpretative breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* v. 19, p. 435-447, 2006.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* v. 20, p. 133–163, 2007.

PINCUS, D. H.; ORENGA, S.; CHATELLIER, S. Yeast identification—past, present, and future methods. *Med Mycol.* v. 45, p. 97-121, 2007.

QINGKAI, D.; LINA, H.; YONGMEI, J.; HUA, S.; JINHAO, L.; WENJIE, Z.; CHUAN, S.; HUI, Y. An epidemiological survey of bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis and trichomoniasis in the Tibetan area of Sichuan Province, China. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* v. 150, p. 207–209, 2010.

ROBLES, J. C. Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating strains of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* v. 42, p. 2480-8, 2004.

ROMEO, O.; CRISEO, G. Molecular epidemiology of *Candida albicans* and its closely related yeasts *Candida dubliniensis* and *Candida Africana*. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 4, p. 212-214, 2009.

ROSA, M. I.; RUMEL, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. *Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia*, v. 26, p. 65-70, 2004.

ROSA, M. I.; SILVA, B. R.; PIRES, P. S.; SILVA, F. R.; SILVA, N. C.; SILVA, F. R.; SOUZA, S. LO.; MADEIRA, K.; PANATTO, A. P.; MEDEIROS, L. R. Weekly

fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v. 167, p. 132–136, 2013.

RUHNKE, M.; Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. **Current Drug Targets**. v. 7, p. 495-504, 2006.

RUIZ, B. D.; MARTINEZ, V.; ALVAREZ, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V. Molecular tracking of *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: long-term colonizations versus catheter-related infections. **J Clin Microbiol**. v. 35, p. 3032-6, 1997.

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

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 49, p. 668-79, 2005.

SCHULZE, J; SONNENBOURN, U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. **Deutsches Arzteblatt International**. v. 837-841, 2009.

SIMÕES, J. A.; DISCACCIATI, M. G.; BROLAZO, E.; PORTUGAL, P. M.; PAUPÉRIO, R. P. S.; AROUTCHEVA, A.; TAO, V. L. Microbiota Vaginal Envolvidos na Gênese da Vaginose Bacteriana em Profissionais do Sexo e Não-profissionais do Sexo. **DST – J. Bras. Doenças Sex. Transm**. v. 18, p. 108-112, 2006.

SOBEL JD, FARO S, FORCE RW & COLS. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations. **Am J Obstet Gynecol**, v. 178, p. 203-11, 1998.

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

SOBEL, J. D.; WIESENFELD, H. C.; MARTENS, M.; DANNA, P.; HOOTO, T, M.; ROMPALO, A.; SPERLING, M.; LIVENGOOD, C.; HOROWITZ, B.; VON THRON, J.; EDWARDS, L.; PANZER, H.; CHU, T. C. Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiases. **The New England Journal of Medicine**. v. 351, p. 876-883, 2004.

SOUZA, P. C.; FILHO, A. S.; SOUZA, E. D.; MELLO, M.; PEREIRA, W.; SVIDIZINSKI, M. E. LOPES-CONSOLARO Prevalence of *Candida* sp. in the cervical–vaginal cytology stained by Harris–Shorr. **Arch Gynecol Obstet** v. 279, p. 625–629, 2009.

SPINILLO, A.; CAPUZZO, E.; ACCIANO, S.; DE SANTOLO, A.; ZARA, F. Effect of antibiotic use on the prevalence of symptomatic vulvovaginal candidiasis. **Am J Obstet Gynecol**. v. 180, p. 14-7, 1999.

SUJIT, D.; RATHOD, J. D. k.; KRUPP, k.; REINGOLD, a. I.; MADHIVANAN, p. Epidemiologic Features of Vulvovaginal Candidiasis among Reproductive-Age Women in India. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**. 2012.

SUNDSTROM P.; BALISH, E.; ALLEN, C. M. Essential ROLE OF THE *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein. In lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. **J Infect Dis**. v. 185, p. 521-530, 2002.

SZABÓ, Z., *et al.* *In vitro* efficacy of 5 antifungal agents against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* as determined by time-kill methodology. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**. v. 64, p. 283–288, 2009.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. **Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0**. *Molecular Biology and Evolution* v. 24, p.1596-1599, 2006.

TAVANTI, A., A. D.; DAVIDSON, N. A. R.; GOW, M. C. J.; MAIDEN, F. C.; ODDS. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp.. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **J. Clin. Microbiol**. v. 43, p. 284–292, 2005.

TAVERNA, C. G.; BOSCO-BORGEAT, M. E.; MURISENGO, O. A.; DAVEL, G.; BOITÉ, M. C.; CUPOLILLO, E. CANTEROS, C E. Comparative analyses of classical phenotypic method and ribosomal RNA gene sequencing for identification of medically relevant *Candida* species. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 108, p. 178-185, 2013.

TIETZ, H. J. M.; HOPP, A.; SCHMALRECK, W.; STERRY; CZAİKA, V. *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*? *Mycoses*. v. 44, p. 437–445, 2001.

VANDEPUTTE, P., FERRARI, S. & COSTE, A.T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **Int J Microbiol**, 2012.

VIJGEN S. *et al.* Comparison of Vitek identification and antifungal susceptibility testing methods to DNA sequencing and Sensititre YeastOne antifungal testing. **Med. Mycol**. v. 49, p. 107–110, 2011.

VICENTE, V. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L. M.; NAJAFZADEH, M. J.; DE HOOG, G.S.; ZHAO, J.; . PIZZIRANI-KLEINER. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v.137–144, 2008.

VINCENT, M. B.; ZHONG, W.; SADIE, L.; MARJANI, *et al.* Comprehensive annotation of the transcriptome of the human fungal pathogen *Candida albicans* using RNA-seq. **Genome Research**. v.20, p. 1451–1458, 2010.

WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications** (eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), pp. 315–322. Academic Press, San Diego, 1990).

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, p. 184, 2007.

WILLIAMS, D. W.; WILSON, M. J.; LEWIS, M. A. O.; POTTS, A. J. C. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* v. 33, p. 2476–2479, 1995.

YUAN Xin-rong; LI, Hong-wei¹, YUAN, L.; FAN Long-zhong. Analysis of the diagnosis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis in 80 cases. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 30, p. 2413-2416, 2010.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida sp.* **NewsLab**, ed. 63, 2004.

ZHAO, X.; OH, S. H.; CHENG, G. *et al.* ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesion; functional comparasions between ALS3 and ALS 1. *Microbiology*. v. 150, p. 2415-2428, 2004.

APÊNDICE



Curitiba, 12 de agosto de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)
Gheniffer Fornari
Hospital de Clínicas da UFPR
Curitiba - PR

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado: "EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LEVEDURAS DO GÊNERO CANDIDA AGENTE DE INFECÇÃO VULVOVAGINAL", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 26 de julho de 2011.

O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0193.0.208.000-11
Registro CEP: 2569.176/2011-07

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: fevereiro de 2012.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Renato Tambara Filho".

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Epidemiologia molecular de leveduras do gênero candida agentes de infecção vulvovaginal.

Investigador: Gheniffer Fornari

Local da Pesquisa: Hospital de Clínicas UFPR.

Endereço e telefone (celular): 33611573 ou 33611696

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

JUSTIFICATIVA

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma inflamação, que compromete principalmente vulva e vagina, esta inflamação é causada por um fungo denominado Candida, os quais podem ser habitantes normais dessas regiões. A candidíase vulvovaginal está entre os principais problemas ginecológicos que afetam mulheres em idade reprodutiva, atingindo milhares de pessoas no mundo todo.

Existe uma necessidade de se estabelecer o uso de medicamentos baseado em testes que determinam se o medicamento combate a inflamação, assim poderemos analisar a eficácia do tratamento e compreensão do perfil da doença.

PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo é identificar e comparar as diferentes espécies de fungos do gênero de Candida isoladas da região urogenital de pacientes atendidas no Hospital de Clínicas da UFPR. E estes fungos serão guardados, para a formação de uma coleção de fungos para a Universidade, sendo que o nome das pacientes não será utilizado, ou seja será mantido em sigilo.

SELEÇÃO

Você esta sendo selecionada porque a senhora esta fazendo um exame preventivo de rotina.

PROCEDIMENTOS

Caso você participe da pesquisa, será necessário assinar este documento e responder um questionário. Você esta sendo selecionada porque venho até o ambulatório realizar um exame preventivo de rotina. O médico fará a coleta do material durante o exame preventivo sem causar nenhum dano ou desconforto adicional.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS


MARIA JOSÉ MOCELIN
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do HC/UFPR
 Matrícula 7462

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com seu médico do estudo. As amostras biológicas coletadas ficarão sob a guarda das pesquisadoras e servirão para a construção da micoteca na forma anônima.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiverem alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o Investigador do estudo ou sua equipe Gheniffer Fornari celular (46) 99750597, email: gheniffer.fornari@gmail.com. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do setor de ciências biológicas, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos. Email e horários disponíveis para fazerem contato.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

NOME DO PACIENTE	ASSINATURA	DATA
------------------	------------	------

NOME DO INVESTIGADOR OU QUEM APLICAR TCLE.	ASSINATURA	DATA
--	------------	------



Meio Ágar Saboraud Dextrosado

Dextrose - 40g

Peptona - 10g

Agar - 15g

Água destilada – 1.000 mL

Meio Batata Dextrose- BDA

Infusão de Batatas - 200ml

Glicose - 20g

Ágar - 15g

Água Destilada - 1000ml

Solução salina a 0,85%

Tampão CTAB

Tris-base - 2,42 g

Cloreto de sódio - 8,2 g

NaEDTA - 2,0 g

Água destilada - 8,0 mL

O pH final foi ajustado para 7,5 com HCL 1N.

Tampão TBE (10x)

Tris-base - 108g

EDTA - 9,3g

Ácido Bórico - 55g

Água destilada - 1000mL

Clorofórmio Álcool isoamílico - CIA

Clorofórmio 96 mL

Álcool isoamílico 4 mL

TBE 5X

Tris-base 54,0 g

Ácido bórico 27,5 g

EDTA 0,5M 20 mL

Os sais foram dissolvidos em 800mL de água mili-Q. Completou-se o volume para 1000 mL.

TBE 1X

TBE 5X - 100 mL

Água milliQ 400 mL

DNA Polimerase

Para as reações de amplificação foi utilizado Taq polimerase da marca Invitrogen com concentração de 5 U/ μ L.

dNTP

Os desoxirribonucleotídeos dATP, dTTP, dGTP, dCTP foram diluídos em água ultra pura a 2,5 μ M. Foi utilizada a concentração final de 0,20 μ M para cada dNTP nas reações de amplificação.

Gel de Agarose (0,8%)

Agarose - 0,8 g

Tampão TBE 1X - 100 mL

Gel de Agarose (1,4%)

Agarose -1,4 g

Tampão TBE 1X - 100 mL

Brometo de Etídio

O brometo de etídio 1,0% (p/v) foi dissolvido em água destilada, agitando-se por 2 horas. A solução foi estocada a temperatura ambiente. Para a revelação, foram diluídos em 3 μ L em água destilada.