

RESSALVA

Alertamos para ausência dos Anexos não incluídos pelo(a) autor(a) no arquivo original.

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

PAULA DOS REIS CORRÊA

**“INVESTIGAÇÃO MICOLÓGICA DO FLUIDO VAGINAL DE
MULHERES ADULTAS DA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO.”**

São José do Rio Preto-SP

PAULA DOS REIS CORRÊA

**INVESTIGAÇÃO MICOLÓGICA DO FLUIDO VAGINAL DE
MULHERES ADULTAS DA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Professora Doutora

FAMERP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Márcia Maria Costa Nunes Soares

Pesquisadora Doutora

Instituto Adolfo Lutz

Profa. Dra Lúcia Buchalla Bagarelli

Professora Doutora

FAMERP- São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, fevereiro de 2009

Corrêa, Paula dos Reis.

Investigação micológica do fluido vaginal de mulheres adultas da região de São José do Rio Preto / Paula dos Reis Corrêa. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

71 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Micologia. 2. Candidíase - Fatores de risco. 3. Candidíase vulvovaginal. - Suscetibilidade antifúngica. I. Almeida, Margarete Teresa Gottardo. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 582.28

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com intensidade, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve, e a vida é muito para ser insignificante. Eu faço e abuso da felicidade e não desisto dos meus sonhos. O mundo está nas mãos daqueles que tem coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

Dedicatória	<i>i</i>
Agradecimentos	<i>ii</i>
Lista de Figuras	<i>v</i>
Lista de Tabelas	<i>vi</i>
Lista de Gráficos	<i>vii</i>
Lista de Abreviaturas e Símbolos	<i>viii</i>
Resumo	<i>ix</i>
Abstract	<i>x</i>
1. INTRODUÇÃO	<i>14</i>
1.1. Candidíase vulvovaginal (CVV).....	<i>15</i>
1.2. <i>Candida sp.</i>	<i>17</i>
1.2.1. Fatores de virulência.....	<i>18</i>
1.3. Parasita <i>versus</i> hospedeiro.....	<i>19</i>
1.4. Tratamento da candidíase vulvovaginal.....	<i>20</i>
1.5. Métodos de microdiluição (M27-A2) e difusão em disco (MP44).....	<i>21</i>
2. OBJETIVO	<i>23</i>
3. Casuística	<i>24</i>
3.1. Métodos.....	<i>25</i>
3.2. Identificação das amostras de leveduras.....	<i>27</i>
3.3. Teste de sensibilidade.....	<i>27</i>
3.3.1. Método de disco difusão (M44P).....	<i>27</i>

3.3.1.1. Preparação do inóculo.....	27
3.3.1.2. Preparação das placas e antifúngicos.....	28
3.3.1.3. Leitura e interpretação dos halos de inibição.....	28
3.3.2. Método de microdiluição (M27-A2).....	29
3.3.2.1. Preparação do inóculo.....	29
3.3.2.2. Meio RPMI.....	29
3.3.2.3. Antifúngicos.....	29
3.3.2.4. Preparação das microplacas.....	30
3.3.2.5. Interpretação da atividade antifúngica.....	30
3.4. Teste de enzimotipagem.....	31
3.4.1. Detecção de fosfolipase.....	31
3.4.2. Detecção de proteinase.....	31
3.5. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Caracterização epidemiológica.....	34
4.2. Identificação das leveduras.....	36
4.3. Teste de suscetibilidade por difusão em disco.....	37
4.4. Teste de suscetibilidade por microdiluição.....	38
4.5. Análise comparativa dos métodos de determinação de suscetibilidade antifúngica.....	39
4.6. Análise de concordância entre os métodos.....	42
4.7. Tratamento.....	42
4.8. Distribuição das espécies produtoras de fator de virulência.....	42

4.9. Fator de virulência <i>versus</i> clínica.....	43
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÃO.....	52
7. REFERÊNCIAS.....	54
8. ANEXOS.....	67

DEDICATÓRIA

À minha família!

AGRADECIMENTOS

- ❖ Aos meus pais, pelo apoio, confiança e amor imensuráveis! Por acreditarem em mim, e financiarem mais esse sonho.

- ❖ Aos meus irmãos: a Renata por seus cuidados de mãe e carinho e amizade de irmã, e ao Gabriel pelo apoio, amizade e por ter nos dado os presentinhos mais lindos do mundo. Gabi e Nathalinha.

- ❖ A minha orientadora Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida pela oportunidade, incentivo, confiança, “puxões de orelha”, que tanto contribuíram para meu amadurecimento.

- ❖ Às minhas grandes amigas Larissa e Erika pela amizade e apoio. Por me acolherem, pela agradável companhia no laboratório, conversas, risadas e por me apresentarem as lojas de conveniência da cidade.

- ❖ Ao meu amor, Guto, por ser o meu apoio, meu incentivo, por acreditar tanto em mim, e estar sempre ao meu lado.

- ❖ Aos meus sogros, Vanda e seu Carlos, por todos os finais de semana de convivência tão agradável e por todo apoio.

- ❖ A minha Tia Inês, primas: Dani, Debrinha, e Jú, pelo apoio, amor e carinho.

- ❖ Aos amigos, Carmelia, Ana Paula, Paulo, Miuque, Bruna, Juliana, pela ajuda para realização do trabalho e por todos os momentos de descontração e alegria.

- ❖ Às meninas da pensão, da república e agregada, por terem feito essa caminhada mais prazerosa, por todas as conversas, brigadeiros, gargalhadas, festinhas, ataque a baratas, por terem sido minha família: Sabrina, Mariana, Glenda, Tâmara, Priscila , Dani, Franja.

- ❖ As minhas queridas amigas, que mesmo a distância sempre me apoiaram e me encorajaram nos momentos de fraqueza e dividiram tantas alegrias e também essa conquista: Lílian, Clara, Cíntia, Silvinha, Mariana, Rachel, Dani, Mimi.

- ❖ Aos professores da Pós-Graduação em Microbiologia pelo ensinamento, especialmente a Profa. Dra. Fátima pela crítica mais delicada e construtiva que já recebi.

- ❖ Aos companheiros do laboratório de Microbiologia, a pesquisadora Márcia, Keith, Luceli, Bruno, Rafa, Lali, Érika, Tati, Professora Mara, Gislaine, Nathalia, Paulo e Letícia, pelos momentos agradáveis e por toda ajuda para realização desse trabalho.

- ❖ Agradecimento especial aos colaboradores, Keith, Paulo, Nathalia, Danilo e Márcia.

- ❖ Ao Prof. Antonio Cordeiro pela colaboração na análise dos resultados estatísticos.

- ❖ À Jucelêa pela paciente ajuda na confecção dos gráficos.

- ❖ A Aninha e a Carol Pacca pela ajuda, principalmente na organização desse trabalho.

- ❖ Ao Laboratório de Microbiologia – FAMERP, pela infra-estrutura de ensino e pesquisa, essenciais para a realização desse trabalho.

- ❖ A Deus, por ser a minha força!.

- ❖ Às pacientes, razão principal dos estudos realizados.

- ❖ Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FAMERP.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema dos testes laboratoriais realizados para investigação micológica. **26**
- Figura 2.** Distribuição das espécies de leveduras no conteúdo vaginal das mulheres adultas N=87, sintomáticas N=69 e assintomáticas N=18..... **35**
- Figura 3.** Distribuição da frequência de suscetibilidade antifúngica de *C. albicans* ao floconazol (Fluco), itraconazol (Itra) e anfotericina B (Anfo), por difusão em disco (A) e microdiluição (B), em mulheres sintomáticas..... **40**
- Figura 4.** Distribuição da frequência de suscetibilidade antifúngica de *C. albicans* ao floconazol (Fluco), itraconazol (Itra) e anfotericina B (Anfo), por difusão em disco (A) e microdiluição (B), em mulheres assintomáticas..... **40**
- Figura 5.** Distribuição da frequência de suscetibilidade antifúngica de *C. glabrata* ao floconazol (Fluco), itraconazol (Itra) e anfotericina B (Anfo), por difusão em disco (A) e microdiluição (B), em mulheres sintomáticas..... **41**
- Figura 6.** Distribuição da frequência de suscetibilidade antifúngica de *C. glabrata* ao floconazol (Fluco), itraconazol (Itra) e anfotericina B (Anfo), por difusão em disco (A) e microdiluição (B), em mulheres assintomáticas..... **41**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros para leitura do teste de disco-difusão..... **28**
- Tabela 2.** Parâmetros de identidade segundo Capa Cohen..... **32**
- Tabela3.** Distribuição da frequência dos sintomas e correspondente valor estatístico (P)..... **36**
- Tabela 4.** Distribuição da frequência das práticas sexuais no grupo sintomático (S) e assintomático (A)..... **37**
- Tabela 5.** Distribuição da frequência das leveduras segundo produção de proteinase e fosfolipase, entre mulheres sintomáticas (S) e assintomáticas (A)..... **43**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Associação entre produção do fator de virulência proteinase com a clínica (p=0,025)	44
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CVV	Candidíase vulvovaginal
-----	-------------------------

CVVR	Candidíase vulvovaginal recorrente
µl	Microlitro
µg	Micrograma
CIM	Concentração inibitória mínima
SDD	Sensibilidade dose dependente
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
NCCLS	<i>National and Laboratory Standards Institute</i>
EUCAST	<i>European committee for antimicrobial susceptibility testing</i>
Fluco	Fluconazol
Ceto	Cetoconazol
Anfo B	Anfotericina B
Itra	Itraconazol
(S)	Sintomática
(A)	Assintomática
PROT..NEG	Proteinase negativa
PROT..POS	Proteinase positiva
pH	Potencial hidrogeniônico
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino]propanesulfônico
nm	Nanômetro
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>

RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma inflamação da mucosa genital decorrente de infecção por leveduras. Os principais sintomas são disúria, hiperemia, ardência, corrimento, prurido, dispareunia, fissuras. Aproximadamente 75% das mulheres sofrem ao menos um episódio de candidíase vulvovaginal, 40% apresentam mais de um episódio e menos de 5% tornam-se recorrentes (CVVR). A CVV tem como principal etiologia, *Candida albicans*, no entanto, episódios devido às espécies “não *albicans*” estão aumentando. O manejo das vaginites vem sendo realizado de modo empírico, levando a problemas quanto à terapêutica. Assim, este projeto teve como objetivos caracterizar fenotipicamente leveduras isoladas do conteúdo vaginal de 223 mulheres adultas, sintomáticas (S) e assintomáticas (A), atendidas pelo Serviço de Ginecologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto e determinar os indicadores clínicos. Para tal, foi realizada análise micológica dos 223 isolados clínicos, sendo que, 87 amostras apresentaram cultura positiva. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente nos dois grupos (A/S), seguida de *Candida glabrata*. A maior parte das mulheres era casada com média de idade de 30 a 40 anos, referiu uso de anticoncepcionais e ciclo menstrual regular. Em relação a práticas sexuais houve, para parte das pacientes, concomitância entre os hábitos, anal, oral e vaginal. Quando avaliado o tratamento prévio, não houve evidência de associação com sintomas particulares. A suscetibilidade a antifúngicos, realizada pelos dois métodos de referência disco-difusão e microdiluição, mostrou concordância, estatisticamente comprovada, apenas para o itraconazol. Em relação à produção de fator de virulência, apenas *C. albicans* produziu fosfolipase. Diferentemente, proteinase foi detectada em *C. albicans*, *C. glabrata* e *Candida parapsilosis*. Esse último fator de virulência esteve associado, principalmente, nos isolados obtidos a partir de pacientes sintomáticas. Os dados do presente estudo permitiram revelar associação entre fatores de virulência com sinais clínicos, detectar fenótipos de suscetibilidade antimicrobiana distintos, obtidos por dois métodos, e enfatizar a importância do diagnóstico clínico aliado à cultura.

Palavras-chaves: Candidíase vulvovaginal, proteinase, fosfolipase, suscetibilidade antifúngica.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (CVV) is an inflammation of genital mucosa caused by infection by yeasts. The main symptoms are dysuria, hyperemia, burning, corrimento, pruritus, dyspareunia, cracks. Approximately 75% of women suffer at least one episode of vulvovaginal candidiasis, 40% have more than one episode and less than 5% become recurrent (CVVR). The main cause of candidiasis is *Candida albicans*, however, episodes due to the species non *albicans* are increasing. The management of vaginitis has been done so empirically, leading to problems with therapy. Thus, this project aimed to phenotypically characterize yeasts isolated from vaginal content of 223 adult women, symptomatic (S) and asymptomatic (A), attended by the Service of Gynecology, Hospital de Base de São José do Rio Preto and determine the clinical indicators. This has mycological analysis of 223 clinical isolates, of which 87 samples showed positive culture. *C. albicans* was the species most prevalent in both groups (A / S), followed by *Candida glabrata*. Most women were married with an average age of 30 to 40 years, said use of contraceptives and menstrual cycle regularly. In relation to sexual practices was for the part of patients, concomitance between habits, anal, oral and vaginal. When assessing the previous treatment, there was no evidence of association with particular symptoms. The susceptibility to antifungal held by the two methods of reference disc-diffusion and microdilution, showed agreement, statistically proven, only to itraconazole. For the production of virulence factor, only *C. albicans* produced phospholipase. Conversely, proteinase was detected in *C. albicans*, *C. glabrata* and *Candida parapsilosis*. The latter factor was associated with virulence, mainly in isolates from symptomatic patients. Data from this study helped reveal association between virulence factors with clinical signs, detect antimicrobial susceptibility to different phenotypes, obtained by two methods, and emphasize the importance of clinical diagnosis by culture.

Key words: vulvovaginal candidiasis, proteinase, phospholipase, antifungal susceptibility.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Candidíase Vulvovaginal (CVV)

Define-se candidíase vulvovaginal como uma inflamação da mucosa genital decorrente de infecção por leveduras (FERRAZA et al., 2005; SOBEL, 2007), as quais são carregadas para a vagina por meio de processo de auto-transmissão a partir da região perianal ou a troca com parceiro por via sexual. Estes microrganismos costumam permanecer na mucosa vaginal apenas como colonizantes e uma vez encontrando condições apropriadas, aceleram o processo de multiplicação e expressam fatores de virulência, culminando com a invasão da mucosa (ALKERELE et al., 2002; ZARDO; MEZZARI, 2004).

Alguns estudos confirmam relação do estrógeno com a infecção, refletindo um efeito hormonal sobre o próprio epitélio vaginal ou como resultado da ação direta do mesmo sobre o fungo (SPINILLO et al., 1997; MACNEILL; CAREY, 2001; CREPALDI et al., 2004). Assim, observações clínicas demonstram que a infecção ocorre, com mais frequência, durante a fase lútea do ciclo menstrual, quando os níveis de estrógeno e progesterona estão elevados (LARSEN; GALASK, 1984; KINSMAN; COLLARD, 1986; KALO-KLEIN; WITKIN, 1989; CREPALDI et al., 2004;).

Nesse sentido, Witkin, 1991, avaliando a resposta imune celular à *Candida*, durante as diferentes fases do ciclo menstrual, determinou a habilidade do fungo em germinar. Durante a fase lútea, quando os níveis de progesterona estavam altos, próximos a 25 mg/ml,

observou-se a proliferação de linfócitos em mais de 50% das mulheres. Entretanto, tal comportamento não foi notado naquelas com índices de progesterona mais baixos (0,15 mg/ml). Já a mesma análise frente ao estrogênio mostrou inibição da proliferação de linfócitos, tanto na fase lútea quanto na fase proliferativa do ciclo menstrual. Desse modo, mulheres com elevados níveis de progesterona podem ter maior suscetibilidade a CVVR.

Os principais sintomas da CVV são disúria, hiperemia, ardência, corrimento, prurido, dispareunia e fissuras, o que torna a micção e a atividade sexual dolorosos, comprometendo as atividades diárias (HAINSWORTH, 2002; EDWARDS, 2004; OWEN et al., 2004).

Durante o período que vai entre a menarca e a menopausa, aproximadamente 75% das mulheres sofrem ao menos um episódio de candidíase vulvovaginal. Dessas, 40% apresentam mais de um episódio e menos de 5% apresentam episódios de repetição com quatro ou mais eventos anuais, daí a designação de candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), (MILES et al., 1977; SOBEL; CHAIN, 1997; BUSCEMI et al., 2004; FIDEL, 2006). De fato, nos casos recidivantes, diversos fatores podem estar envolvidos, e de modo particular, a disseminação contígua do trato gastrointestinal e transmissão sexual merecem destaque (VENTOLINI; BAGGISH, 2006). Além disso, observa-se que a síntese de produtos biológicos, tais como hidrolases, proteinases e fosfolipases (MORAES, 1998) levam à instabilidade fenotípica e até reações de hipersensibilidade, incluindo-se como fator predisponente. Nesse sentido, o estudo de Witkin, 1991, comprovou a ocorrência de alergia na mucosa vaginal de mulheres adultas. Tal evento foi estimulado por sêmen, rico em alérgeno específico e IgE correspondente, culminando em resposta alérgica, sempre após o coito. Esse fenômeno foi observado, pois a IgE ligava-se a mastócitos e/ou basófilos localizados no trato genital, desencadeando resposta imune.

A maioria dos casos de CVV tem como principal etiologia *Candida albicans*. No entanto, episódios devido às espécies “não *albicans*” estão aumentando (NYIRJESY, 2001; SOBEL et al., 2004; GARCIA et al., 2006), e neste grupo encontram-se *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, além de outras espécies (ZARDO; MEZZARI, 2004). Tal fato é preocupante, pois em geral as duas últimas são mais resistentes aos antifúngicos clássicos utilizados na prática clínica (FERRAZA et al., 2005).

1.2 *Candida sp*

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância clínica pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano (ANYON et al., 1971; HAINSWORTH, 2002; COLOMBO; GUIMARÃES, 2007). São classificadas como fungos dimórficos, saprófitas, com virulência limitada (GIRALDO et al, 2000; ANVISA, 2005; NEVES et al., 2005), encontradas na mucosa vaginal e gastrintestinal em 20 a 80% da população adulta saudável, condição que favorece o estabelecimento da infecção (MCCORMACK; ZINNER, 1994; MCMULLAN-VOGEL et al., 1999; BARTOLOMEO et al., 2002; GALLE; GIANINNI, 2004).

Essa levedura existe na forma de esporos (blastosporos), estrutura relacionada com a disseminação e transmissão, e geralmente associada com a colonização, ou micélio, forma germinativa, com capacidade invasora do tecido e virulência (FERRER, 2000; LACAZ; PEHINATI, 1980; PFALLER et al., 2003; CREPALDI et al., 2004; FERRAZA et al., 2005).

A maneira como a levedura se relaciona com o organismo humano é interessante, caracterizando-se ora como comensal, ora como patógeno e associada às alterações nos

mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas (FERRAZA et al., 2005).

1.2.1 Fatores de virulência

Diversos produtos biológicos de *Candida sp* vêm sendo descritos como fatores de virulência, importante no desenvolvimento de doenças, com destaque especial às enzimas histolíticas (PRICE et al., 1982; GHANNOUM; ABUELTEEN, 1990; YANAMOTO et al., 1992; SHIMIZU et al., 1995; SHIMIZU et al., 1996; WEBB et al., 1998; AKPAN; MORGAN, 2002; DAR-ODEH; SHEHABI, 2002; SHIMP, 2002; OKUNGBOWA et al., 2003; DOSTAL et al., 2003; SCHECHTER; RACHID, 2004; MEDRANOEDRANO et al., 2006). Desse modo, fosfolipase e proteinase estão diretamente relacionadas com a virulência de *Candida sp.*, especialmente para *C. albicans*, o que a leva a ser considerada a espécie mais patogênica (HUBE, 1996; CANDIDO et al., 2000; THIELE, 2005). A fosfolipase, localizada na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo, é considerada como um fator importante para o processo de infecção. Atua pela hidrólise dos fosfolipídeos, dando origem aos lisofosfolipídeos, culminando com a invasão da célula epitelial (PRICE et al, 1982; ZARDO; MEZZARI, 2004).

A proteinase extracelular produzida por diferentes espécies de *Candida* é capaz de degradar vários substratos, tais como: queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulina e proteínas de matriz extracelular

(RÜCHEL et al, 1992), além de promover aumento da aderência das espécies de *Candida* no tecido do hospedeiro, facilitando a invasão da mucosa (FIDEL; SOBEL, 1996). Enzimas proteolíticas foram encontradas em isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (RÜCHEL et al, 1992).

Recentemente, a detecção de enzimótipos, entre isolados clínicos, comprovam a patogenicidade da cepa envolvida, além de ajudar na discriminação, servindo como um marcador epidemiológico (CANDIDO et al, 2000).

Existe uma relação positiva entre candidíase vulvovaginal e alta produção de proteinase aspártica extracelular, uma vez que, as cepas provenientes das pacientes sintomáticas são mais produtoras desse fator que aquelas sem sintomas (FIDEL; SOBEL, 1996).

1.3. Parasita Versus hospedeiro

As alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade) e/ou envelhecimento, gravidez, associação às doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; CROCCO et al., 2004) e diabetes (LEON et al., 2002). Adiciona-se ainda, como fator predisponente, o uso de anticoncepcionais orais, DIU (dispositivos intra-uterinos), antibióticos de largo espectro, corticóides, imunossupressores e até terapia de reposição hormonal (FIDEL; SOBEL, 1996; RIVERO et al., 2003; ROSA; RUMEL, 2004; GALLE; GIANINNI, 2004; VENTOLINI; BAGGISH, 2006).

Recentemente, caracteriza-se como fator predisponente hábitos higiênicos inadequados e tipo de vestuário, como roupas muito justas ou de fibras sintéticas (BUSCEMI et al., 2004; ANVISA, 2005; LEON et al., 2005), e até, a direta relação entre infecção com temperaturas elevadas, isto é, de áreas geográficas muito quentes (FERRAZA, 2005), constituem-se como outros fatores predisponentes.

1.4 Tratamento da candidíase vulvovaginal

O manejo das vaginites vem sendo realizado de modo empírico, levando a problemas quanto à terapêutica (LYNCH; SOBEL, 2003). Os sinais e sintomas para candidíase não são patognomônicos, o que adverte para necessidade da realização do exame microscópico seguido da cultura para fins diagnósticos (SAMARANAYAKE et al., 1984; NYIRJESY, 2001).

A terapêutica adotada como tratamento antifúngico segue aos agentes imidazólicos e triazólicos, preferencialmente, fluconazol, miconazol, clotrimazol, itraconazol e cetoconazol, além dos poliênicos (nistatina e anfotericina B) (WANDERLEY et al., 2000; CORDEIRO, 2004). No entanto, a utilização de subdoses ou a não adoção do tempo terapêutico correto, especialmente para espécies de *Candida* “não *albicans*” (ERDEM et al., 2003) podem ser considerados fatores de risco para emergência de resistência aos azóis. Observam-se valores de concentração inibitória mínima (CIM) maiores com tendência à resistência, e as infecções causadas por eles passam a ser de difícil controle (SINGH et al., 2002). As elevadas CIM's têm sido associados com múltiplas alterações moleculares que incluem o aumento da expressão de genes que codificam múltipla resistência à droga (BILLE; GLAUSEER, 1997; MÉIS et al., 2000; XU et al., 2000; FORREST et al., 2007).

Esse dado é especialmente observado para fluconazol, um potente antifúngico amplamente utilizado na terapêutica, devido à sua boa absorção, baixa toxicidade e disponibilidade para uso oral. (ARECHAVALA et al., 2007).

Hoje, a resistência às drogas entre as espécies de *Candida sp.* vem sendo um problema crescente e, portanto, a mudança no perfil de sensibilidade obriga à realização de estudos laboratoriais para caracterização fenotípica. Nesse sentido, dois métodos vêm sendo utilizados para investigação da suscetibilidade antifúngica: microdiluição (M27-A2) e difusão em disco (M44P) (SHERWOOD et al., 1992; RIBEIRO et al., 2000; NCCLS, 2002; NCCLS, 2003; PINTO et al., 2006).

1.5 Métodos de microdiluição (M27-A2) e difusão em disco (M44P)

Os métodos de microdiluição (M27-A2) e difusão em disco (M44P) foram elaborados pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), anteriormente descrito como NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*).

O M27-A2 é o mais bem estudado, mas sua aplicação é recomendada apenas para algumas condições clínicas e estudos epidemiológicos. Sua execução é mais adequada a laboratórios institucionais, pelo fato de ser uma técnica trabalhosa e onerosa. No entanto, tornou-se método de referência para validação de diversas técnicas, como difusão a partir de discos ou fitas impregnadas com diferentes concentrações de antifúngicos (VENTOLINI; BAGGISH, 2006).

Alternativamente, o protocolo descrito no documento M44P é bem aceite como triagem, e factível para a maioria dos laboratórios clínicos e de pesquisa devido à sua execução prática.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Descrever e caracterizar fenotipicamente as espécies fúngicas obtidas do conteúdo vaginal de mulheres adultas da região do noroeste paulista, sintomáticas ou não para vulvovaginites, e determinar os indicadores clínicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Avaliar a distribuição de leveduras isoladas da mucosa genital de mulheres adultas;
- 2.2.2. Estudar o perfil de sensibilidade e resistência das leveduras a antifúngicos pelos métodos de disco-difusão e microdiluição: estabelecer análise comparativa entre os dois métodos;
- 2.2.3. Detectar a produção de fosfolipase e proteinase nos isolados clínicos de mulheres assintomáticas e sintomáticas;
- 2.2.4. Correlacionar os indicadores clínicos com os dados micológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Casuística

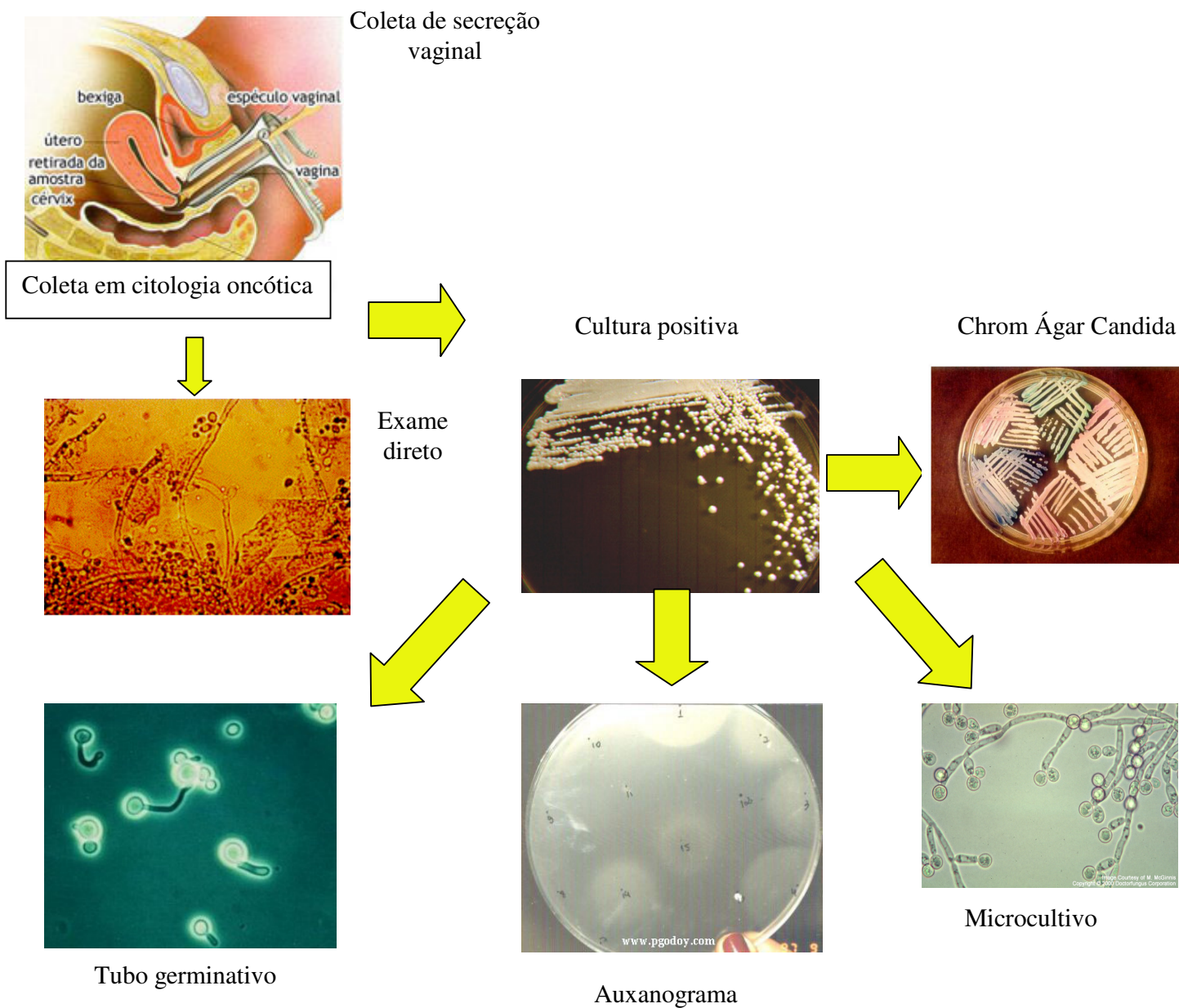
Após aprovação do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (3178/2006), e consentimento livre e esclarecido dos participantes (**anexo 1**) o trabalho teve seu início.

Participaram do estudo 223 mulheres adultas, 122 sintomáticas (**grupo 1**) e 101 assintomáticas (**grupo 2**), atendidas pelo Serviço de Ginecologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto – SP. Inicialmente, foi aplicado um questionário, com questões abertas e fechadas, sobre dados clínicos epidemiológicos relacionados aos fatores que predisõem a CVV e seus sintomas (**anexo 2**) e em seguida, a investigação micológica (**Figura 1**).

3.1 Métodos

Foram realizadas coletas de fluido vaginal, de 223 mulheres com auxílio de alça descartável estéril, introduzido em 1ml de caldo Sabouraud Dextrose (HIMEDIA), e transportado até o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. Parte da amostra foi utilizada para o exame direto e outra, destinada à cultura, semeada em placa de Ágar Sabouraud Dextrose (HIMEDIA) com e sem 100mg/ml de cloranfenicol (DIFCO), de forma a evitar contaminação por bactérias . Seguiu-se a incubação a 30°C por até 15 dias, sendo que as culturas que não apresentaram crescimento, após esse período, foram consideradas negativas.

Figura 1. Esquema dos testes laboratoriais realizados para investigação micológica.



3.2 Identificação das amostras de leveduras

As colônias crescidas no meio Ágar Sabouraud foram analisadas, inicialmente, segundo características morfológicas. Seguiu-se a semeadura em Chrom Ágar Candida (DIFCO) para identificação preliminar dos fungos segundo padrão macroscópico das colônias. A confirmação das espécies foi estabelecida por auxanograma (LARONE, 1995), além da microscopia pós microcultivo em ágar fubá (OXOID) acrescido de tween 80 (VETEC).

3.3 Teste de sensibilidade

A suscetibilidade às drogas foi avaliada pelo método de difusão em disco (M44P) e microdiluição (M27-A2), protocolos descritos pelo NCCLS. O M27-A2 foi modificado, para preparação do meio de cultura RPMI, com base no documento europeu EUCAST (*European Committee for Antimicrobial Susceptibility*), 2002.

3.3.1 Método de disco difusão (M44P)

Avaliou-se o perfil de suscetibilidade antimicrobiana frente a quatro antifúngicos, fluconazol (Cecon), itraconazol (Cecon), cetoconazol (Cecon) e anfotericina B (Cecon).

3.3.1.1 Preparação do inóculo

Após análise de viabilidade e pureza das amostras em meio Ágar Sabouraud Dextrose (HIMEDIA) a 35°C, em 24 horas, as leveduras foram suspensas em 5ml de solução salina estéril e homogeneizadas em aparelho vortex e ajustando-se o padrão de turbidez na escala 0,5 de Mac Farland.

3.3.1.2 Preparação das placas e antifúngicos

As placas foram preparadas em meio Müller-Hinton mais 2% de glicose pH 7,2 a 7,4. Com o uso de swab de algodão estéril o inóculo foi distribuído na placa, em toda sua superfície, mantendo-se por 10 minutos para inserção dos discos de antifúngicos (anfotericina B 100µg, itraconazol 10µg, fluconazol 25µg e cetoconazol 50µg), distribuídos em posições eqüidistantes nas placas. Seguiu-se a incubação a 30°C por 24 e 48 horas.

3.3.1.3 Leitura e interpretação dos halos de inibição

A leitura foi realizada medindo-se o halo de inibição em torno dos discos, frente aos agentes antifúngicos, acima descritos segundo critério do documento M44P (NCCLS, 2003), **Tabela 1**.

Tabela 1. Parâmetros para leitura do teste de disco-difusão.

Antifúngicos	Halo de inibição		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Anfotericina B*	>10mm	≤10mm	≤10mm
Cetoconazol	>20mm	10-20mm	<10mm
Fluconazol	>19mm	14-19mm	<14mm
Itraconazol	≥20mm	12-19mm	≤11mm

- Os parâmetros para anfotericina B são considerados ≤10mm tanto para o fenótipo de dose dependência como resistência.

3.3.2 Método de Microdiluição (M27-A2)

Avaliou-se o perfil de suscetibilidade antimicrobiana frente a 3 antifúngicos, fluconazol (Sigma), itraconazol (Sigma) e anfotericina B (Sigma).

3.3.2.1 Preparação do inóculo

Todas as culturas foram avaliadas quanto à pureza e viabilidade, em meio Ágar Sabouraud Dextrose (HIMEDIA) a 35°C, em 24 horas. Colônias com 1mm de diâmetro, ou mais, foram suspensas em 5ml de solução salina estéril, e homogeneizadas em aparelho vortex. A padronização dos inóculos foi realizada utilizando a escala 0,5 de Mac Farland e ajustada em 90% de transmitância em espectrofotômetro (Biospectro) em comprimento de onda de 530nm.

3.3.2.2 Meio RPMI

Ao meio de cultura RPMI – 1640 (Sigma) foram adicionados tampão (MOPS) e glicose 2%, (modificação do documento M27-A2, com base no EUCAST, 2002) ajustando-se o pH em 7,0 com ácido clorídrico, conforme descrição do fabricante.

3.3.2.3 Antifúngicos

Foram utilizadas concentrações de antifúngicos que variaram de 0,125 a 64µg/ml para fluconazol e de 0,03 a 16µg/ml para itraconazol e anfotericina B.

3.3.2.4 Preparação das microplacas

Foram utilizadas microplacas estéreis com 96 poços (cralplast) inoculando-se apenas um antifúngico por placa, da menor para a maior diluição.

As dez concentrações de cada antifúngico preparadas foram colocadas em sentido vertical na placa, nas colunas de 1 a 11. Cada coluna correspondeu a uma concentração diferente. As colunas 1 e 12 foram utilizadas como controle: a 1 controle de esterilidade e a 12, controle de crescimento.

O inóculo foi dispensado na quantidade de 100µl, nas colunas de 2 a 12. As placas foram agitadas em agitador Micro Placas MA 562 e incubadas em estufa úmida a 35°C por

24 horas. A atividade das drogas antifúngicas e a reprodutibilidade dos resultados foram asseguradas pela inclusão do isolado de referência *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida albicans* ATCC 90028.

3.3.2.5 Interpretação da atividade antifúngica

A leitura do teste foi feita por meio de comparação visual, por reflexão de espelho. Considerou-se como critério de leitura a CIM capaz de inibir 80% do crescimento para azólicos e 100% para os poliênicos.

Os parâmetros de suscetibilidade aos antifúngicos adotados foram: sensibilidade ao fluconazol a $CIM \leq 8\mu\text{g/ml}$; sensibilidade dose dependente (SDD) de $16\mu\text{g/ml}$ e/ou $32\mu\text{g/ml}$; e resistência $\geq 64\mu\text{g/ml}$; ao itraconazol, as amostras foram consideradas sensíveis quando CIM era $\leq 0,125\mu\text{g/ml}$; SDD = $0,25\mu\text{g/ml}$ ou $0,5\mu\text{g/ml}$; e resistente $\geq 1\mu\text{g/ml}$. Para anfotericina B, a sensibilidade da amostra ocorreu com a $CIM \leq 1\mu\text{g/ml}$. O **anexo 3** mostra a tabela com as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de todas as espécies testadas frente a cada um dos antifúngicos.

3.4 Teste de tipagem enzimática

Todas as leveduras obtidas nos isolados clínicos foram avaliadas quanto à produção de fatores de virulência, a saber, fosfolipase e proteinase (PRICE et al.,1982; WILLIAMSON et al., 1986).

3.4.1 Detecção de fosfolipase

Para confecção do meio Ágar Fosfolipase, seguiu-se o protocolo descrito por Price Wilkinson, Gentry, 1982, utilizando-se peptona (Merck), glicose (Synth), cloreto de sódio (Reagen), cloreto de cálcio (Reagen), ágar bacteriológico (Difco) e água destilada, acrescidos de 160ml de emulsão de ovo a 50% (80g de gema de ovo, homogeneizadas com 80ml de solução fisiológica estéril), em frasco com pérolas de vidro.

Alíquotas de 5 μ L de suspensão da levedura, em solução salina estéril, com turvação ajustada à escala 2 de Mac Farland, foram depositadas em pontos equidistantes no meio ágar fosfolipase, incubados a 30°C por 5 dias. A presença da enzima foi evidenciada pela formação de zona opaca ao redor da colônia (precipitação de complexos de cálcio) avaliada por instrumento de medida.

3.4.2 Detecção de proteinase

A produção de proteinase foi detectada seguindo-se o protocolo descrito por Rùchel; Tegeller; Trost, 1982. O Ágar foi confeccionado utilizando-se *Yeast Carbon Base* (Difco), acrescido de albumina bovina fração V (Sigma) e provit (Roche), água destilada e ágar bacteriológico (Difco). Alíquotas de 5 μ L de suspensão da levedura, em solução salina estéril, com turvação ajustada à escala 2 de Mac Farland, foram depositadas em duplicata em pontos equidistantes no meio ágar proteinase. As placas contendo 5 inóculos diferentes foram incubadas a 30°C, durante 5 dias. A produção de proteinase foi verificada pela presença de halo de clareamento ao redor do ponto de crescimento da levedura.

3.5 Análise estatística

As variáveis foram analisadas pelo teste de associação do tipo χ^2 (Qui-Quadrado) com intervalo de confiança de 95%.

O coeficiente de concordância (Capa Cohen) foi aplicado para análise de concordância dos resultados da atividade antimicrobiana entre os métodos de microdiluição e disco-difusão.

Tabela 2. Parâmetros de identidade segundo Capa Cohen.

Valor de K	Identidade
$\kappa < 0,00$	Concordância inadequada
$0,00 < \kappa < 0,20$	Concordância muito leve
$0,21 < \kappa < 0,40$	Concordância leve
$0,41 < \kappa < 0,60$	Concordância moderada
$0,61 < \kappa < 0,80$	Concordância substancial
$0,81 < \kappa < 1,00$	Concordância quase perfeita

Para associação entre produção de fatores de virulência e dado clínico (sintomática ou assintomática), aplicou-se o teste do χ^2 de Pearson.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização epidemiológica

No presente estudo avaliou-se 223 mulheres atendidas pelo serviço de Ginecologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto – SP, caracterizadas como sintomáticas (122/54,7%) – **grupo 1** e assintomáticas (101/45,3%) – **grupo 2**, sendo 87 (39%) isolados de secreções vaginais (grupo geral), positivos para leveduras pós cultura. Nos mesmos grupos, o exame direto apresentou 37,2% de amostras positivas.

O grupo 1 apresentou 69 (31%) amostras positivas, 60 (87%) correspondendo a isolados de *C. albicans*, seguido de três (4%) *C. glabrata*, dois (3%) para *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, um (1%) de cada *C. guilliermondii*, *Rhodotorula rubra*.

Já em relação ao grupo 2, a positividade foi expressa em 18 (8%) isolados, 12 (67%) indicando *C. albicans*, três (17%) *C. glabrata*. Com apenas um (6%) isolado para cada espécie, *Candida sp.*, *C. parapsilosis* e *Sacharomyces cerevisiae*.

4.2 Identificação das leveduras

Candida albicans foi à espécie prevalente (72/81,8%), tanto no grupo 1 (60/87%) quanto no grupo 2 (12/67%). Demais espécies estiveram presentes em percentuais menores, conforme demonstrado na **Figura 2**.

Espécies Isoladas – Grupo 1

Espécies isoladas –Grupo 2

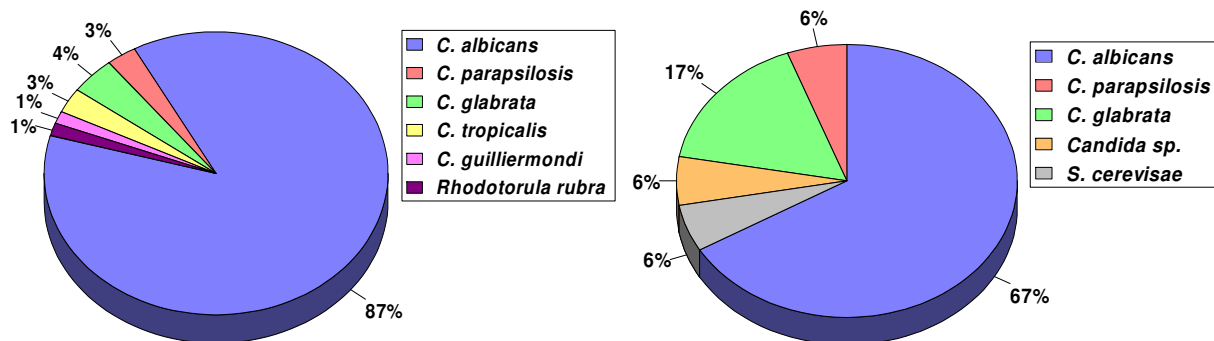


Figura 2. Distribuição das espécies de leveduras no conteúdo vaginal das mulheres adultas (N= 87), sintomáticas (69/31%) e assintomáticas (18/8%).

Grupo 1 – mulheres sintomáticas

A análise individual dos grupos possibilitou a detecção de diferenças quanto aos critérios clínicos epidemiológicos. Assim, no grupo 1, a média de idade foi de 30,61 anos com desvio padrão de 8,45 anos, ($p < 0,05$); 57% eram casadas, 36% separadas e 7% solteiras ($p = 0,429$). Quanto ao método anticoncepcional, observou-se que 77% referiram adoção, sendo 46,5% usuárias de anticoncepcional hormonal oral, isolado ou combinado

com outro método ($p < 0,05$). A recidiva foi observada em 84,2% dos casos, sendo que desses 69% tiveram até cinco episódios e 3% mais do que cinco. Considerando-se o ciclo menstrual, 88% menstruavam de forma regular ($p = 0,878$). Em relação à atividade sexual, as práticas de coito vaginal e de sexo oral foram às mais frequentes, sendo que as demais modalidades, sexo oral, sexo anal e ou concomitância entre duas ou mais, ocorreram em menor percentual, conforme apresentado na **tabela 4**.

Diversos sinais e sintomas concorreram devido à CVV, destacando-se a disúria e hiperemia vaginal como o mais frequentes (**Tabela 3**).

Tabela 3. Distribuição da frequência dos sintomas e correspondente valor estatístico (P).

Sintomas	N	%	Valor P
Disúria	111	91,3	$P < 0,005$
Hiperemia vaginal	109	89,6	$P < 0,005$
Ardência	70	57,4	$P = 0,135$
Corrimento	68	55,6	$P = 0,263$
Prurido	51	41,7	$P = 0,093$
Dispareunia	24	20	$P < 0,005$
Hiperemia vulvar	21	17,4	$P < 0,005$
Fissuras	14	12,2	$P < 0,005$

Grupo 2 – mulheres assintomáticas

Para o grupo 2, a média de idade foi de 37,1 anos com desvio padrão de 13,3 anos ($p < 0,05$); 56% eram casadas, 32% solteiras e 12% separadas ($p = 0,429$). A adoção de métodos anticoncepcionais esteve presente em 44% das participantes, ($p < 0,05$), sendo o anticoncepcional hormonal oral, isolado ou associado com outros métodos observado em 28,7% ($p < 0,05$). Os resultados relativos a episódios anteriores de CVV foram detectados em 42% dos pacientes, ($p < 0,05$), com 71% com até 5 episódios e 29% com mais que 5

($p= 0,956$). Quanto ao ciclo menstrual, 72% menstruavam, sendo 87% de modo regular ($p= 0,878$). A avaliação da atividade sexual mostrou que as práticas de sexo vaginal e oral foram preferenciais. Entretanto, outras práticas, como sexo oral, sexo anal e ou concomitância entre duas ou mais, ocorreram em menor percentual, conforme apresentado na **tabela 4**.

A detecção de espécies de *Candida* não *albicans* foi maior nesse grupo de participantes do estudo, totalizando 33%.

Tabela 4. Distribuição da frequência das práticas sexuais no grupo 1 e 2.

Práticas sexuais *	N	Grupo (1) % N		Grupo (2) %
Coito Vaginal	121	99	95	94
Sexo Oral	63	51,35	26	26
Sexo Anal	1	0,9	7	6,7
Vaginal, oral, anal	6	4,95	7	7,37
Vaginal, oral	24	19,87	39	38,52
Vaginal, anal	1	0,99	0	0

*Chi-Square P-Value = 0,001

4.3 Teste de suscetibilidade por difusão em disco

Grupo 1

O perfil de sensibilidade da *C. albicans* (N=60) frente aos antifúngicos testados foi: fluconazol (68,3%/40), itraconazol (56,7%/34), anfotericina B (98,3%/59) e cetoconazol

(93,3%/56). No entanto, o maior percentual de resistência foi o encontrado em relação ao fluconazol (26,7%/16) e o fenótipo tendência a resistência ao itraconazol (21,7%/13).

Para a *C. glabrata* (N=3), o percentual de resistência ao fluconazol foi de (33,3%/1) sendo (66,7%/2) sensíveis dose dependente. Frente ao itraconazol, o fenótipo resistente ocorreu em (100%/3) das amostras. Entretanto, todas as amostras foram sensíveis à anfotericina B e cetoconazol.

Um isolado de *C. guilliermondii* e dois de *C. tropicalis*, foram sensíveis a anfotericina B, cetoconazol e fluconazol. Já *Rhodotorula rubra* foi resistente apenas ao fluconazol.

Nos isolados de *C. parapsilosis* (N=2) foi possível evidenciar 50% resistentes ao cetoconazol, 50% sensíveis dose dependente ao itraconazol e 100% sensíveis ao fluconazol.

Grupo 2

A ocorrência de resistência ao fluconazol e itraconazol para a espécie *C. albicans* (N=12) foi de (33,4%/4) e (18%/2), respectivamente. Entretanto, todos os isolados foram sensíveis a anfotericina B e em (90%/11) ao cetoconazol. Esse elevado índice de sensibilidade, aliado aquele obtido para fluconazol e itraconazol, também foi observado para todos os isolados de *C. parapsilosis*.

A *C. glabrata* (N=3) não apresentou sensibilidade ao fluconazol, sendo (33,3%/1) resistentes e (66,7%/2) sensíveis dose dependente. Frente ao itraconazol, (66,7%/2) foram resistentes, seguidos de (33,3%/1) sensíveis dose dependente. Todos os isolados foram sensíveis ao cetoconazol.

Um isolado de *Sacharomyces cerevisiae* foi resistente a anfotericina B, itraconazol e fluconazol.

4.4 Teste de suscetibilidade por Microdiluição

Grupo 1

As CIM de fluconazol, itraconazol e anfotericina B, frente à espécie *C. albicans* (N=60) foram apresentadas segundo a referência qualitativa: resistência, sensibilidade dose dependente e sensibilidade. Assim, sensibilidade ao fluconazol ocorreu em (96,7%/58), ao itraconazol (86,6%/52) e a anfotericina B (100%/60).

C. glabrata (N=3) foi resistente ao fluconazol em (66,7%/2) dos isolados e sensível dose dependente em (33,3%/1). Ao itraconazol, sensível dose dependente em (66,7%/2) e resistente em (33,3%/1). Todas as cepas avaliadas expressaram sensibilidade à anfotericina B.

Já *C. guilliermondii* (N=1), *Rhodotorula rubra* (N=1), *C. parapsilosis* (N=2) e *C. tropicalis* (N=2) foram sensíveis a todos os antifúngicos testados.

Grupo 2

Todas as cepas de *C. albicans* (N=12) e *C. parapsilosis* (N=1) foram sensíveis aos fármacos testados. Em relação ao fluconazol e itraconazol, *C. glabrata* (N=2) foi resistente em (66,7%/2) e 100% dos isolados, respectivamente; o fenótipo sensível dose dependente ao fluconazol em (33,3%/1).

4.5 Análise comparativa dos métodos de determinação de suscetibilidade antifúngica

Dentre as espécies mais prevalentes (*C. albicans* e *C. glabrata*) foi possível encontrar diferenças quanto ao perfil de suscetibilidade antifúngica entre os dois métodos. Essas diferenças podem ser visualizadas nas figuras 3 e 5 para as mulheres sintomáticas, e nas figuras 4 e 6, para as assintomáticas.

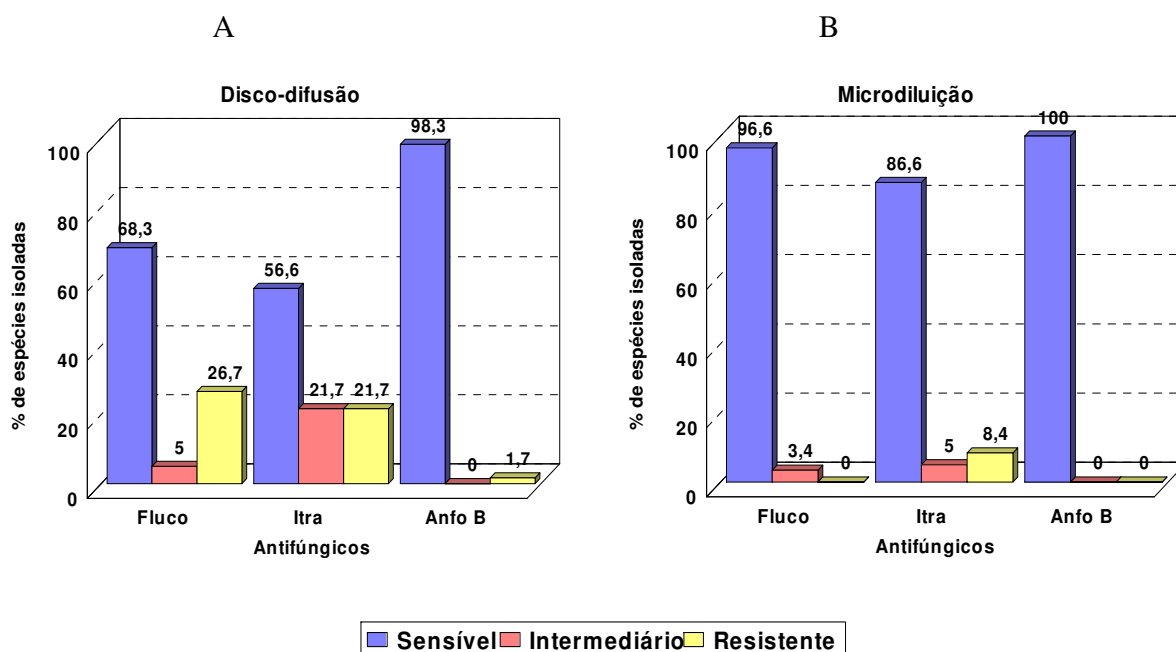


Figura 3. Distribuição da frequência de suscetibilidade antifúngica da *C. albicans* frente à fluconazol (Fluco), itraconazol (Itra) e anfotericina B (Anfo B), por difusão em disco (A) e microdiluição (B), em mulheres sintomáticas.

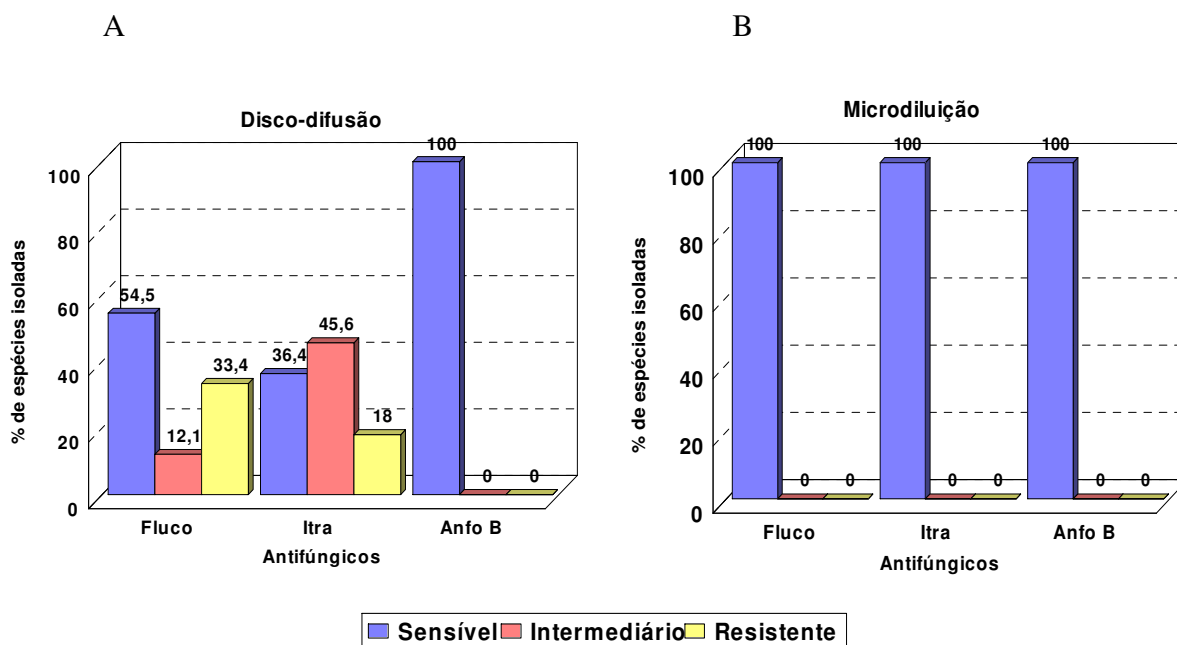
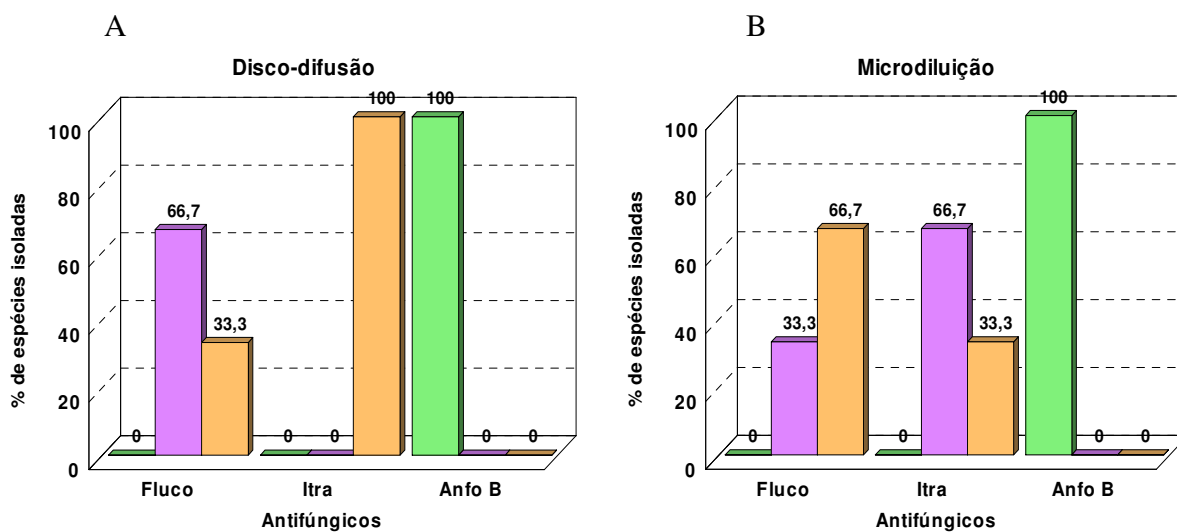


Figura 4. Distribuição da frequência de suscetibilidade antifúngica da *C. albicans* frente à fluconazol (Fluco), itraconazol (Itra) e anfotericina B (Anfo B), por difusão em disco (A) e microdiluição (B), em mulheres assintomáticas.



■ Sensível ■ Intermediário ■ Resistente

Figura 5. Distribuição da frequência de suscetibilidade antifúngica da *C. glabrata* frente à fluconazol (Fluco), itraconazol (Itra) e anfotericina B (Anfo B), por difusão em disco (A) e microdiluição (B), em mulheres sintomáticas.

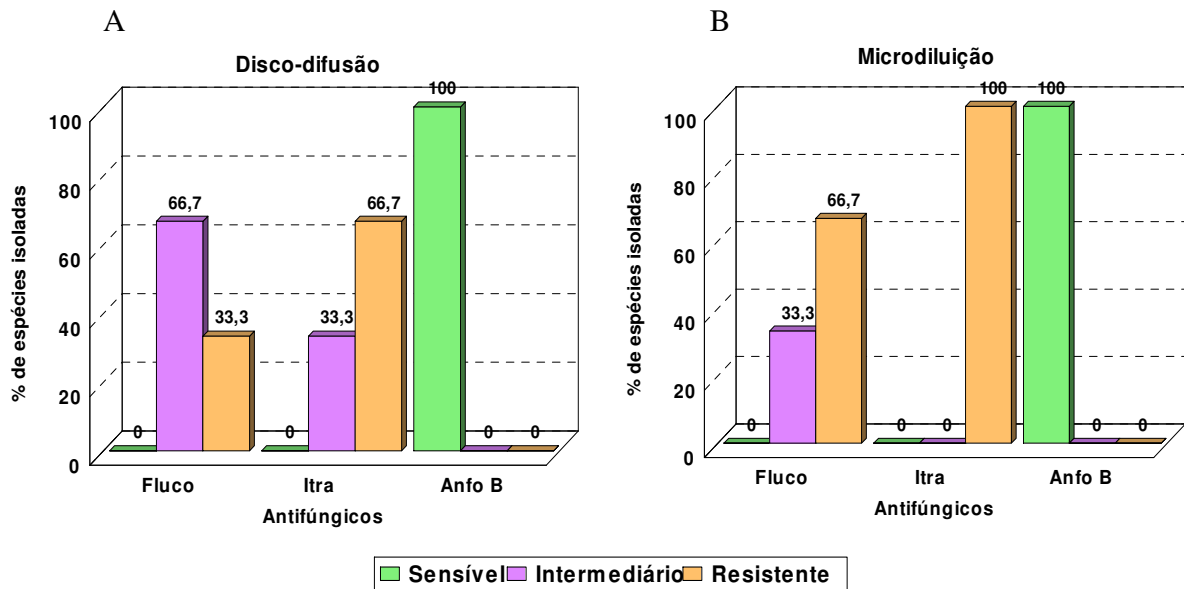


Figura 6. Distribuição da frequência de suscetibilidade antifúngica da *C. glabrata* frente à fluconazol (Fluco), itraconazol (Itra) e anfotericina B (Anfo B), por difusão em disco (A) e microdiluição (B), em mulheres assintomáticas.

4.6 Análise de concordância entre os métodos de Disco Difusão e Microdiluição –grupo geral (N=87)

A comparação entre a suscetibilidade antifúngica obtida pelos dois métodos, frente ao fluconazol mostrou concordância inadequada (índice de Capa= -0,04). Nesse sentido, o teste de microdiluição não confirmou os perfis de sensibilidade dose dependente e

resistência, obtidos pelo primeiro método. Já em relação ao itraconazol, houve uma concordância muito leve (Capa= 0,17), uma vez que, 47 isolados (54%) confirmaram os perfis de suscetibilidade.

4.7 Tratamento

Os dados clínicos obtidos entre as participantes do estudo mostraram que (74%/90) das mulheres sintomáticas e (26%/26) entre as assintomáticas tinham tratamento anterior para CVV com fluconazol e itraconazol, com média de duração de 7 dias ($p < 0,05$).

4.8 Distribuição das espécies produtoras de proteinase aspártica extracelular e fosfolipase

Para todos os isolados clínicos de *Candida sp.* estudou-se a produção de dois fatores de virulência: proteinase e fosfolipase, comumente associados à patogenicidade, cujos resultados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Distribuição da frequência das leveduras segundo produção de proteinase e fosfolipase, entre mulheres sintomáticas (S) e assintomáticas (A).

Espécie	Número de isolados	% de isolados		
		Proteinase	Fosfolipase	Proteinase e fosfolipase

		S	A	S	A	S	A
<i>C. albicans</i>	72	66,7	9,7	37,5	4,2	33,3	4,2
<i>C. glabrata</i>	6	0	16,7	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	3	100	100	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	2	100	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula rubra</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>Candida sp.</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>C. guilliermondii</i>	1	0	0	0	0	0	0

4.9 Fator de virulência *versus* clínica

De acordo com o teste qui-quadrado de Pearson não houve evidência de associação entre a condição clínica, sintomática ou não, com produção de fosfolipase ($p= 0,123$). No entanto, frente à proteinase houve associação positiva ($p= 0,025$), uma vez que, as cepas isoladas das mulheres sintomáticas, foram mais produtoras desse fator de virulência (gráfico 1).

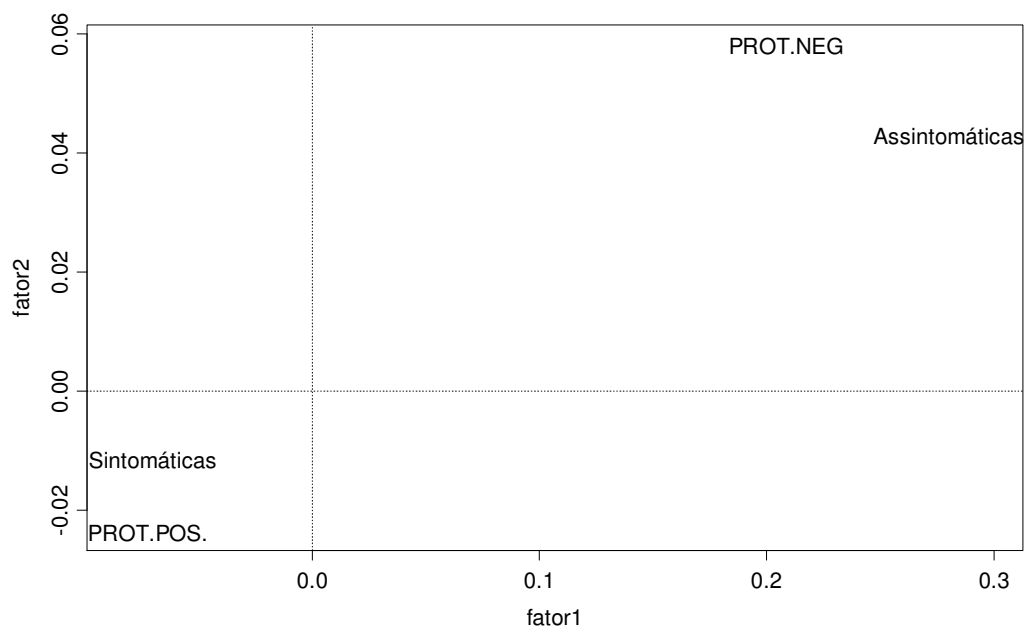


Gráfico 1. Associação entre produção do fator de virulência proteinase com a clínica (p= 0,025).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Infecções por *Candida sp* em superfícies mucosas são comuns, debilitantes e freqüentemente recorrentes. Aproximadamente 3/4 de mulheres saudáveis em idade fértil sofrem de candidíase vaginal com significativa morbidade física e psicológica (BOATTO et al., 2007). De fato, na presente análise, foi possível identificar *Candida sp* em 31% de mulheres infectadas e em 8% de mulheres colonizadas. A possível explicação para esses índices é que neste estudo, a amostragem não é populacional e sim proveniente de ambulatório de ginecologia, isto é, demanda espontânea. Esse estudo caracterizou-se como primeiro inquérito na região do noroeste paulista.

Considera-se que a colonização da mucosa vaginal por leveduras é dependente dos níveis de glicose na vagina, os quais estão sujeitos à variação cíclica causada por influência de esteróides sexuais. A sua presença na mucosa, portanto, pode predispor ao desenvolvimento de CVV (DAN et al., 2003). Uma vez que, a população estudada caracterizou-se como constituída por mulheres adultas (30 a 37 anos) e que, em tais grupos, as taxas de hormônios sexuais estão normalmente elevadas, é possível explicar os elevados índices de colonização ou infecção pelo fungo.

Cerca de 80% de todas as leveduras identificadas na mucosa vaginal são *C. albicans*. De fato, *C. albicans* esteve amplamente distribuída na população estudada, ora como comensal (67%) ou como patógeno (87%). Uma provável justificativa para tal fato, seria a colonização da mucosa por esta espécie, que, freqüentemente, está locada ou no trato gastrintestinal, ou na via sexual, de onde, a partir dessa fonte endógena, disseminaria (MENDLING et al., 2000).

Recentemente, as espécies de *Candida* não-*albicans* vêm mudando este panorama clínico, apresentando-se como patógeno, especialmente pela seleção de espécies mais resistentes (NYIRJESY et al., 1995). A porcentagem de ocorrência por espécies não *albicans* foi expressiva, 13% ao grupo sintomático e 33% ao assintomático. Corroborando com o presente dado, os experimentos de Nyirjesy et al., 1995 e Spinillo et al., 1997 reportam a ocorrência destas espécies entre 9,9% a 32% dos casos de vulvovaginite. As espécies de *Candida* não-*albicans* encontradas, aqui, foram *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi* e *C. parapsilosis*, dado concordante com outros estudos, que as identificam, na última década, como espécies emergentes responsáveis por CVV (RYLANDER et al., 2004; NETO; HAMDAN; SOUZA, 1999). Outro dado interessante é que espécies não *albicans* vêm ocorrendo em mulheres adultas, sem sintomatologia, descrito pela literatura em cerca de 44% dos casos (HOLANDA et al., 2007). Considerando-se a presente investigação, os dados foram concordantes com o exposto acima.

O aumento da acidez vaginal é influenciado por diversos fatores, dentre estes, a adoção de anticoncepcionais hormonais orais, pois, especialmente em estado hiperestrogênico, cria condição favorável para o desenvolvimento do fungo (DAN et al., 2003). De fato, no presente experimento houve significado estatístico tanto para as

mulheres sintomáticas como as assintomáticas, que utilizavam tal método ($p < 0,05$) e que portavam o fungo.

As formas recorrentes se definem como quatro ou mais infecções sintomáticas ao ano, ou quando se tem três episódios não relacionados com antibioticoterapia prévia no último ano (FIDEL, 2006). Nesse sentido, segundo dado da literatura, das mulheres acometidas com CVV, 10 a 40% tornam-se recorrentes (FERRER, 2000). Na presente proposta, índices maiores foram detectados aliados ao do grupo assintomático (42%) e sintomático (84,2%). O significado de *Candida sp.* na vagina de mulheres assintomáticas, entre episódios de recorrência, não está claro. Entretanto, o achado desses microrganismos, durante períodos livres de sintomas, poderia indicar a um tratamento prévio inadequado, uso insuficiente de antifúngicos, a resistência do fungo aos fármacos para completar a erradicação ou a recolonização. Entre 10 a 33% dos casos de recorrência, descritos na literatura, a etiologia é caracterizada por espécies não *albicans*, como *C. glabrata* (mais frequente), seguida de *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Saccharomyces cerevisiae*, dados equivalentes aos encontrados nesse estudo (SPINILLO et al., 1997; PATEL et al., 2005).

O ciclo menstrual é qualificado como regular quando da sua ocorrência entre 25 e 35 dias. Essa regularidade, considerando o intervalo de análise dos últimos 6 meses, foi detectada em 88% das mulheres sintomáticas e 87% das assintomáticas, ($p = 0,878$). Embora não haja consenso, no que tange aos fatores de risco para a CVV, a presença de ciclos menstruais regulares tem sido identificada como relevante, uma vez que a acidez, subsequente aos picos hormonais de FSH, LH, estradiol e progesterona, determinantes da ovulação e formação do corpo lúteo poderia contribuir para invasão tecidual do fungo (SPINILLO et al., 1997).

Diversos sintomas estão presentes na maioria das mulheres com CVV, destacando-se prurido, dispareunia e corrimento, com índices entre 82% a 94% (GARCIA et al., 2006; BOATTO et al., 2007), e modernamente associados à espécie *C. albicans* (FERRER, 2000). Comparando os resultados aqui obtidos com os dados da literatura, as mesmas queixas clínicas incidiram nas participantes do grupo sintomático, porém, com índices menores: 41,7%, 17,4% e 55,6%, respectivamente. Entretanto, disúria e hiperemia vaginal ocorreram em altos índices. De fato, os dois sintomas corrimento e prurido podem estar associados a outros fatores, desde microbianos, imunológicos e fisiológicos (MENDLING et al., 2000).

No estudo de Holanda et al, 2007 há um relato sobre a concomitância entre práticas sexuais, considerando-se como fator de risco para o estabelecimento da infecção fúngica, dado também encontrado nessa investigação. De fato, os resultados da presente proposta mostraram uma associação significativa entre sexo orogenital e infecção por *Candida*, dados suportados por estudo prévio (PATEL et al., 2005). Uma explicação para tal fato deve ser a transmissão por contato, além de que 1/3 da população adulta pode conter *C. albicans* oral e como consequência outras espécies (REED et al., 2000). Ainda, a ação da saliva pode promover o crescimento de *Candida* por irritação da mucosa vaginal ou mudança do estado imunológico local.

Considerando-se os raros casos de fenótipo resistente encontrados para espécie *C. albicans* no grupo sintomático, é possível correlacionar com uso prévio de terapêutica antifúngica, uma vez que, em 74% das pacientes, os derivados azólicos foram adotados. Corroborando com a literatura (RIBEIRO et al., 2000), a adoção de terapêutica prévia, pode ter levado à seleção de cepas resistentes e até emergência de espécies de *Candida* não

albicans. Entretanto, conforme esperado, esse perfil não pode ser encontrado nas cepas do grupo assintomático.

O teste de difusão em disco tem se mostrado eficaz para detecção de isolados suscetíveis, mas não nos resistentes, intermediários ou dose-dependentes. De fato, o perfil de suscetibilidade frente aos antifúngicos, encontrado pelo método de disco-difusão, chama a atenção, devido aos índices de resistência elevados ao fluconazol (27,6%) e ao Itraconazol (24,1%). Estes valores estariam discordantes em relação à literatura (REED et al., 2000) caso não tivesse sido adotado um segundo teste confirmatório, o padrão ouro. A utilização do método de difusão em disco, por ser factível para maioria dos serviços de microbiologia, pode ser considerada opção diagnóstica e triagem.

No presente estudo os dados demonstraram que não houve uma concordância significativa dos resultados apresentados para os dois métodos de verificação da suscetibilidade das cepas, frente aos antifúngicos azólicos. De fato quando se consideram drogas fungistáticas (fluconazol, itraconazol e cetoconazol), mas não fungicida (anfotericina B) o padrão de interpretação visual se torna difícil e exige alto treinamento técnico. Outros estudos, que também avaliaram a concordância entre os dois métodos, microdiluição e disco-difusão, encontraram correspondência estatística maior (mais de 80%) que a aqui verificada, e este dado pode ter ocorrido por um espaço amostral mais amplo (RIBEIRO et al., 2000).

Atributos que contribuem para virulência de *C. albicans* incluem adesão, formação de hidas e produção de enzimas hidrolíticas extracelulares (MONOD; BORG VON; 2002). De fato, em relação às enzimas, aqui, *C. albicans* produziram fosfolipase e proteinase e a detecção desses tipos de enzimas, comprovam a alta patogenicidade dessa espécie, especialmente nas de origem do grupo sintomático.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÃO

Este estudo fornece dados geográficos para candidíase vulvovaginal.

A colonização e infecção da mucosa vaginal por levedura é fato, com diversas espécies de *Candida* presentes neste sítio anatômico.

C. albicans se destaca como mais virulenta, espécie prevalente em mucosa vaginal de mulheres adultas e apresenta diversidade de resposta a antifúngicos.

Fica evidente a emergência de espécies de *Candida* não-*albicans*, tais como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e *C. guilliermondii*, colonizando ou infectando a mucosa.

Os sintomas mais freqüentes relacionados à CVV são pruridos, dispareunia, corrimento, disúria e hiperemia vaginal.

A adoção de anticoncepcionais orais que influencia a acidez vaginal é considerada como agente predisponente para vulvovaginite, além da prática sexual oral.

Episódios de recorrência podem estar relacionados à presença de *C. albicans* e *Candida* não *albicans*.

Os fatores de virulência proteinase e fosfolipase, estiveram associados, principalmente a *C. albicans*, o que comprova a alta patogenicidade dessa espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Detecção e identificação dos fungos de importância médica: módulo VII.** Brasília: ANVISA; 2005.

AKPAN, A.; MORGAN, R.. Oral candidiasis. **Post. Grad. Med. J.**, Wirral, v. 78, n. 922, p. 455-459, 2002.

AKERELE, J.; ABHULIMEN, P.; OKONOFUA, F. Prevalence of asymptomatic genital infection among pregnant women in Benin City, Nigéria. **African Journal of Reproductive Health**, Nigéria; v. 6, n. 3, p. 93-97, 2002.

ANYON, C. P.; DESMOND, F. B.; EASTCOTT, D. F. A study of Candida in one thousand and seven women. **New Zealand Medical Journal**, New Zealand; v. 73, n. 1, p. 9-13, 1971.

ARECHAVALA, A. I. et al. Identification and susceptibility against fluconazole and albiconazole of 100 yeasts strains isolated from vaginal discharge. **Revista Iberoamericana de Micología**, Buenos Aires, v. 24, n. 4, p. 305-308, 2007.

BARTOLOMEO, S. et al. Prevalencia de microorganismos asociados a secreción genital femenina. **Revista Saúde Pública**, São Paulo; v. 36, n. 5, p. 545-552, oct. 2002.

BILLE, J. GLAUSER, M. P. The fluconazole global susceptibility study group – evaluation of pathogenic *Candida* sp. To fluconazole. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Lausanne, v. 16, n. 12, p. 924-928, Dec. 1997.

BOATTO, H.F. et al. 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 de Ginecologia e Obstetrícia**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 80-84, 2007.

BUSCEMI, L.; ARECHAVALA, A.; NEGRONI, R. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, com especial referencia a la candidiasis, em pacientes del Hospital de Infecciosas Francisco J. Muñiz. **Revista Iberoamericana de Micología**, Buenos Aires, v. 21, p. 177-181, nov. 2004.

CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C. Enzymotyping of species of the genus *Candida* isolated from the oral cavity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 5, p. 437-442, 2000.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 3, p. 332-337, may/june 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 599-607, set/out 2003.

CORDEIRO, S. N. Vulvovaginites recorrentes: uma doença psicossomática? **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Campinas; v. 16, n. 1, p. 45-51, 2004.

CREPALDI, P. F. et al. Estrógenos, progesterona e colesterol como fatores de crescimento in vitro para *C. albicans* e *C. não albicans*. **Infarma**, Bauru, v. 16, n. 6, p. 5-6, 2004.

CROCCO, E. I. et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, p. 689-697, nov/dez 2004.

DAN, M. et al. Vaginitis in a gynecologic practice in a gynecologic practice in Israel: causes and risk factors. **Isr Med Assoc J**, v. 5, n. 9, p. 629-632, 2003.

DAR-ODEH, N. S.; SHEHABI, A. Oral candidosis in patientes with removable dentures. **Mycoses**, Amman; v. 46, n. 6, p. 187-191, June 2002.

DOSTAL, J.; HAMAL, P.; PAVLICKOVA, L.; et al. Simple method for screening *Candida* sp isolates for the presence of secreted aspartil proteases: a tool for the prediction of success of inhibitory treatment. **Journal Clinical and Microbiology**, Richmond, v. 41, n. 2, p. 712-716, Febr. 2003.

EDWARDS, L. The diagnosis and treatment of infectious vaginitis. **Dermatol Ther**, v. 17, p. 102-110, 2004.

ERDEM, A. et al. Identification of yeasts in public hospital primary care patients with or without clinical vaginitis. **Aust NZJ Obstet Gynaecol**, v. 43, p. 312-316, 2003.

EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. EUCAST. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Munich, 2002.

FERRAZA, M. H. S. H. et al. 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**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.

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

FIDEL, P. L. History and update on host defense against vaginal candidiasis. **American Journal Reproductive and Immunology**, v. 57, p. 2-12, 2006.

FIDEL, P. L.; SOBEL, J. D. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, Michigan, v. 9, n. 3, p. 335-348, July 1996.

FORREST, G. N.; WEEKES, E.; HOHNSON, J. K. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. **Journal of Infection**, v. 56, n. 2, p. 126-129, 2007.

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

GARCIA, H. M. et al. Prevalence of vaginal candidiasis in pregnant women. Identification of yeast and susceptibility antifungal agents. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 38, p. 9-12, mar. 2006.

GHANNOUM, M.; ABU-ELTUN, K. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, Amman, v. 33, n. 6, p. 265-282, 1990.

GIRALDO, P. et al. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history or recurrent vulvovaginal candidiasis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 95, p. 413-416, 2000.

HAINSWORTH, T. Diagnosis and management of candidiasis vaginitis. **Nursing Times**, v. 98, p. 30-32, 2002.

HOLANDA, A. A. R. et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Ver Brás Ginecol Obstet**, v. 29, n. 1, p. 3-9, 2007.

HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl aspartil proteases. **Current Topics in Medical Mycology**, v. 1, p. 55-69, 1996.

KALO-KLEIN, A.; WITKIN, S. S. *Candida albicans*: cellular immune system interactions during different stages of the menstrual cycle. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.161, p. 1132-1136, 1989.

KINSMAN, O. S.; COLLARD, A. E. Hormonal factors in vaginal candidiasis in rats. **Infect. Immun.**, v. 53, p. 498-504, 1986.

LACAZ, C. S.; PEHINATI, A. H. Ecologia das leveduras do gênero *Candida*. São Paulo: [EPU, EDUSP]. **Candidíases**, 1980.

LARONE, D. H. Medically important fungi. **A guide to identification**. AMS Press, Washington, 1995.

LARSEN, B.; GALASK, R. P. Influence of estrogen and normal flora on vaginal candidiasis in the rat. **The Journal of Reproductive Medicine**, v. 29, p. 863-868, 1984.

LEON, E. M. et al. Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type I and type 2 diabetes. **BMC Infectious Diseases**, v. 2, p. 12-25, 2002.

LYNCH, M. E.; SOBEL, J. D. Comparative in vitro activity of antimycotic agents against pathogenic vaginal yeast isolates. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, p. 267-274, 2003.

MACNEILL, C.; CAREY, J. C. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **The Journal of the American Medical Association**, v. 1, p. 31-35, 2001.

MCCORMACK, W. M.; ZINNER, S. H. The incidence of genitourinary infections in a cohort of healthy women. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 21, p. 63-64, 1994.

MCMULLAN-VOGEL, C. G.; JUDE, H. D.; OLLERT, M. W. Serotype distribution and secretory aspartil protease activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 14, p. 183-189, 1999.

MEDRANOEDRANO, D. J. A. et al. Candidemia in a brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 17-20, 2006.

MEIS, J. et al. A global evaluation of the sustibility of *Candida* sp. To fluconazole by disk diffusion: Diagni. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 215-223, 2000.

MILES, M. R.; OLSENS, L.; ROGERS, A. Recurrent vaginal candidiasis. Importance of in intestinal reservoir. **The Journal of the American Medical Association**, v. 238, p. 1937, 1977.

MENDLING, W. et al. Strain specificity of yeasts isolated from different locations of women suffering from vaginal candidosis, and their partners. **Mycoses**, n. 43, v. 11, p. 387-92, 2000.

MONOD, M., BORG-VON, Z. M. Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. **Chem Immunol**, v. 81, p. 114-28, 2002.

MORAES, P. S. A. Recurrent vaginal candidiasis and allergic rhinitis: a common association. **European Journal of Allergy and clinical Immunology**, v. 81, p. 412-416, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. M27-A2: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. Pennsylvania, 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. M44P: Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast. Pennsylvania, 2003.

NETO, A. A.; HAMDAN, J. S.; SOUZA, R. C. Prevalência de Cândida na Flora Vaginal de Mulheres Atendidas num Serviço de Planejamento Familiar. **Rev. Brás. Ginecol. Obstet.**, v. 21, n. 8, p.441-445, 1999.

NEVES, N. A. et al. Association between atopy and recurrent vaginal candidiasis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 142, p. 167-171, 2005.

NYIRJESY, P. et al. Chronic fungal vaginitis: the value of cultures. **Am J Obstet Gynecol**, v.173, p. 820-823, 1995.

NYIRJESY, P. Chric vulvovaginal candidiasis. **Americam Family Physician**, Philadélfia; v. 63, n. 4, feb. 2001.

OKUNGBOWA, F. I.; ISISKHUEMHEN, O. S.; DEDE, A. P. O. The distribution frequency of Candida species in the genitourinary tract among symptomatic individuals in Nigerian cities. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 20, p. 60-63, 2003.

OWEN, M. K.; CLENNEY, T. L. Management of vaginitis. **Am Fam Physician**, v. 70, p. 2125-2132, 2003.

PATEL, B. et al. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: Results of a prospective cohort study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 190, n. 3, p. 644-53, 2005.

PFALLER, M. A. et al. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5729-5731, 2003.

PINTO, P. M. et al. In vitro antifungal susceptibility of clinical isolates of *Candida* sp: obtained from patients with different predisposing factors to candidosis. **Microbiological research**, Belo-Horizonte; Sep. 2006.

PRICE, M. F.; WILKISON, I. D.; GENTRY, I. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Saboraudia**, v. 20, p. 15-20, 1982.

REED, B. D. et al. Sexual Behaviors and Other Risk Factors for *Candida* Vulvovaginitis. **Journal of Women's Health & Gender-Based Medicine**, v. 9, n. 6, p. 645-55, 2000.

RIBEIRO, M. A. et al. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. **Mycopathologia**, n. 151, p. 5-10, 2000.

RIVERO, M.; DIAZ, J.; CENTENO, S. Frecuencia de especies de *Candida* aisladas en pacientes embarazadas con vulvovaginitis. **Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología**, Caracas, v. 23, n. 2, p. 121-127, jul. 2003.

ROSA, M. I.; RUMEL, D. Factores asociados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. **Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, p. 65-70, 2004.

RÜCHEL, R. et al. Candida acid proteinases. **Medical Micology**. v. 30, p. 123-132, 1992.

RYLANDER, E. et al. Vulvovaginal candida in a young sexually active population: prevalence and association with oro-genital sex and frequent poin at intercourse. **Sex Transm Infect.**, v. 80, n. 1, p. 54-7, 2004.

SAMARANAYAKE, L. P. et al. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida sp* *in vitro*. **Sabouraudia**, v. 22, p. 201-207, 1984.

SCHECHTER, M.; RACHID, M. **Manual de HIV/AIDS**. Revinter, Rio de Janeiro, 2004.

SHERWOOD, J. et al. Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, p. 461-469, 1992.

SHIMIZU, M. T. et al. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, aspartil protease and phospholipase secreted by *Candida sp*. **Mycoses**, Amman, v. 39, p. 161-167, 1996.

SHIMIZU, M. T. et al. Hyaluronidase and chondroitin sulphatase production by different species of Candida. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 33, p. 27-31, 1995.

SHIMP, L. A. Vaginal and vulvovaginal disorders. **American Pharmaceutical Association**, 13. ed, p. 129-147, 2002.

SINGH, S. et al. Vaginitis due to Candida krusei: epidemiology, clinical aspects, and therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 1066-1070, 2002.

SOBEL, J. D.; CHAIN, W. Treatment of *Candida glabrata* vaginitis: retrospective review of boric acid therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 649-652, 1997.

SOBEL, J. D. et al. Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 876-883, 2004.

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

SPINILLO, A. et al. The relationship of bacterial vaginosis, candida and trichomonas infection to symptomatic vaginitis in postmenopausal women attending a vaginitis clinic. **Maturitas**, v. 27, p. 253-260, 1997.

THIELE, M. C. M. **Estomatite protética**: estudo dos fatores predisponentes, graus de colonização por *Candida* sp. E fatores de virulência fúngica. 2005 Dissertação (Programa de Mestrado em Odontologia) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Curitiba, 51f.

VENTOLINI, G. M. D.; BAGGISH, M. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 28, p. 93-95, 2006.

WANDERLEY, M. S. et al. Avaliação clínica e laboratorial de crianças e adolescentes com queixas vulvovaginais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 22, p. 147-152, 2000.

WEBB, B. C. et al. *Candida* associated denture stomatitis. A etiology and management: a review. **Australian Dental Journal**, v. 43, p. 45-50, 1998.

WILLIANSO, M. I.; SAMARANAYAKE, L. P.; MAC FARLANE, T. W. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida*. **Journal Medical and Veterinary Mycology**, v. 24, p. 415-417, 1986.

WITKIN, S. S. Immunologic factors influencing susceptibility to recurrent candidas vaginitis. **Clinical Obstetrics Gynecology**, v. 34, p. 662-666, 1991.

XU, J. et al. Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Clinical Microbiology reviews**, v. 38, 1214-1220, 2000.

YANAMOTO, T. et al. Purification, and characterization of secretory aspartil protease of *Candida albicans*. **Microbiology and Immunology**, v. 36, p. 637-664, 1992.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. **News Lab**, v. 63, p. 136-146, 2004.

ANEXOS
