

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GABRYELLE BARBOSA CORDEIRO DE LIMA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS
ANTIFÚNGICOS EM ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS DE SECREÇÃO
VAGINAL**

**Maceió
2012**

GABRYELLE BARBOSA CORDEIRO DE LIMA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS
ANTIFÚNGICOS EM ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS DE SECREÇÃO
VAGINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva
Filho

**Maceió
2012**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

- L732v Lima, Gabryelle Barbosa Cordeiro de.
 Variabilidade genética e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos em
 espécies de *Candida* isoladas de secreção vaginal / Gabryelle Barbosa Cordeiro
 de Lima. – 2012.
 106 f. : il., tab. , graf.
- Orientador: Eurípedes Alves da Silva Filho.
 Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de
 Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2012.
- Bibliografia: f. 88-98.
 Apêndices e anexos: f. 99-106.
1. Candida. 2. Sensibilidade antifúngica. 3. Reação em cadeia da
 polimerase (PCR). 4. Caracterização genética. I. Título.

CDU: 616.98:618



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Praça Afrânio Jorge, s/n. Prado
CEP 57.010-020. Maceió-AL
(82) 3223-5613; 3336-0757
e-mail: pgcs@propep.ufal.br

Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Gabryelle Barbosa Cordeiro de Lima, intitulada: "Variabilidade genética e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos em espécies de *Candida* isoladas de secreção vaginal", orientada pelo Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 10 de abril de 2012.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata APROVADA.

Banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Rejane Pereira Neves – (UFPE)

Prof. Dr. Dalmo Almeida de Azevedo - (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Maria Anilda dos Santos Araújo – (UFAL)

OFEREÇO

A minha família, especialmente as minhas irmãs, Emanuelle e Luciana, pelo incentivo, carinho, admiração e amor fornecido durante esta caminhada.

DEDICO

*Aos meus pais, Madalena e Gilson pelo alicerce de vida e amor incondicional.
E ao meu noivo Antonio, por todo amor, incentivo e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar, proteger e ensinar os caminhos da vida, pois sem a sua presença não teria forças para continuar;

À Universidade Federal de Alagoas, através do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade de cursar este Mestrado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concepção de apoio financeiro durante a realização da pesquisa;

Ao meu orientador Professor Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho, pela oportunidade de cursar o mestrado, atenção e ensinamentos fornecidos a mim;

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na pessoa do Professor Dr. Emiliano Barreto, pelos esforços em aprimorar o curso;

Ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelos ensinamentos e incentivos recebidos;

À Professora Dra. Maria Anilda dos Santos Araújo pelos ensinamentos fornecidos sobre micologia na minha graduação e por sempre está disposta a ajudar;

Aos Professores Dalmo Azevedo e Élica Amara Cecília Guedes pela disposição e ajuda em momentos de angústia;

Às profissionais dos laboratórios praticantes da pesquisa, Flávia Soares, Sônia Marinho, Mônica Meire e Ana Raquel Vasconcelos, pela disponibilidade das amostras.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do ano de 2010, pelas divertidas aulas e amizades construídas.

Aos colegas Moésio Vasconcelos, José Alfredo Junior, Delma Holanda e Lais Flávia pelos momentos de incentivo e descontração.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Microbiologia Aplicada BIOGEN, Elaine Silva, Rosana Kely, Silmara Almeida, Erika Rosendo e Marcos Antônio que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

À colega Luana Luzia por compartilhar sua experiência de vida, passar seus conhecimentos e ajudar nos momentos necessários.

À colega Larissa Oliveira pelo incentivo e por disponibilizar seu tempo em me ajudar nos últimos momentos da pesquisa.

Muito obrigada!

*" Bom mesmo é ir a luta com determinação,
abraçar a vida com paixão, perder com classe e
vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a
quem se atreve." (Charles Chaplin)*

RESUMO

As espécies de *Candida* têm emergido como a segunda causa mais comum de vulvovaginites no mundo, produzindo infecções, que podem causar sintomas indesejáveis como, prurido, corrimento, dispareunia e ardor. O objetivo desse estudo foi avaliar a variabilidade genética e o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos em leveduras do gênero *Candida* isoladas de secreção vaginal de pacientes de Maceió – Alagoas. As amostras foram coletadas no setor de microbiologia clínica de cinco laboratórios localizados na cidade de Maceió, entre Março e Dezembro de 2010. Para cada isolado foi realizada uma purificação por meio de semeio de uma suspensão da levedura em meio YPD sólido. A extração do DNA foi realizada pelo método do fenol/clorofórmio e a identificação por PCR com iniciadores espécie-específicos para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. As pacientes com candidíase vulvovaginal foram avaliadas quanto à presença de sintomas e fatores de risco para aquisição da doença. Os padrões de sensibilidade ao cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B foram avaliados de acordo com as normas do CLSI (M27-A2). Na tipagem molecular foi utilizado o microsatélite (GTG)₅ e os fragmentos separados em gel de agarose 1,5 % a 75 volts/cm por 120 minutos, corados com brometo de etideo e visualizados em sistema fotodocumentação. Os padrões de bandas obtidos foram analisados pelo *software* BioNumerics 6.5 para obtenção de eletroferograma utilizando o coeficiente de similaridade Jacard. Foram obtidos 296 isolados de leveduras do gênero *Candida*, sendo *C. albicans* (82,45%) a espécie mais frequente, seguida de *C. glabrata* com 7,75%, *C. parapsilosis* com 4,05%, *C. tropicalis* com 3,75% e *C. krusei* com 2%. Esses isolados exibiram perfil de resistência de 66,7% para anfotericina B, 52,6% para fluconazol, 89,7% para itraconazol e 21,3% para cetoconazol. Entre os fatores de risco para aquisição da doença destaca-se gravidez com 24,66% e histórico prévio de CVV em 15,54%. O principal sinal clínico apresentado foi corrimento em 77,13% dos casos. As espécies analisadas apresentaram elevada diversidade para o marcador genético (GTG)₅, com valores que variaram de 0,7470 a 0,9963, o que possibilitou a formação de 172 padrões genéticos para *C. albicans*, 10 para *C. tropicalis*, 11 para *C. parapsilosis*, 8 para *C. glabrata* e 4 para *C. krusei*. O aparecimento de espécies de *Candida* com perfil de resistência ao itraconazol, anfotericina B, fluconazol e cetoconazol, fornece dados epidemiológicos para região estudada e reforça a importância da identificação das leveduras em nível de espécie e da realização de testes de sensibilidade antifúngica *in vitro*.

Palavras-chave: *Candida*; Susceptibilidade aos Antifúngicos; PCR; Caracterização Genética; (GTG)₅.

ABSTRACT

Candida species have emerged as the second most common cause of vulvovaginitis in the world, producing infections that can cause unwanted symptoms such as itching, discharge, dyspareunia and burning. The objective of this study was to evaluate the genetic variability and the antifungal susceptibility profile of *Candida* yeasts isolated from vaginal secretions of patients Maceió - Alagoas. The yeasts were collected weekly in the sector of five clinical microbiology laboratories located in the city of Maceió between March and December 2010. For each isolate was performed through a purification of seeding a suspension of yeast in YPD solid medium. DNA extraction was performed by phenol / chloroform and identification by PCR with primers species specific for *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*. The patients with vaginal candidiasis were evaluated for the presence of symptoms and risk factors for acquiring the disease. The patterns of sensitivity to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B were evaluated according to CLSI standards (M27-A2). Molecular typing was used in the microsatellite (GTG)₅ and the fragments separated on 1.5% agarose gel at 75 volts / cm for 120 minutes, stained with ethidium bromide and viewed on photodocumentation system. Banding patterns were analyzed by BioNumerics 6.5 software to obtain electropherogram using the similarity coefficient Jaccard. We obtained 296 isolates of *Candida* yeasts, and *C. albicans* (82.45%) the most frequent species, followed by *C. glabrata* with 7.75%, *C. parapsilosis* with 4.05%, *C. tropicalis* with 3.75% and *C. krusei* 2%. These isolates exhibited resistance profile of 66,7% for amphotericin B, fluconazole for 52,6%, 89,7% for itraconazole and to ketoconazole 21,3%. Among the risk factors for acquiring the disease stands out pregnancy with 24.66% and history of VVC in 15.52%. The main clinical sign was presented discharge in 77,13% of cases. The species analyzed showed a high diversity for the genetic marker (GTG)₅, with values ranging from 0.7470 to 0.9963, which allowed the formation of genetic patterns 172 for *C. albicans*, 10 for *C. tropicalis*, 11 for *C. parapsilosis*, 8 for *C. glabrata* and 4 for *C. krusei*. The incidence of *Candida* species with a profile of resistance to itraconazole, amphotericin B, fluconazole and ketoconazole, provides epidemiological data for the study area and reinforces the importance of identifying yeasts to the species level and testing of *in vitro* antifungal susceptibility.

Keywords: *Candida*; Antifungal Susceptibility; PCR; Genetic Characterization; (GTG)₅.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais marcos no desenvolvimento dos antifúngicos.....	35
Figura 2	Estrutura química da anfotericina B	37
Figura 3	Mecanismo de ação dos polienos	38
Figura 4	Estrutura química dos imidazóis (a) e triazóis (b).....	39
Figura 5	Mecanismo de ação dos derivados imidazólicos.....	40
Figura 6	Estrutura química do Cetoconazol	41
Figura 7	Estrutura química do Itraconazol.....	41
Figura 8	Estrutura química do Fluconazol	42
Figura 9	Esquema para as diluições de antifúngicos insolúveis em água.....	54
Figura 10	Esquema para as diluições de antifúngicos solúveis em água.....	55
Figura 11	Inoculação das placas de microdiluição pela metodologia do CLSI	56
Figura 12	Leitura das placas de microdiluição pela metodologia do CLSI com solução aquosa TTC	58
Figura 13	Gel de agarose a 1,0 % com produtos da amplificação obtidos pela PCR de leveduras de secreção vaginal e cepas padrão	59
Figura 14	Distribuição da frequência das espécies de <i>Candida</i> isoladas da secreção vaginal durante Março a Dezembro de 2010	60
Figura 15	Dendrograma dos perfis de amplificação com o iniciador (GTG) ₅ em isolados de <i>Candida krusei</i> , construído utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard e método de agrupamento UPGMA.....	66
Figura 16	Dendrograma dos perfis de amplificação com o iniciador (GTG) ₅ em isolados de <i>Candida glabrata</i> , construído utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard e método de agrupamento UPGMA.....	68
Figura 17	Dendrograma dos perfis de amplificação com o iniciador (GTG) ₅ em isolados de <i>Candida parapsilosis</i> , construído utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard e método de agrupamento UPGMA.....	69
Figura 18	Dendrograma dos perfis de amplificação com o iniciador (GTG) ₅ em isolados de <i>Candida tropicalis</i> , construído utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard e método de agrupamento UPGMA.....	71

Figura 19 Dendrograma dos perfis de amplificação com o iniciador (GTG)₅ em isolados de *Candida.albicans*, construído utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard e método de agrupamento UPGMA..... 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição da frequência de casos sintomáticos e assintomáticos em pacientes com candidíase vulvovaginal por espécies de <i>Candida</i> durante Março a Dezembro de 2010.....	61
Tabela 2	Distribuição das manifestações clínicas em pacientes com candidíase vulvovaginal por espécies de <i>Candida</i> durante Março a Dezembro de 2010.....	61
Tabela 3	Distribuição das faixas etárias de pacientes com candidíase vulvovaginal por espécies de <i>Candida</i> durante Março a Dezembro de 2010	62
Tabela 4	Distribuição dos fatores de risco nas 296 pacientes com candidíase vulvovaginal por espécies de <i>Candida</i> durante Março a Dezembro de 2010	63
Tabela 5	Intervalo de concentração inibitória mínima, valores de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ e percentual de susceptibilidade para anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e fluconazol estratificados por espécies fúngicas segundo a metodologia de microdiluição em caldo do CLSI	65
Tabela 6	Distribuição dos padrões e perfil de resistência aos antifúngicos testados nos isolados de <i>Candida krusei</i>	67
Tabela 7	Distribuição dos padrões genéticos e perfil de resistência aos antifúngicos testados nos isolados de <i>Candida glabrata</i>	69
Tabela 8	Distribuição dos padrões genéticos e perfil de resistência aos antifúngicos testados nos isolados de <i>Candida parapsilosis</i>	70
Tabela 9	Distribuição dos padrões genéticos e perfil de resistência aos antifúngicos testados nos isolados de <i>Candida tropicalis</i>	72
Tabela 10	Distribuição dos padrões genéticos e perfil de resistência aos antifúngicos testados nos isolados de <i>Candida albicans</i>	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sequência de iniciadores espécie-específicos, tamanho dos fragmentos e número de acesso em bancos genéticos para detecção das espécies de <i>Candida</i>	49
Quadro 2	Protocolo da reação de amplificação com os iniciadores espécie-específicos para CALB, CGL, CPA, CTR e CKRU	49
Quadro 3	Protocolo de reação de amplificação com o marcador microssatélite (GTG) ₅	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BIOGEN	Laboratório de Genética e Microbiologia Aplicada
BSA	Albumina sérica bovina
CC	Controle de crescimento
CE	Controle de esterilidade
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CN	Controle negativo
CVV	Candidíase Vulvovaginal
DNA	Acido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
R	Resistente
rDNA	DNA ribossomal
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> 1640
RLFP	<i>Restriction Length Fragment Polymorphism</i>
SSRs	Sequências simples repetidas
S	Sensível
SDD	Sensível dose dependente
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TE	Tris-HCl EDTA
TTC	Cloreto de Trifenil tetrazolium

UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNCISAL	Universidade Estadual de Ciências da Saúde
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average</i>
YPD	Extrato de Levedura, Peptona e Dextrose

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Perceptual
>	Maior
<	Menor
≤	Menor ou igual a
≥	Maior ou igual a
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mg	Miligrama
mg.L⁻¹	Miligrama por litro
mg.mL⁻¹	Miligrama por mililitro
μg.mL⁻¹	Micrograma por mililitro
mM	MiliMolar
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
J	Jacard

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 REVISÃO DE LITERATURA	28
3.1 Leveduras do Gênero <i>Candida</i>	28
3.2 Principais Espécies de <i>Candida</i>	28
3.2.1 <i>C. albicans</i>	29
3.2.2 <i>Candida</i> não- <i>albicans</i>	29
3.3 Candidíase Vulvovaginal (CVV)	30
3.3.1 Fatores de Virulência das Leveduras e Predisposição do Hospedeiro	31
3.4 Diagnóstico Laboratorial de Candidíase Vulvovaginal	32
3.5 Tipagem Genética de Leveduras do Gênero <i>Candida</i>	33
3.5.1 Microssatélites	34
3.6 Antifúngicos	35
3.6.1 Polienos	37
3.6.2 Derivados Imidazólicos	39
3.7 Resistência aos Antifúngicos	42
3.8 Teste de Susceptibilidade de Leveduras a Agentes Antifúngicos	43
4 METODOLOGIA	46
4.1 Local de Estudo	46
4.2 Obtenção dos Isolados Fúngicos	46
4.3 Isolamento e Purificação das Leveduras	47
4.4 Identificação das leveduras por PCR	47
4.4.1 Obtenção da Massa Celular e Extração de DNA Genômico	47
4.4.2 Amplificação com os Iniciadores Espécies-Específicos	48
4.5 Amplificação com o Microssatélite (GTG) ₅	50
4.6 Controle de Qualidade dos Testes Moleculares	51
4.7 Teste de Susceptibilidade aos Antifúngicos	52
4.7.1 Preparo das Soluções Padrões	52
4.7.2 Preparo do Meio de Cultivo	53

4.7.3 Número de Concentrações Testadas	53
4.7.4 Preparo de Diluições de Agentes Antifúngicos	53
4.7.4.1 Antifúngicos não Solúveis em Água	53
4.7.4.2 Drogas Solúveis em Água	54
4.7.5 Preparo do Inóculo	55
4.7.6 Incubação	55
4.7.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	57
4.8 Análise Estatística	58
5 RESULTADOS	59
5.1 Frequência das Leveduras em Cultura de Secreção Vaginal e Identificação em nível de Espécie	59
5.2 Distribuição das Espécies por Sintomas Clínicos, Faixas Etárias e Fatores Predisponentes	60
5.2.1 Sintomas Clínicos	60
5.2.2 Faixa Etária	62
5.2.3 Fatores Predisponentes	63
5.3 Avaliação da Susceptibilidade aos Antifúngicos	63
5.4 Análise de Perfis de PCR – <i>Fingerprinting</i>	66
5.4.1 Tipagem Molecular de <i>C. krusei</i>	66
5.4.2 Tipagem Molecular de <i>C. glabrata</i>	67
5.4.3 Tipagem Molecular de <i>C. parapsilosis</i>	69
5.4.4 Tipagem Molecular de <i>C. tropicalis</i>	71
5.4.5 Tipagem Molecular de <i>C. albicans</i>	72
6 DISCUSSÃO	78
6.1 Frequência das Leveduras em Cultura de Secreção Vaginal e Identificação à Nível de Espécie	78
6.2 Distribuição das Espécies por Sintomas Clínicos, Faixas Etárias e Fatores Predisponentes	80
6.2.1 Sintomas Clínicos	80
6.2.2 Faixa Etária e Fatores Predisponentes	81
6.3 Avaliação da Susceptibilidade aos Antifúngicos	82
6.4 Análise de Perfis de PCR – <i>Fingerprinting</i>	84
7 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	88

ANEXO	99
ANEXO A - Meios de Cultura	100
ANEXO B – Soluções e Tampões	101
APÊNDICE.....	103
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	104
APÊNDICE B - Informações para Coleta de Secreção Vaginal	106

1 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Candida* fazem parte da microbiota humana da pele, cavidade bucal, trato gastrointestinal, trato genitourinário e trato respiratório. É a causa mais comum de doenças fúngicas em humanos, produzindo infecções, que vão desde distúrbios mucocutâneos, como candidíase vulvovaginal, até doenças invasivas (NETO, HAMDAN, SOUZA, 1999; COLOMBO e GUIMARAES, 2003; DIMOPOULOS et al., 2007).

Nas últimas décadas, *Candida albicans* vem sendo citada como a espécie mais frequentemente isolada em infecções por leveduras, seguida de *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* (DORKO, PILIPCINEC, TKACIKOVA, 2002; PASSOS et al., 2005; GONZALEZ-PEDRAZA et al., 2006; JAIN et al., 2007).

Candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção da mucosa genital causada por leveduras do gênero *Candida*, que comprometem principalmente vagina e vulva. Trata-se de uma das infecções mais comuns na prática clínica de um ginecologista, acomete cerca de 30% das mulheres na idade fértil, e pode ser acompanhada de sintomas como: prurido intenso, disúria, dispareunia e leucorréia (NETO, HAMDAN, SOUZA, 1999; FERRAZZA et al., 2005; HOLANDA et al., 2005).

Os fatores de risco para a aquisição dessa infecção inclui idade fértil, antibioticoterapia de amplo espectro, uso de corticóides, diabetes mellitus, neoplasias, gravidez, uso de anticoncepcionais hormonais e doenças imunossupressoras (LUCCHETTI et al., 2005; YU et al., 2007).

O diagnóstico de CVV pode ser realizado por métodos microbiológicos convencionais e moleculares. A identificação do agente etiológico por métodos convencionais é baseada na micromorfologia das colônias, assimilação de açúcares e testes de fermentação, mas apresenta baixa sensibilidade e especificidade quando comparados com métodos moleculares (KURTZMAN e FELL, 1998). Estes são realizados em nível de sequências de DNA, o que auxilia na identificação. Recentemente, vem sendo utilizada a tipagem molecular, como o *fingerprinting* (GTG)₅-PCR, para auxiliar no diagnóstico, avaliação dos perfis genéticos e mapeamento epidemiológico (CROCCOI et al., 2004; LYON, 2008).

É proeminente a identificação em nível de espécie, para as infecções fúngicas vaginais, devido às espécies de *Candida* diferirem em relação à susceptibilidade

antifúngica (KALSI et al., 2003; HOLANDA et al., 2005). Diversos antifúngicos têm sido indicados no tratamento de candidíase vaginal, com derivados poliênicos (anfotericina B) e imidazólicos (fluconazol e itraconazol) (FISHER et al., 2003; MALANI e KAUFFMAN, 2007).

No entanto, a literatura tem demonstrado a ocorrência de leveduras com sensibilidade diminuída e resistência *in vitro* a determinados antifúngicos. Atualmente, tem-se observado o aumento de espécies de *Candida* não-*albicans* associadas aos casos de candidíase vulvovaginal recorrente, observando-se insucessos terapêuticos com o emprego dos azólicos (GE et al., 2010).

Testes *in vitro* podem ser úteis para estabelecer o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos para leveduras do gênero *Candida* em vulvovaginite, o que torna necessária a identificação em nível de espécie do agente causador e da avaliação do perfil de sensibilidade aos antifúngicos antes de se iniciar o tratamento.

No que se passa à reconhecida importância dos casos de candidíase vulvovaginal e o seu frequente aparecimento devido aos fatores predisponentes classicamente conhecidos, em Maceió, a grande maioria dos laboratórios não realizam identificação de leveduras em nível de espécie e testes para determinação do perfil de sensibilidade de leveduras aos antifúngicos.

Devido à importância clínica deste tema, e à ausência de estudos relacionados no estado de Alagoas, apesar da abundância de estudos publicados em outros países e em Estados Brasileiros, faz-se necessária à avaliação do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos e avaliação do perfil genético em amostras de *Candida* isolada da secreção vaginal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a variabilidade genética e o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de espécies de *Candida* isoladas de secreção vaginal de pacientes de Maceió - Alagoas.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência de candidíase vulvovaginal em pacientes atendidas em cinco laboratórios de Maceió/Alagoas;
- Identificar as leveduras do gênero *Candida* em nível de espécie através de iniciadores espécie-específicos por PCR e determinar sua frequência;
- Verificar a distribuição das espécies por faixas etárias, fatores predisponentes e sintomas clínicos;
- Determinar o perfil de susceptibilidade *in vitro* das espécies isoladas a quatro antifúngicos comerciais;
- Estudar a variabilidade genética em nível intraespecífico pela técnica de PCR-*fingerprinting* com o microssatélite (GTG)₅;
- Verificar relação entre os grupos genéticos e a resistência aos antifúngicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leveduras do Gênero *Candida*

O gênero *Candida* é classificado no Reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina* e classe *Blastomycetes*. Apresenta mais de 200 espécies, tendo como representante principal *Candida albicans* (LACAZ et al., 1998; SIDRIM e ROCHA, 2004; ALVARES, SVIDZINSKI, CONSOLARO, 2007). São microrganismos eucarióticos, unicelulares, GRAM positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, com morfologia variável entre ovóide e redonda e se reproduzem por brotamento (FARAH, ASHMAN, CHALLACOMBE, 2000).

Tem ampla distribuição no ambiente, sendo encontradas na água, no solo, nos vegetais, em homens e animais. Trata-se de fungos oportunistas responsáveis pela maioria das infecções fúngicas nos seres humanos, de modo que, nas últimas décadas, a incidência das infecções causadas por espécies de *Candida* sofreu um grande aumento (CARDOSO, 2004).

Nos seres humanos, estão presentes na microbiota da pele, na mucosa bucal, no trato gastrointestinal e genitourinário. A presença de leveduras em amostras clínicas pode ser interpretada como resultado de colonização ou contaminação ambiental ou processo infeccioso (COLOMBO e GUIMARAES, 2003; DIMOPOULOS et al., 2007).

3.2 Principais Espécies de *Candida*

É pequeno o número de espécies de *Candida* associadas a processos patológicos em humanos, contudo representam interesse na clínica médica (PASSOS et al., 2005). Neste contexto, *C. albicans* é a principal espécie, associada à maioria das manifestações patológicas. Espécies como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, recentemente, tem sido reconhecidas com potencial patogênico ao

homem (DORKO, PILIPCINEC, TKACIKOVA, 2002; LACAZ et al., 1998; GONZALEZ-PEDRAZA et al., 2006; JAIN et al., 2007)

3.2.1 *C. albicans*

Espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos em todas as partes do mundo. Apresentam como principais fatores de patogenicidade e virulência a capacidade de aderência a diferentes mucosas bem como epitélios, dimorfismo, produção de estruturas filamentosas que auxiliam na invasão tissular, na termotolerância significativa e na produção de enzimas, como proteinases e fosfolipases (COLOMBO e GUIMARAES, 2003).

3.2.2 *Candida não-albicans*

C. tropicalis é o segundo agente etiológico causador de candidemia em pacientes imunocomprometidos e possui elevado poder de virulência. *C. krusei* é raramente encontrada causando patogenicidade em humanos, entretanto pode ser isolada do esôfago, peritônio, sangue, trato urinário e respiratório, vagina, úlceras gástricas, queimaduras, unhas e fezes. Apresenta-se intrinsecamente resistente ao tratamento com azólicos (fluconazol) (RICHTER et al., 2005).

C. glabrata é a terceira espécie mais comumente associada às infecções por leveduras em humanos, ocasiona micoses superficiais e sistêmicas e apresenta diminuída sensibilidade ao fluconazol. Contudo *C. parapsilosis* frequentemente isolada de secreções das vias respiratórias, do sangue, da vagina, das unhas e da pele. Os casos de candidíase atribuídos a estas leveduras têm aumentado, principalmente, em pacientes imunodeprimidos, mas as mesmas também têm se demonstrado virulentas em infecções vaginais (LASKER, BUTHER, LOTT, 2006).

3.3 Candidíase Vulvovaginal (CVV)

As espécies do gênero *Candida* estão bem adaptadas aos seres humanos, colonizando-os. Quando ocorre um desequilíbrio entre o hospedeiro e o fungo pode resultar no desenvolvimento de infecção, denominada “candidíase”, que pode variar desde lesões superficiais localizadas ou disseminadas (DIMOPOULOS et al., 2007).

CVV é uma infecção de vulva e vagina, ocasionada pelo crescimento anormal de leveduras comensais que habitam a mucosa do trato genital feminino. Foi descrita pela primeira vez em 1949, por Wilkinson, que observou uma relação entre a existência de fungos na vagina e o aparecimento de vaginite (ZIARRUSTA, 2002).

A partir deste achado, novas pesquisas surgiram e, atualmente, a CVV é considerada uma das infecções mais comuns na prática clínica, sendo o segundo motivo mais frequente de visitas a obstetra e ginecologistas, após a vaginose bacteriana (NETO, HAMDAN, SOUZA, 1999; FERRAZZA et al., 2005; HOLANDA et al., 2005; CORREIA et al., 2009).

Sua incidência tem aumentado dramaticamente nas últimas décadas, de modo que estudos realizados na Inglaterra encontraram de 28% a 37% de casos de CVV em mulheres na idade fértil. Estima-se cerca de 13 milhões de novos casos por ano nos Estados Unidos, o que preocupa quanto ao alto custo que envolve o diagnóstico, tratamento e perda de produtividade do profissional no serviço (NYIRJESY, 2001; SOBEL, 2007; FEUERSCHUETTE et al., 2010).

Acredita-se que aproximadamente 75% das mulheres vivenciarão pelo menos um episódio de CVV, destas, cerca de 40% a 50% apresentarão um quadro de recorrência, dos quais 5% a 8% terão CVV recorrente (CVVR), definida como a ocorrência de quatro ou mais episódios comprovados de CVV em um período de 12 meses (SOBEL, 2007).

Dentre as espécies comumente encontradas, *C. albicans* está presente em 80% a 90% dos casos, enquanto as espécies *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* representam de 10% a 20% das CVVs. Apesar da baixa incidência, leveduras de outros gêneros já foram isoladas da secreção vaginal e identificadas, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* sp. e *Trichosporon* sp. (PEREIRA, 2003; ANDRIOLI et al., 2009).

O trato genital feminino apresenta uma ampla colonização de microrganismos, no qual a ausência de sintomas clínicos pode persistir por um longo período. As leveduras podem tornar-se patogênicas quando o sítio de colonização do hospedeiro passa a ser favorável ao seu desenvolvimento, passando de comensal a patogênica, o que causa a infecção e ocasiona sintomas indesejáveis (FERRER, 2000).

Os sinais e sintomas relacionados à CVV incluem prurido, ardor, dispareunia, eritema e edema vulvar, escoriações, eliminação de corrimento com aspecto semelhante a “nata de leite”, ardor ao urinar e sensação de queimação, podendo apresentar pontilhados brancos a amarelados na parede vaginal e no colo do útero (SOBEL, 2007; FEUERSCHUETTE et al., 2010).

3.3.1 Fatores de Virulência das Leveduras e Predisposição do Hospedeiro

A capacidade das leveduras determinarem doença é mediada por múltiplos fatores, dependendo das condições do ambiente, como o teor de nutrição e a quantidade de oxigênio, e dos aspectos da virulência determinados geneticamente. Essas condições podem variar de hospedeiro para hospedeiro e são específicas para cada microrganismo. Os principais fatores de virulência das leveduras são a capacidade de adesão, a produção de exoenzimas, hidrofobicidade de superfície, formação de tubo germinativo e variabilidade genotípica (ZIARRUSTA, 2002).

Independente do potencial patogênico das diferentes espécies de *Candida*, são observados como fatores predisponentes para a aquisição dessas infecções o uso prolongado de corticosteroides, deficiência da imunidade celular, diabetes mellitus, idade fértil, uso prévio de antibióticos de amplo espectro suprimindo a microbiota competidora, neutropenia e altas concentrações de estrógenos pelo uso de contraceptivos orais ou gravidez (CARDOSO, 2004; HOLANDA et al., 2005; YU et al., 2007).

No que diz respeito à patogênese das CVVs, a capacidade de adesão das leveduras é um dos principais mecanismos de virulência, por ser determinante ao seu desenvolvimento. O desenvolvimento do micélio e a formação tubular podem dificultar a fagocitose pelo sistema imune e facilitar o processo de adesão, o que

explica a elevada incidência de *C. albicans* em relação às outras espécies (ALVARES, SVIDZINSKI, CONSOLARO, 2007).

Outro fator que pode afetar a capacidade de adesão do fungo é a competitividade nutricional com a microbiota vaginal, especialmente os lactobacilos. Estes têm a capacidade de promover inibição do processo de adesão do fungo no epitélio, ligando-se aos receptores. Assim, uma redução de lactobacilos na microbiota vaginal propicia um aumento de infecção fúngica (CORREIA, 2009).

O processo de colonização de leveduras no hospedeiro, levando ao surgimento da CVV, parece estar associado à diminuição do pH vaginal e ao aumento da quantidade de glicogênio. A gravidez, o diabetes e o uso de anticoncepcionais com altas doses de estrogênio propiciam altos níveis de estrogênio vaginal. Com o consequente aumento de glicogênio, produzido pelo epitélio vaginal (nutritivos para os fungos), e com a acidificação do meio, resulta-se a proliferação da levedura (ANDRIOLI et al., 2009).

O uso de dispositivos intrauterinos favorece a capacidade de adesão das leveduras no dispositivo, devido ao surgimento do biofilme na sua superfície externa, o que acaba por proteger as leveduras da ação dos antifúngicos. Doenças da tireóide, obesidade, corticoterapia e drogas imunossupressoras, parecem aumentar o risco de infecção causada por leveduras do gênero *Candida* (ALVARES, SVIDZINSKI, CONSOLARO, 2007).

A utilização de antibióticos atua promovendo a redução da população bacteriana vaginal normal, particularmente dos lactobacilos, diminuindo a competição por nutrientes e facilitando tanto o aumento da colonização, quanto a infecção e proliferação por leveduras do gênero *Candida* (ZIARRUSTA, 2002; SOBEL, 2007).

3.4 Diagnóstico Laboratorial de Candidíase Vulvovaginal

A identificação das leveduras do gênero *Candida* em nível de espécie pode ser realizada por métodos microbiológicos convencionais e moleculares. Os métodos microbiológicos são trabalhosos e requer longo período de tempo, são

baseados nas características morfológicas e fisiológicas apresentadas pela levedura (FEUERSCHUETTE et al., 2010).

Atualmente, são comercializados alguns meios seletivos e diferenciais (cromogênicos) para identificação presuntiva de algumas espécies de *Candida* baseados na reação do substrato do meio (β -glicosamida) com enzimas secretadas pelas leveduras, produzindo colônias com várias pigmentações (HOSPENTHAL et al., 2006). Essas enzimas são específicas para cada espécie, permitindo a identificação através da cor e característica da colônia. A utilização deste meio facilita a detecção e a identificação das leveduras, fornecendo, também, resultados presuntivos em menor tempo que os obtidos pelos métodos convencionais (HOUANG et al., 1997; COOKE et al., 2002).

Métodos moleculares têm sido adotados no diagnóstico de espécies de *Candida*, por ser rápido e sensível. Hsu e colaboradores (2003) desenvolveram iniciadores para amplificação de fragmentos na região entre os genes 18S e 28S do rDNA para identificar as espécies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *Cryptococcus neoformans*.

A diferenciação e identificação de *Candida* em nível de espécie é importante para o diagnóstico de CVV e manejo clínico, fornecendo informações sobre o prognóstico e terapêutica adequada para cada espécie. Dessa forma, evita-se a administração imprópria de antifúngicos que podem resultar no desenvolvimento de mecanismos de resistência, além de possibilitar o rastreamento epidemiológico das espécies causadoras de CVV (NUCCI e COLOMBO, 2002; SILVA-FILHO et al., 2005; LYON et al., 2008).

3.5 Tipagem Genética de Leveduras do Gênero *Candida*

A necessidade de entender a genética, evolução, patogenicidade e epidemiologia de inúmeras infecções fúngicas, especialmente aquelas causadas pelo gênero *Candida*, tem aumentado o interesse dos pesquisadores em estudar métodos moleculares que avaliem polimorfismo genético (BORIOLLO et al., 2005).

Diversos métodos de tipagem genética surgiram, tais como eletroforese de enzima multiloco (MLEE – *Multilocus Enzyme Electrophoresis*) (BORIOLLO et al.,

2005), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE – *Pulsed-field Gel Electrophoresis*) (JANG et al., 2005), amplificação aleatória de polimorfismos no DNA (RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*) (RUIZ, CALDERÓN, GÓMEZ, 2009; TAY, NA, CHONG, 2009), polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição (RFLP – *Restriction Length Fragment Polymorphism*) (WISE et al., 2007; ZHOU et al., 2009) e amplificação de sequências simples repetidas (SSRs – *Simple Sequence Repeats*) (SULLIVAN et al., 1993; CARUSO et al., 2002).

Métodos baseados em PCR *fingerprinting* têm demonstrado utilidade em estudos de aspectos clínicos e epidemiológicos de infecções por *Candida*. A partir dos quais se podem examinar diferentes níveis de discriminação como identificar a mesma linhagem em amostras independentes; identificar isolados altamente relacionados, porém não idênticos; agrupar isolados moderadamente relacionados; e identificar isolados que não são relacionados geneticamente (SOLL, 2000).

3.5.1 Microssatélites

Microssatélites ou sequências simples repetidas (SSRs) são sequências curtas de até seis nucleotídeos que se repetem em blocos, em um dado *locus* distribuído ao longo do genoma. Estão envolvidos na organização do cromossomo, na regulação de processos metabólicos e na regulação da atividade gênica (LI et al., 2004).

Os mesmos são utilizados como marcadores moleculares em consequência do polimorfismo gerado, devido à variação no número de unidades de repetição em um determinado *locus*. As regiões que flanqueiam os microssatélites são conservadas para indivíduos da mesma espécie ou gênero. Dessa maneira, a análise do polimorfismo destas regiões vem sendo uma excelente ferramenta na identificação direta de espécies isoladas, seja para verificar a variabilidade genética entre espécies distintas, seja dentro de uma mesma espécie (JEFREYS et al., 1988).

O perfil de amplificação dos isolados fúngicos consiste na análise observacional de ausência ou presença de banda em um padrão obtido pela técnica de PCR utilizando um iniciador único de microssatélite, o que permite a

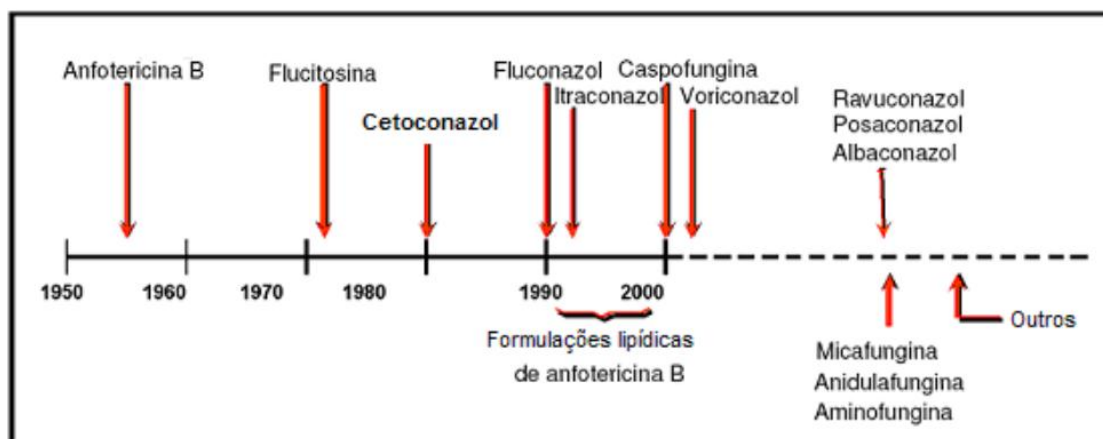
diferenciação entre espécie e subespécies, gerando fragmentos do DNA que podem ser separados por eletroforese em gel, corados e fotografados (WISE et al., 2007).

As análises de *fingerprinting* utilizando o iniciador (GTG)₅ em tipagem molecular em leveduras têm demonstrado excelentes resultados no estudo da variabilidade genética específica e intraespecífica (THANOS et al., 1996; DALLE et al., 2000; CARUSO et al., 2002; SILVA-FILHO et al., 2005; DI CONZA et al., 2007).

3.6 Antifúngicos

Os antifúngicos da atualidade são provenientes de um longo e persistente trabalho de investigação para torná-los cada vez mais seletivos e com menor tendência de causar efeitos colaterais, contribuindo para o tratamento de todos os tipos de micoses (ODDS, BROWN, GOW, 2003; FILIPPIN e SOUZA, 2006). A **Figura 1** ilustra, em termos temporais, a introdução de alguns antifúngicos, atualmente utilizados na terapêutica clínica.

Figura 1: Principais marcos no desenvolvimento dos antifúngicos.



Fonte: Figura adaptada de Catalán e Montejo (2006).

Durante a década de 40, o número de drogas com atividade para o controle das diversas infecções causadas por fungos era reduzido. Nos anos 50, a anfotericina B surgiu como novo antifúngico disponível para o tratamento de infecções invasivas, por possuir amplo espectro de ação, mantendo-se na posição

de droga de referência no controle de infecções viscerais e disseminadas (SHEEHAN, HITCHCOCK, SIBLEY, 1999; MAERTENS e BOOGAERTS, 2005).

Com a introdução de drogas do grupo dos imidazólicos em meados de 1970, o desenvolvimento de novos fármacos foi acelerado, devido ao grande impacto gerado pelo seu largo espectro de ação e facilidade de administração oral. No início de 1990, surgiram os triazólicos (fluconazol e itraconazol), com maior biodisponibilidade e atividade mais intensa, oferecendo novas opções de tratamentos. Nos últimos oito anos, dois novos triazólicos foram liberados para uso médico (voriconazol e posaconazol), possuindo espectro de ação mais amplo do que os azólicos anteriores (SHEEHAN, HITCHCOCK, SIBLEY, 1999; PETRIKKOS e SKIADA, 2007).

Recentemente, a anfotericina B foi incorporada em formulação lipídica e duas novas classes de antifúngicos surgiram: as alilaminas e equinocandinas. Estas últimas são extremamente seguras e eficazes, quando comparadas às outras classes de antifúngicos, por possuírem mecanismo de ação diferente e apresentarem poucas interações. As três equinocandinas atualmente utilizadas são: caspofungina, micafungina e anidulafungina (PETRIKKOS e SKIADA, 2007).

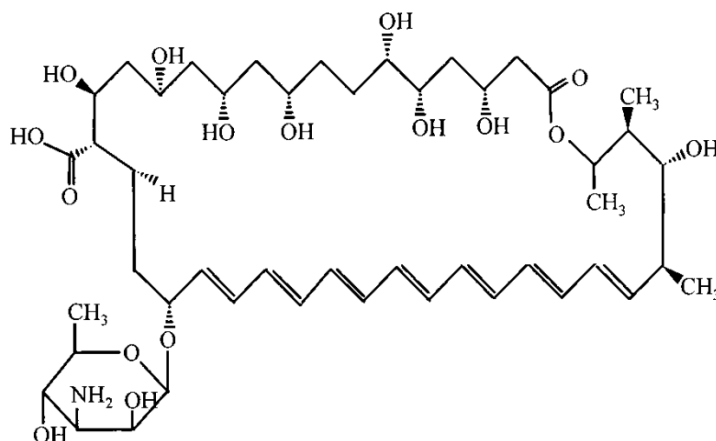
Os antifúngicos agem sobre os microrganismos de duas maneiras: ação fungicida (morte do agente) e ação fungistática (parada de crescimento e reprodução). Estes efeitos são determinados por mecanismos de ação que alteram de acordo com a classe dos antifúngicos, geralmente estão ligados aos esteróis da membrana celular fúngica. Em decorrência da semelhança existente entre as células dos seres humanos e as de fungos, os antifúngicos podem apresentar toxicidade significativa e interação com o metabolismo humano, sendo necessária a vigilância diária, com reajuste de doses e avaliação dos achados clínicos e laboratoriais (FERRARI e HAMDAN, 1998; RIBEIRO et al., 2004).

Um antifúngico ideal deve apresentar atividade fungicida de amplo espectro, não causar efeitos colaterais ao paciente, possuir uma melhor forma de administração, ser seguro e o mais barato possível. Como ainda não foi possível encontrá-lo, a procura de novos agentes antifúngicos ainda permanece (CARRILLO-MUNOZ et al., 2006).

3.6.1 Polienos

São antifúngicos produzidos a partir de algumas espécies de *Streptomyces* spp. que possuem em sua estrutura molecular um grupo amino ligado a um anel lactona, com uma série de ligações duplas em uma das porções da molécula e de grupos hidroxila na porção oposta (**Figura 2**). Dentre os seus representantes, destacam-se: anfotericina B, nistatina e flucitosina. Anfotericina B é considerado o “Padrão Ouro” para o tratamento de infecções fúngicas invasivas, entretanto, esse padrão é questionado devido ao surgimento de novos fármacos efetivos e com maior segurança clínica (CATALÁN e MONTEJO, 2006).

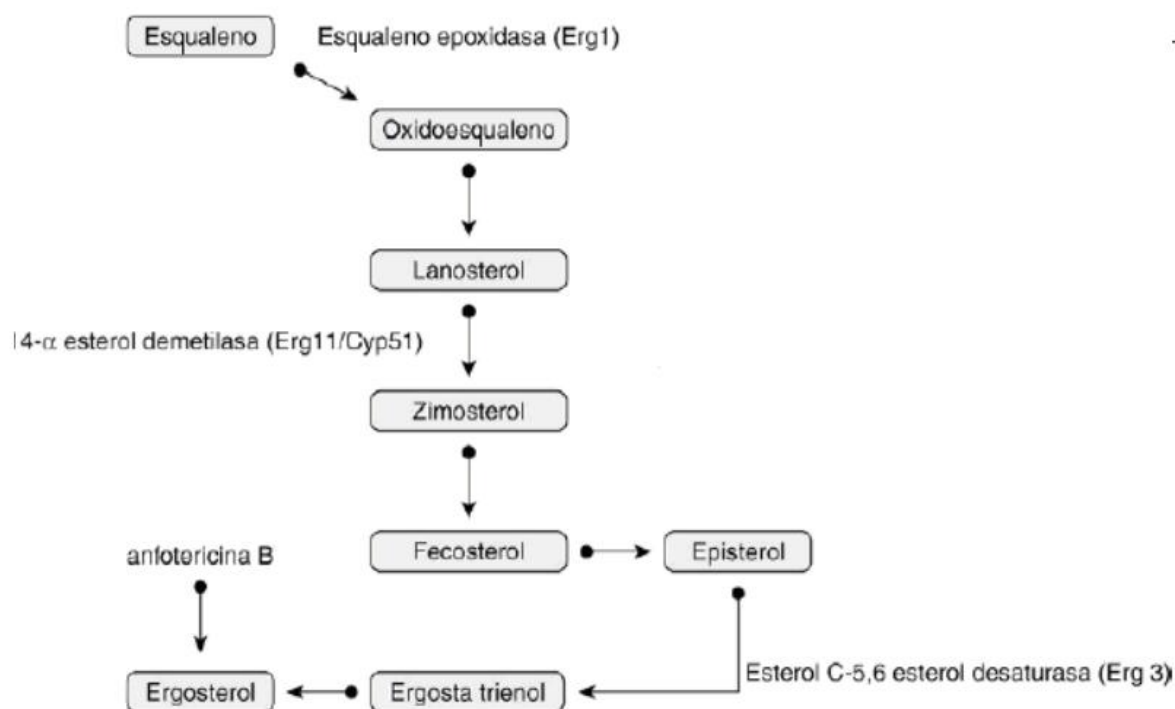
Figura 2: Estrutura química da anfotericina B.



Fonte: Figura adaptada de Odds (2003).

A anfotericina B se fixa avidamente aos esteróis de membrana, preferencialmente ao ergosterol (presente na membrana de células fúngicas), em relação ao colesterol (encontrado na membrana plasmática de células animais), fazendo deste composto um antifúngico seletivo (CATALÁN e MONTEJO, 2006).

A partir da interação especificamente com o ergosterol da membrana fúngica, a mesma promove a formação de poros na membrana, interferindo na permeabilidade e nas funções de transporte levando a perda de íons (sódio e potássio) e metabólitos (**Figura 3**). Esse mecanismo acarreta, eventualmente, a morte da célula fúngica, mostrando-se ativo contra a maioria dos fungos (FILIPPIN e SOUZA, 2006).

Figura 3: Mecanismo de ação dos polienos.

Fonte: Figura adaptada de Mellado e colaboradores (2002).

A via de administração é intravenosa, que contribui para a ação imediata. Mostra-se pouco efetivo quando administrado por via oral, razão pela qual é utilizada apenas no tratamento das infecções gastrointestinais (ODDS, 2003). No entanto, a utilização intravenosa da anfotericina B provoca efeitos colaterais tóxicos sérios, sendo a nefrotoxicidade o mais relevante e limitado para sua administração (CATALÁN e MONTEJO, 2006).

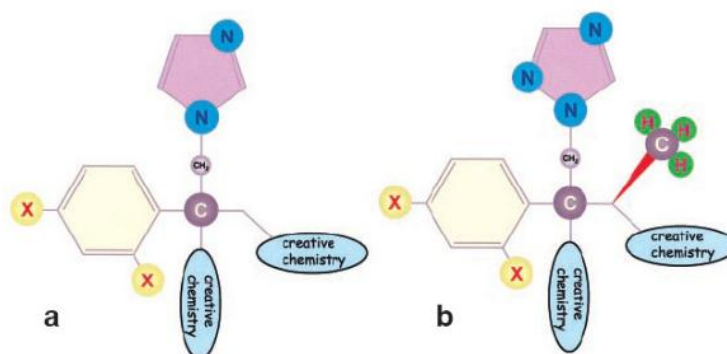
Outras reações indesejáveis do uso de anfotericina incluem febre, tremores, cefaléia, náusea, vômitos, comprometimento da função hepática, alterações cardiovasculares, trombocitopenia, hipocalcemia, hipernatremia, hipomagnesemia, disfunção renal e reações anafiláticas (FILIPPIN e SOUZA, 2006). Novas formulações lipídicas da anfotericina B (com complexo lipídico, dispersão coloidal, intralipídica e conjugado) têm sido introduzidas com o objetivo de reduzir a toxicidade causada em sua formulação tradicional (desoxicolato) (BADIA et al., 2004; MARTINEZ, 2006).

3.6.2 Derivados Imidazólicos

Os derivados azólicos têm emergido como uma alternativa ao uso da anfotericina B, por apresentarem uma menor toxicidade, amplo espectro de ação e melhores propriedades farmacocinéticas (ODDS, 2003). São os antifúngicos mais utilizados na prática clínica, e vêm sendo refinados e melhorados ao longo dos anos (CHEN e SORREL, 2007).

São antifúngicos fungistáticos sintéticos, que apresentam em sua estrutura química um ou mais anéis de cinco átomos de carbono (anel azólico), unidos por ligação do tipo C-N ao restante da molécula (ODDS, 2003). Em função da presença do número de nitrogênios no anel imidazólico, dividem-se em: imidazóis (miconazol e cetoconazol) e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol) (**Figura 4**) (MARTINEZ, 2006).

Figura 4: Estrutura química dos imidazóis (a) e triazóis (b).

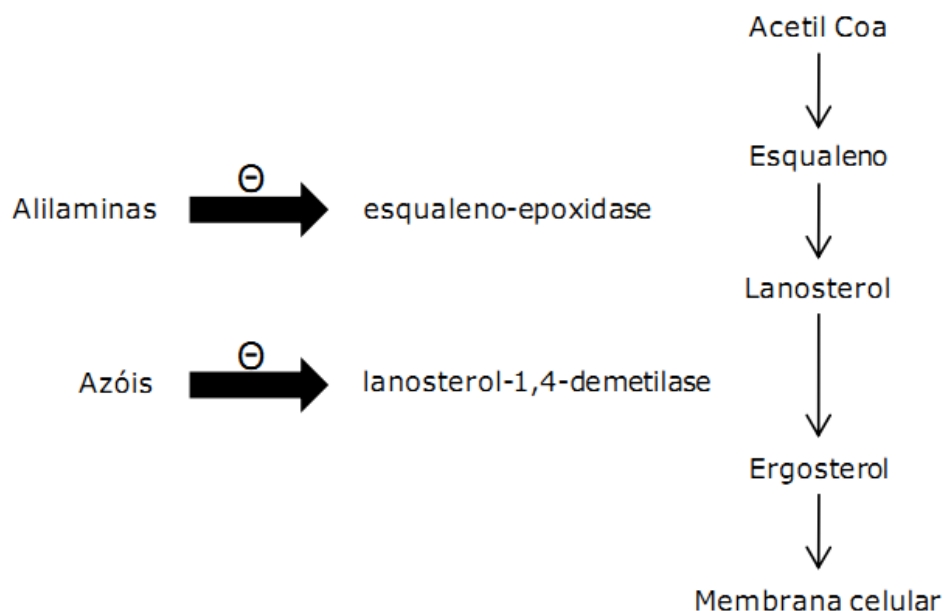


Fonte: Figura adaptada de Odds (2003).

Embora haja diferenças nas estruturas químicas dos azólicos, estes apresentam mecanismo de ação em comum, que envolvem a inibição da biossíntese do ergosterol (produto final da via metabólica de esteróis fúngicos), ao nível da enzima 14 α -demetilase, associada ao citocromo P-450 dos fungos, que participa na conversão de lanosterol em ergosterol. Esta inibição resulta no acúmulo de uma série de precursores metilados e diminuição da síntese do ergosterol (**Figura 5**). Consequentemente, há formação de membrana defeituosa e com permeabilidade

alterada, sendo responsável pela atividade fungistática dos derivados azólicos (ANDRIOLI, 2000; MONTEJO, CATALAN, DEL PALACIO, 2006).

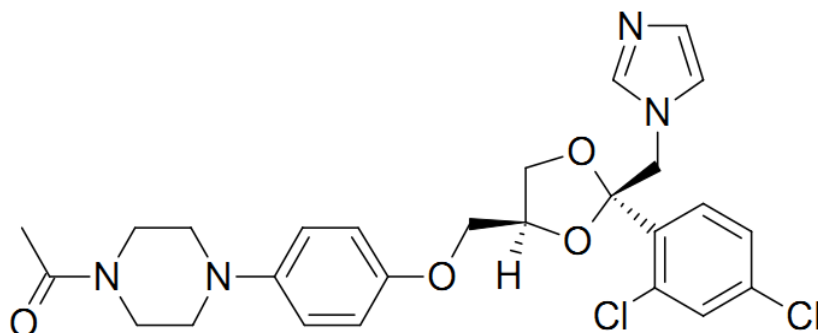
Figura 5: Mecanismo de ação dos derivados imidazólicos.



Fonte: Figura adaptada de Be (1998).

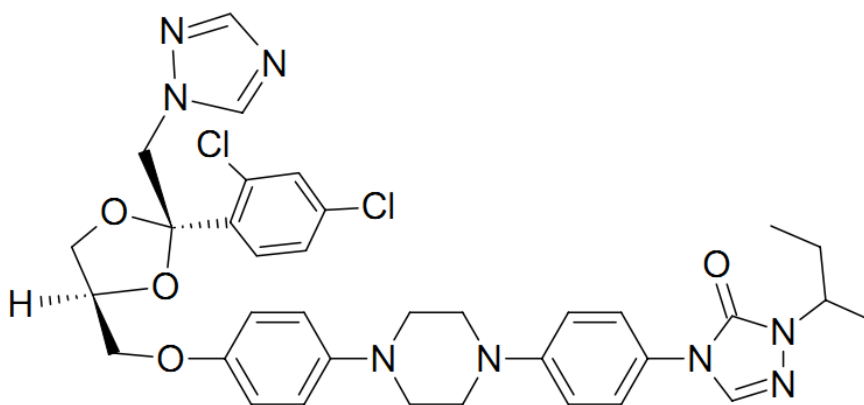
Além desta ação, os triazóis podem provocar a inibição de enzimas oxidativas e peroxidativas, com resultante acúmulo de peróxido de hidrogênio intracelular capaz de lesionar a estrutura das organelas dos fungos. Os mesmos também podem exercer efeito direto sobre os ácidos graxos da membrana, alterando sua estrutura, gerando perda de aminoácidos e proteínas e ocasionando a tomada de nutrientes pela célula (SHEEHAN, HITCHCOCK, SIBLEY, 1999).

Dentre os derivados imidazólicos, o cetoconazol (**Figura 6**) foi o primeiro azólico a ser administrado por via oral no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, apresentando atividade antifúngica evidente, perfil de toxicidade muito baixo e disponibilidade para uso oral, embora dependa do pH estomacal para evitar falhas terapêuticas. Os principais riscos do cetoconazol são os efeitos tóxicos em nível hepático e gastrointestinal que os mesmos podem provocar, através da interferência em processos metabólicos da célula humana (EGGIMANN, GARBINO, PITTET, 2003).

Figura 6: Estrutura química do Cetoconazol.

Fonte: Figura adaptada de Ghannoum e Rice (1999).

O itraconazol (**Figura 7**) é um derivado triazólico, insolúvel em água e altamente lipofílico, havendo, então, necessidade de um meio ácido para otimizar a absorção oral. Geralmente, indica-se sua administração acompanhada de sucos de frutas e comidas (ESPINEL-INGROFF et al., 1995). Quando comparado aos imidazólicos, apresenta maior espectro de atividade antifúngica, melhor perfil farmacocinético e menor toxicidade (LYMAN e WALSH, 1992).

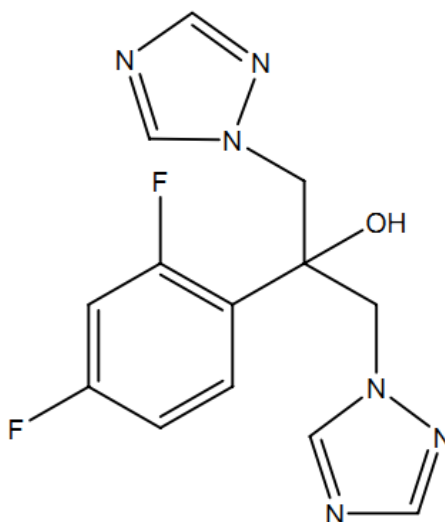
Figura 7: Estrutura química do Itraconazol.

Fonte: Figura adaptada de Ghannoum e Rice (1999).

O fluconazol (**Figura 8**) apresenta elevada biodisponibilidade oral e intravenosa de 90%, de tal forma que sua absorção oral é rápida e completa e não se modifica pela alimentação. O mesmo liga-se às proteínas plasmáticas e distribui-se amplamente a todos os tecidos do corpo, sendo pouco metabolizado no

organismo, com excreção de forma inalterada em 80%, pela via renal (LYMAN e WALSH, 1992; SILVA, 2002).

Figura 8: Estrutura química do Fluconazol.



Fonte: Figura adaptada de Ghannoum e Rice (1999).

Sua penetração nos líquidos biológicos de todo o organismo é elevada, incluindo o líquido cefalorraquidiano e líquidos oculares, o que contribui em sua eleição como o fármaco de primeira escolha na maioria das meningites fúngicas do Sistema Nervoso Central (RANG et al., 2004). Seus efeitos adversos são raros, porém, podem surgir náusea, cefaléias, dores abdominais e exantemas cutâneos (LUMBRERAS, LIZASOAIN, AGUADO, 2003).

3.7 Resistência aos Antifúngicos

Trata-se de um recente problema no tratamento de infecções fúngicas em seres humanos. Ao se conceituar susceptibilidade e resistência, devem-se considerar os aspectos clínicos e microbiológicos. Em termos clínicos, pode ser definida como a persistência da infecção no hospedeiro, mesmo em altas concentrações da droga no sítio de infecção. A resistência microbiológica pode ser primária (intrínseca), quando há persistência do microrganismo sem prévia exposição aos fármacos antifúngicos; e secundária (adquirida), quando desenvolvida

em resposta à exposição a tais substâncias. Sabe-se, atualmente, que espécies de *C. krusei* e *C. glabrata* são intrinsicamente resistentes ao fluconazol (MELLADO, CUENCA-ESTRLLA, RODRIGUEZ-TUDELA, 2002; ESPINEL-INGROFF, 2008).

A ocorrência de resistência em leveduras está associada a fatores do hospedeiro, farmacológicos, e mecanismos desenvolvidos pelos fungos (ESPINEL-INGROFF et al., 2000). Há vários mecanismos pelos quais as células fúngicas tornam-se resistentes incluindo mudanças qualitativas ou quantitativas no ergosterol, diminuição da permeabilidade da membrana, redução de acúmulo de drogas pelo aumento do sistema de efluxo, alterações no processamento intracelular, modificações na degradação do fármaco, alterações das enzimas que participam do mecanismo de ação das drogas, mutações e alterações de enzimas que participam do processo de biossíntese do ergosterol (DIAZ-GUERRA et al., 2003).

O mecanismo mais característico de resistência a anfotericina B está envolvido na alteração do conteúdo de ergosterol da membrana, secundário a mutações nas vias de biossíntese de ergosterol e aumento da atividade da enzima catalase no interior da célula fúngica, impedindo assim, a formação de radicais livres para a formação de poros na membrana fúngica (KONTOYIANNIS e LEWIS, 2002). A resistência aos azólicos pode ocorrer principalmente por mutações do gene *ERG11*, que codifica a enzima 14α – lanosterol-demetilase, reduzindo a qualidade e quantidade da enzima (CANUTO e RODERO, 2002).

3.8. Teste de Susceptibilidade de Leveduras aos Agentes Antifúngicos

O aumento de infecções fúngicas oportunistas, acompanhado por crescente surgimento de cepas resistentes e disponibilidade de novos antifúngicos, tornou necessário o desenvolvimento de métodos que permitam correlações com a clínica e identifique cepas resistentes, para a investigação da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos (PFALLER et al., 2002; SANGULARD e ODDS, 2002; ARIKAN, 2007).

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (anteriormente, *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS) apresentou, em 1992, o documento M27-P para a avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos (CLSI, 1992). Em 1997, foi publicado um método de referência para testar *in vitro*

cinco agentes antifúngicos sistêmicos, voltado para *Candida* sp. e *Cryptococcus neoformans* através do documento M27-A (CLSI, 1997). Posteriormente, versões atualizadas (documentos M27-A2, -A3, M27-S2, -S3) foram apresentadas entre os anos de 2002 e 2008 (CLSI, 2002; 2005; 2008b; 2008c). O CLSI propõe a padronização do método de disco-difusão para *Candida* sp. frente ao fluconazol e ao voriconazol, publicado no documento M44-A (CLSI, 2004). Em 2007, foi apresentado um documento suplementar (M-44-S2) (CLSI, 2007).

Os métodos descritos pelo CLSI, utilizando a técnica de macro e microdiluição, identificam os valores de concentração inibitória mínima (CIM) capazes de determinar susceptibilidade e/ou resistência às drogas normalmente empregadas. Os valores de *breakpoints* (pontos de cortes) têm sido estabelecidos através das combinações organismo-droga. Para a anfotericina B, CIM pode ser observada como a menor concentração da droga que inibe um crescimento visível. De acordo com CLSI (2002), as CIMs da anfotericina B estão no intervalo de 0,25 e 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para os isolados de leveduras do gênero *Candida*. Quando se obtém um valor de CIM de anfotericina B acima de 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, é provável que o microrganismo testado apresente resistência a esta droga.

Devido ao mecanismo de ação intracelular dos derivados azólicos, que permite um proeminente crescimento (*trailing*) do microrganismo, antes que a inibição ocorra, os pontos de corte podem ser estimados através da comparação visual do controle com a proeminência de turbidez correspondente a aproximadamente 50% da inibição do crescimento (CLSI, 2002).

Para interpretar os testes de sensibilidade ao fluconazol como susceptíveis, as amostras devem apresentar $\text{CIM} \leq 8,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; amostras sensíveis dose dependente (SDD), com CIM entre 16 a 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; e amostras resistentes (R) com $\text{CIM} \geq 64 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Com relação ao itraconazol, isolados inibidos por concentrações $\leq 0,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de itraconazol são considerados sensíveis (S) e aqueles inibidos por concentrações $\geq 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados resistentes (R). CIM de Itraconazol entre 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ indicam isolados considerados susceptíveis dependente de dose (SDD) (CLSI, 2002).

Em relação ao cetoconazol, o CLSI (2002) apenas registra que os valores das concentrações da droga geralmente são encontrados entre 0,03 – 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Entretanto, ainda não há uma boa correlação entre os valores de CIMs encontrados *in vitro* e o tratamento *in vivo*.

Métodos alternativos vêm surgindo conforme a necessidade de diagnóstico diário em laboratório clínico. Atualmente, existem testes comerciais disponíveis para a determinação de suscetibilidade antifúngica baseados na padronização do CLSI, dentre estes: Etest, microdiluição colorimétrica, diluição em ágar, determinação da atividade fungicida e citometria de fluxo (ARIKAN, 2007).

4 METODOLOGIA

4.1 Local do Estudo

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Genética e Microbiologia Aplicada – BIOGEN da Universidade Federal de Alagoas após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL), segundo protocolo nº 1185.

Realizou-se um estudo amostral com culturas de secreção vaginal positivas para leveduras provenientes de pacientes atendidas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Geral de Alagoas, Laboratório Samuel Pessoa, Laboratório DILAB, Laboratório IPC e Laboratório Ismar Gatto, localizados na cidade de Maceió/Alagoas.

4.2 Obtenção dos Isolados Fúngicos

Foram coletadas 2092 amostras de secreção vaginal, com auxílio de swabs estéreis, objetivando a realização de culturas para fungos em meio ágar Sabouraud-Dextrose (DIFCO), exame direto em solução salina e produção de esfregaços em lâminas coradas pela coloração de Gram, para avaliação da presença de estruturas fúngicas e leucócitos.

Durante a coleta do swab vaginal, as pacientes que aceitaram participar da pesquisa (**Apêndice A**) responderam a um questionário específico (**Apêndice B**), que visava à elucidação de fatores predisponentes, possivelmente associados à vulvovaginite micótica.

A coleta do material que apresentava cultura positiva para leveduras foi realizada semanalmente, durante o período compreendido entre Março a Dezembro de 2010 nos Setores de Microbiologia dos laboratórios estudados. Foram incluídas no estudo culturas positivas para os isolados fúngicos, com exame direto positivo para levedura, com a respectiva lâmina da secreção vaginal e o questionário

aplicado durante a coleta. Foram excluídas da pesquisa 84 isolados com cultura positiva para leveduras, por não apresentarem questionário completo, e quatro outras amostras, por não se obter crescimento no processo de isolamento e purificação das colônias de leveduras.

4.3 Isolamento e Purificação das Leveduras

Para cada isolado de levedura foi realizada uma suspensão em salina (0,85%) equivalente à 0,5 da escala de McFarland, e em seguida realizou-se semeio na superfície de YPD (extrato de levedura, peptona e dextrose) sólido, acrescido de 50 mg.L⁻¹ de ácido nalidíxico. As placas foram incubadas em estufa a 30°C, por 48 horas, e após esse período foram obtidas colônias de mesmo morfotipo, confirmando a pureza das culturas. As colônias puras foram transferidas para tubos com meio YPD sólido e microtubos com YPD líquido e armazenadas a 4°C.

4.4 Identificação das Leveduras por PCR

4.4.1 Obtenção da Massa Celular e Extração de DNA Genômico

Cada isolado de levedura foi inoculado em 10 mL de YPD líquido e incubado a 30°C em agitador orbital termostatizado a 150 g, por 16 horas. Após este período, foi retirado 1 mL de cada frasco de Erlenmeyer e, posteriormente, transferido para um microtubo do tipo eppendorf® de 1,5 mL esterilizado, e centrifugado a 5000 g, por 3 minutos. O centrifugado foi lavado duas vezes com água destilada esterilizada e, após agitação, foi novamente centrifugado a 5000 g, por 3 minutos. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e ao centrifugado foram adicionados 600 µL de solução de lise. O microtubo foi mantido a 65°C em banho-maria, por 30 minutos, com agitação por inversão a cada 10 minutos.

Posteriormente, foram adicionados 600 µL de fenol/clorofórmio/álcool isolamílico (25:24:1) e, após breve agitação, a suspensão foi centrifugada a 12000 g, por 10 minutos. Em seguida, foram transferidos 500 µL da fase superior para um novo microtubo esterilizado de 1,5 mL de capacidade, e adicionados 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após breve agitação, a amostra foi centrifugada novamente por igual período e rotação; logo após, 400 µL da fase superior foram transferidos para um novo microtubo esterilizado de 1,5 mL. A este tubo foram adicionados 800 µL de etanol absoluto gelado, permanecendo, por 2 horas, a -20°C, para precipitação do DNA.

Depois de retirado do frizer, o microtubo foi mantido em temperatura ambiente e, logo após, foi centrifugado a 12000 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol a 70% por duas vezes e secado à temperatura ambiente. Em seguida, foi ressuspendido em 200 µL de tampão TE pH 8,0 (10 mM Tris/HCl; 1mM EDTA) e mantido a -20° C.

A quantificação foi realizada por espectrofotometria, utilizando-se comprimento de onda de 260 nm após diluições das amostras de 1:200. Para o cálculo da concentração do DNA, a relação utilizada foi de 1DO = 50 µg.mL⁻¹ (SAMBROOK et al., 1989).

4.4.2 Amplificação com os Iniciadores Espécies-Específicos

A reação de amplificação por PCR foi realizada com iniciadores espécie-específicos descrito por Hus e colaboradores (2003) (**Quadro 1**). As reações de amplificação foram determinadas para um volume final de 20 µL e ocorreram em um termociclador Biocycler MJ25 (Biosystems[®]), de acordo com o protocolo descrito por Silva-Filho (2005) (**Quadro 2**).

Quadro 1 - Sequência de iniciadores espécie-específicos, tamanho dos fragmentos e número de acesso em bancos genéticos para detecção das espécies de *Candida*.

Espécies	Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Tamanho (pb)	Nº Acesso
<i>C. albicans</i>	CALB1	TTT ATC AAC TTG TCA CAC CAG A	≈273	L47111
	CALB2	ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG		L28817
<i>C. glabrata</i>	CGL1	TTA TCA CAC GAC TCG ACA CT	≈423	AB032177
	CGL2	CCC ACA TAC TGA TAT GGC CTA CAA		AF167993
<i>C. parapsilosis</i>	CPA1	GCC AGA GAT TAA ACT AAC CA	≈320	AF287909
	CPA2	CCT ATC CAT TAG TTT ATA CTC CGC		L47109
<i>C. tropicalis</i>	CTR1	CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T	≈357	AF287910
	CTR2	TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T		AF268095
<i>C. krusei</i>	CKRU1	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	≈258	M94516
	CKRU2	AAA AGT CTA GTT CGC TCG GGC C		M94517

Fonte: HSU et al. (2003).

Quadro 2 - Protocolo da reação de amplificação com os iniciadores espécie-específicos para CALB, CGL, CPA, CTR e CKRU.

Componentes	Concentração Estoque	Volume na Reação (µl)	Concentração Final
Água Milli-Q®	-	7,4	-
Tampão PCR ^a	10X	2,50	1X
BSA (albumina sérica bovina)	0,25 µg/µL	2,50	0,025 µg/µL
dNTP's ^a	2,0 mM	2,50	0,2 mM
Iniciador 1	12,5 pmol	1,25	0,625 pmol/µL
Iniciador 2	12,5 pmol	1,25	0,625 pmol/µL
MgCl ₂ ^a	50,0 mM	1,50	3,0 mM
Taq Polimerase ^a	5,0 U/µL	0,10	0,025 U/µL
DNA	50,0 ng/µL	1,00	2,0 ng/µL

a – Invitrogen®

Fonte: Silva-Filho, 2005.

Os ciclos de amplificação foram programados para um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos à 96°C, seguidos de 40 ciclos consistindo de desnaturação à 96°C por 30 segundos, hibridização à 58°C por 30 segundos, extensão à 72°C por 30 segundos, e com extensão final à 72°C por 15 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% e submetidos a uma tensão de 10 volts/cm, por 40 minutos, em tampão TBE 0,5X pH 8,0. Como referência foi utilizado um marcador de peso molecular de DNA de 100 pb (Amresco® e Invitrogen®). Após eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$), visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (312 nm) e fotografado em sistema de fotodocumentação modelo Doc-Print II (Vilber Lourmat®).

4.5 Amplificação com o Microssatélite (GTG)₅

Para análise de tipagem genética, os isolados foram amplificados com o microssatélite (GTG)₅-PCR em termociclador Biocycler MJ25 (Biosystems®), realizado para um volume final de 25 μL , seguindo o protocolo do **Quadro 3**.

Quadro 3 - Protocolo de reação de amplificação com o marcador microssatélite (GTG)₅.

Componentes	Concentração Estoque	Vol. na Reação (μL)	Concentração Final
Água Milli-Q®	-	9,75	-
Tampão PCR (sem Mg^{+2}) ^a	10X	2,50	1X
BSA (albumina sérica bovina)	0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	2,50	0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
dNTP's ^a	2,0 mM	2,50	0,2 mM
Iniciador (GTG) ₅	1,0 pmol	5,00	0,2 pmol/ μL
MgCl_2 ^a	50,0 mM	1,50	3,0 mM
Taq Polimerase ^a	5,0 U/ μL	0,25	0,05 U/ μL
DNA	50,0 ng/ μL	1,00	2,0 ng/ μL

^a – Invitrogen®

Fonte: Silva-Filho, 2005.

Os ciclos de amplificação foram programados para um ciclo de desnaturação de 5 minutos à 94°C; seguidos de 40 ciclos de desnaturação à 94°C por 15 segundos, hibridização à 55°C por 45 segundos, extensão à 72°C por 90 segundos; e, extensão final à 72°C por 6 minutos.

Os fragmentos de DNA foram submetidos à separação por eletroforese a 7,5 volts/cm em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X pH 8,0 por 100 minutos. Foi utilizado um marcador molecular de DNA de 100 pb para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados. Após eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (312 nm) e fotografados em sistema de fotodocumentação modelo Doc-Print II (Vilber Lourmat®).

Os padrões das bandas obtidos foram analisados pelo *software* BioNumerics 6.5, determinando-se uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente similaridade de Jacard (J) e, a partir da matriz de similaridade, foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetical Average*).

Foi utilizado o *software* Arlequin ver. 3.5.1.2 para avaliar a diversidade gênica, que fornece informação sobre a variabilidade genética do conjunto de isolados analisados e é definida como a probabilidade de dois perfis genéticos tomados ao acaso da amostra serem diferentes, tornando possível aferir se o marcador (GTG)₅ apresenta capacidade de discriminação das linhagens de *Candida* para as espécies analisadas.

4.6 Controle de Qualidade dos Testes Moleculares

Para o controle positivo dos testes moleculares com os iniciadores espécies-específicos, foram utilizadas leveduras da Coleção de Culturas – URM/UFPE: *Candida albicans* (URM 5689), *Candida parapsilosis* (URM 5583), *Candida glabrata* (URM 5594), *Candida tropicalis* (URM 5694) e *Candida krusei* (URM 1059). A qualidade das reações de amplificação com o microssatélite (GTG)₅, foi monitorada utilizando uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* com padrão conhecido do BIOGEN. Como controle negativo, utilizou-se água destilada.

4.7 Teste de Susceptibilidade aos Antifúngicos

A susceptibilidade dos isolados de *Candida* sp. foi estabelecida pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2002).

Para monitorar a qualidade dos testes de susceptibilidade aos antifúngicos foram utilizadas cepas padrão: *C. krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. albicans* (ATCC 90028). Os testes foram realizados em duplicata e os resultados calculados a partir da média da concentração inibitória mínima.

Os antifúngicos azólicos: fluconazol (Galena Química e Farmacêutica LTDA), itraconazol (Neo Química) e cetoconazol (Galena Química e Farmacêutica LTDA), e um derivado poliênico: anfotericina B (Cristalina Produtos Químicos Farmaceuticos LTDA) foram adquiridos sob a forma de pó.

Dos 296 isolados de leveduras adquiridos só foi possível realizar testes de microdiluição em 291, devido a exclusão de dois isolados de *C. albicans* e três isolados de *C. parapsilosis* por ausência de crescimento nos controles positivos dos testes.

4.7.1 Preparo das Soluções Padrões

Soluções padrões de itraconazol, cetoconazol e anfotericina B, na concentração de $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foram preparadas separadamente por solubilidade do pó de cada uma dessas drogas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Isofar, RJ, Brasil). Para a preparação da solução-estoque de fluconazol na concentração de $6400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o pó da droga foi solubilizado em água. Para ter certeza da esterilidade das soluções padrões, foi necessário filtrá-las através de uma membrana-filtro 0,22 μm (TPP) e posteriormente armazená-las em frascos de polipropileno estéreis selados e guardados em temperatura -20°C .

4.7.2 Preparo do Meio de Cultivo

Foi utilizado o meio sintético RPMI-1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e com indicador de pH vermelho de fenol (Gibco), tamponado com ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico – MOPS (Vetec) a pH 7,0 e temperatura de 25°C. A esterilização do meio foi realizada por filtração em membrana com poros de 0,22 µm. O meio foi armazenado em frascos estéreis de 1 litro, sob refrigeração à 4°C.

4.7.3 Número de Concentrações Testadas

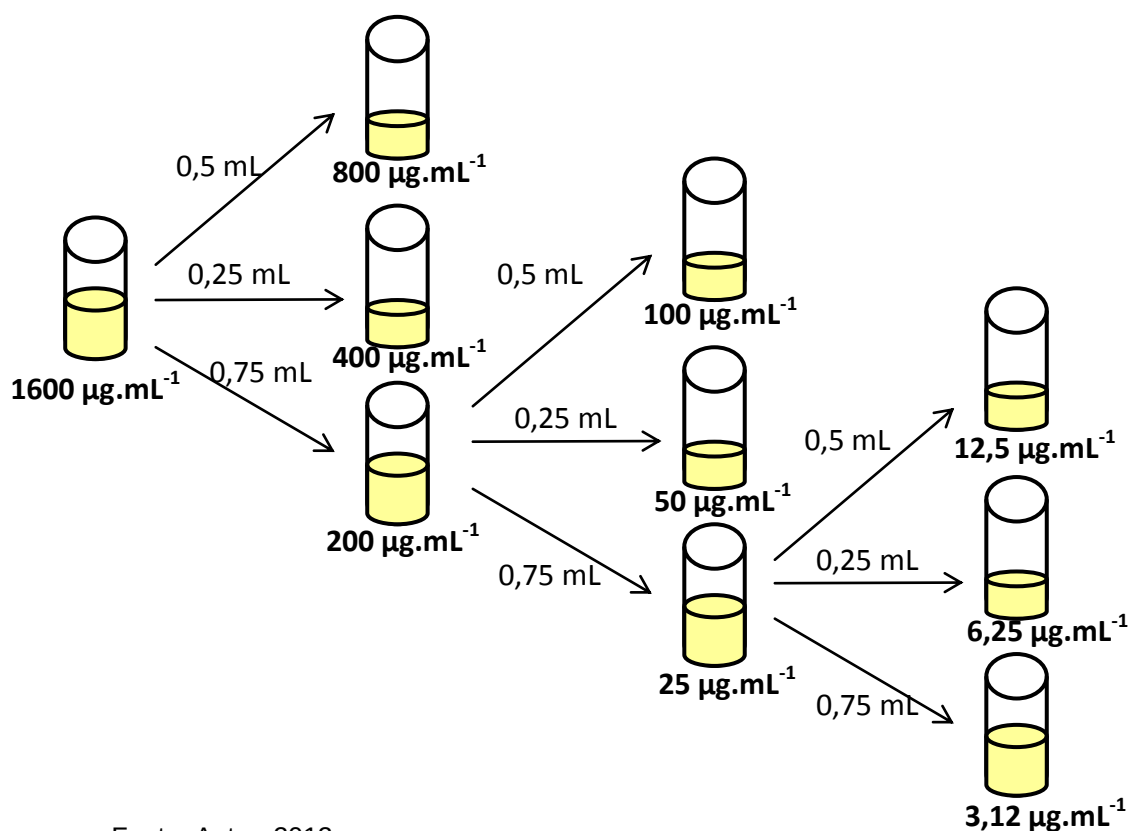
As concentrações testadas abrangeram as concentrações dos pontos de corte e as referentes aos resultados esperados para as cepas controle de qualidade. Foram testados os seguintes intervalos de concentração das drogas: anfotericina B – de 0,0313 a 16 µg.mL⁻¹; cetoconazol – de 0,0313 a 16 µg.mL⁻¹; itraconazol – de 0,0313 a 16 µg.mL⁻¹ e fluconazol – de 0,125 a 64 µg.mL⁻¹.

4.7.4 Preparo de Diluições de Agentes Antifúngicos

4.7.4.1 Antifúngicos não Solúveis em Água

A partir da solução-estoque de itraconazol, cetoconazol e anfotericina B (1600 µg.mL⁻¹), prepararam-se, inicialmente, 10 diluições seriadas em DMSO a uma concentração 100 vezes superior à concentração final do ensaio (1600 µg.mL⁻¹– 3,12 µg.mL⁻¹) (**Figura 9**). Em seguida, realizou-se uma diluição a 1: 50 em RPMI-1640, produzindo uma concentração de antifúngicos duas vezes a concentração final de ensaio.

Figura 9: Esquema para as diluições de antifúngicos insolúveis em água.

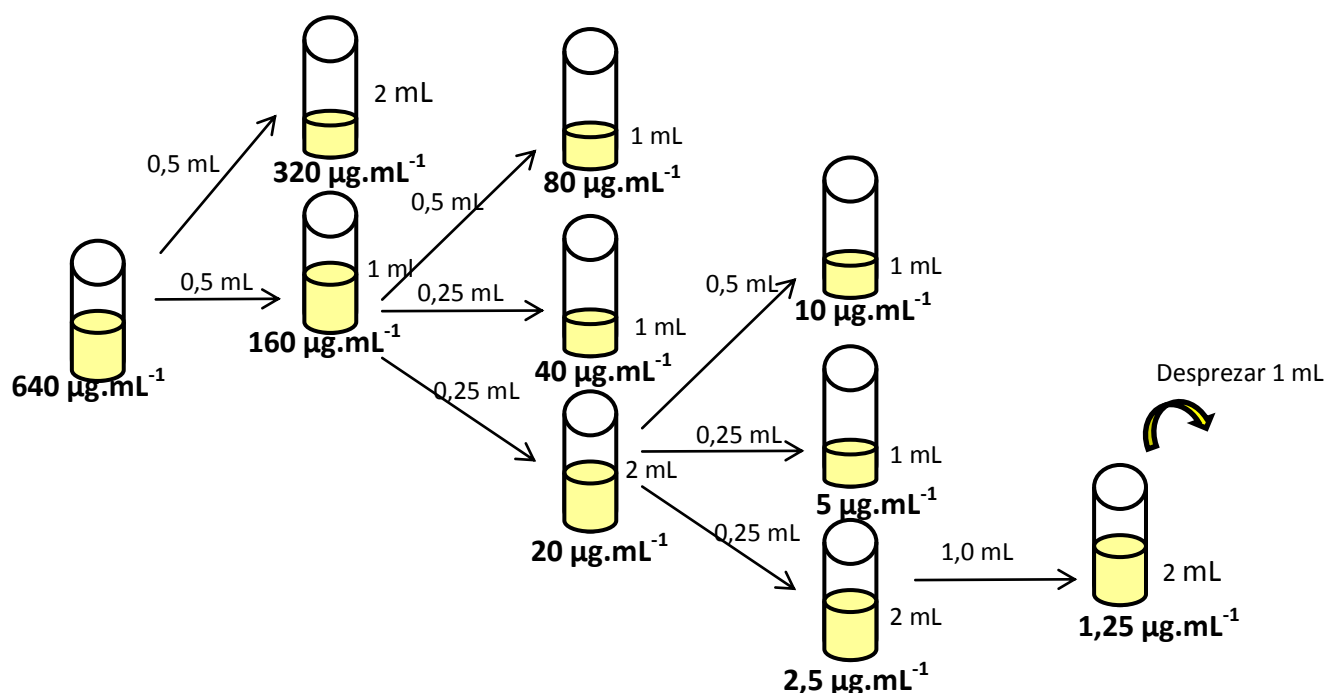


Fonte: Autor, 2012.

4.7.4.2 Drogas Solúveis em Água

A partir da solução-estoque do fluconazol, foi preparado uma série de 10 diluições a uma concentração 10 vezes superior à concentração final de ensaio (640 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ - 0,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (**Figura 10**). Consecutivamente, uma diluição a 1:5 foi realizada, acrescentando-se RPMI-1640 às 10 diluições seriadas, o que produziu uma concentração duas vezes superior à concentração de ensaio.

Figura 10: Esquema para as diluições de antifúngicos solúveis em água.



Fonte: Autor, 2012.

4.7.5 Preparo do Inóculo

Foi realizado repique das leveduras em ágar de Sabouraud Dextrose, incubados a 35°C, por 24 horas. Com uma alça, foram coletadas de 1 a 5 colônias de cada isolado, suspendendo-as em 5 mL de solução salina estéril a 0,85%. A suspensão foi calibrada de forma a se obter absorbância equivalente a 0,5 da escala de McFarland em comprimento de onda de 530nm, o que corresponde a concentração de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Para produzir uma concentração celular entre $1-5 \times 10^3$ UFC/mL, essa suspensão foi diluída de 1:50 em solução salina estéril e, em seguida, diluída de 1:20 em RPMI-1640.

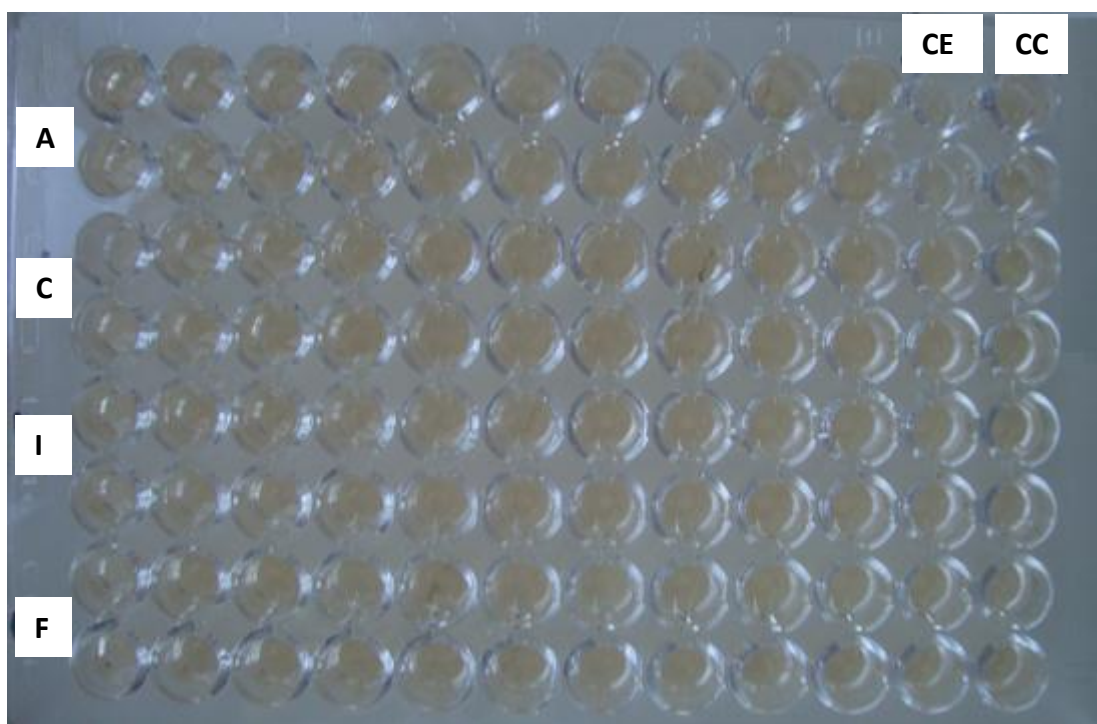
4.7.6 Incubação

Os testes de microdiluição foram realizados em placas de microdiluição estéreis e com tampa (Falcon 3072, Becton Dickinson, Lincoln Park, N.J.), com

múltiplos poços (96 poços em forma de U). Alíquotas de 100 µl das diluições das drogas (2x concentradas) foram dispensadas nos poços da fileira 1 a 10 nas placas de microdiluição. A fileira 1 continha a maior concentração da droga, e a fileira 10, a menor.

Após a padronização do inóculo, foi acrescentado a cada poço da placa 100 µl da suspensão 2x concentrada do inóculo, o que levou as diluições das drogas e dos inóculos desejadas. Os poços da coluna 11 foram preenchidos com 200 µl de RPMI-1640 para controle de esterilidade (CE), e os poços da coluna 12 foram preenchidos com 100 µl de RPMI-1640 e 100 µl da solução do inóculo para controle de crescimento (CC). Foi utilizada uma amostra por placa, sendo testados os quatros antifúngicos: anfotericina B (A), cetoconazol (C), itraconazol (I) e fluconazol (F). Após o envase, as placas foram tampadas e incubadas a 35°C, por 24 horas. Cada teste foi realizado em duplicada (**Figura 11**).

Figura 11: Inoculação das placas de microdiluição pela metodologia do CLSI.



Fonte: Autor, 2012.

CE - controle de esterilidade, CC - controle de crescimento, A – anfotericina B, C – cetoconazol, I – itraconazol e F - fluconazol.

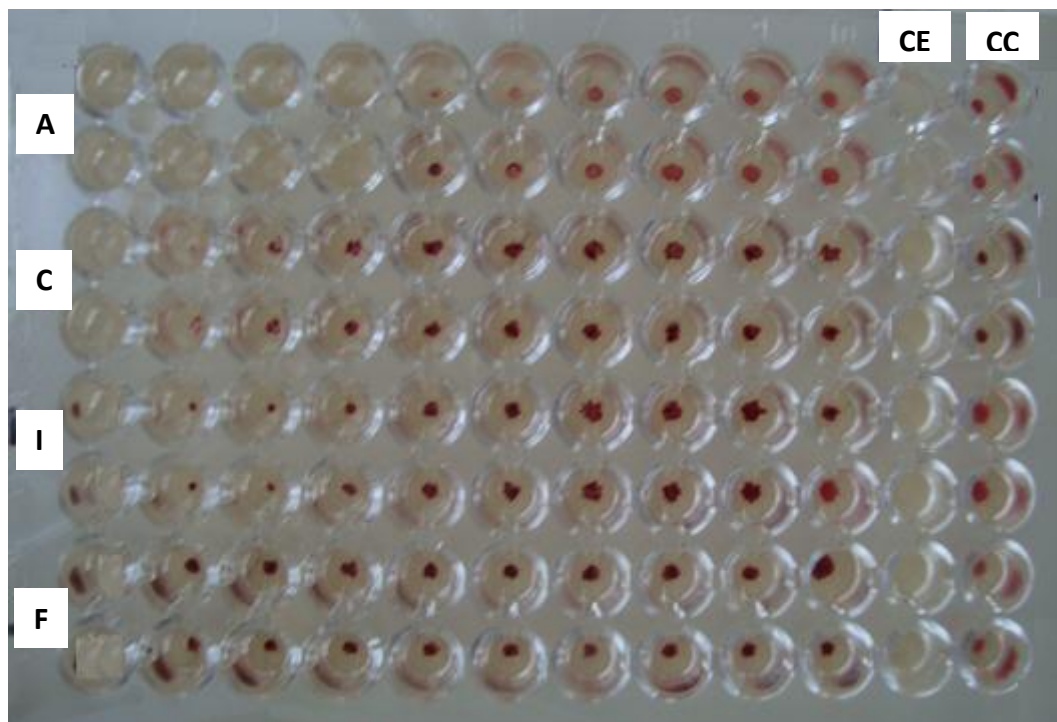
4.7.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Decorrido o período de incubação foi determinado a CIM. Posteriormente acrescentou-se a cada um dos poços, 20µl de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifênil tetrazolium; VETEC) a 0,5%, e as microplacas foram reincubadas por mais três horas, a 35°C segundo CLSI, 2002 modificado por Guedes e colaboradores (2009). Este procedimento foi realizado para melhor visualização do crescimento fúngico, com a presença de uma coloração vermelha nos orifícios (**Figura 12**).

Após esta última incubação, foi realizada a leitura dos poços comparando visualmente o crescimento dos microrganismos do poço-controle com o crescimento dos outros poços, com as diferentes concentrações testadas. A menor concentração capaz de induzir proeminente inibição do crescimento da levedura testada em relação ao poço-controle foi considerada, então, como a concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico.

A interpretação dos resultados das CIMs, efetuada de acordo com o CLSI (2002), considera o isolado sensível ao fluconazol se $CIM \leq 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sensível dose dependente (SDD) entre 16 e $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e resistente $\geq 64 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para o itraconazol os isolados foram considerados sensíveis quando $CIM \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$, SDD se $CIM 0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e resistente se $CIM \geq 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para anfotericina B, considerou-se sensível $CIM \leq 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e resistente $CIM > 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O cetoconazol não é determinado pelo CLSI, por isso foi comparado com os valores considerados em outros estudos (DOTA et al., 2011), que consideram resistente $CIM \geq 1 \mu\text{g/mL}$.

Figura 12: Leitura das placas de microdiluição pela metodologia do CLSI com solução aquosa TTC.



Fonte: Autor, 2012.

CE - controle de esterilidade, CC - controle de crescimento, A – anfotericina B, C – cetoconazol, I – itraconazol e F - fluconazol.

4.8 Análise Estatística

As variáveis do estudo foram analisadas utilizando a distribuição de frequências simples, média e desvio padrão. A correlação entre as variáveis foi avaliada pelo teste do χ^2 e teste de Fisher bicaudal em tabelas de contingência de dupla entrada. O nível de significância estatística escolhido foi de 0,05 (valor de p). Os testes foram calculados com auxílio dos *softwares* Excel 2010, GraphPad Prism 5 by aGa e PASW Statistics 18.

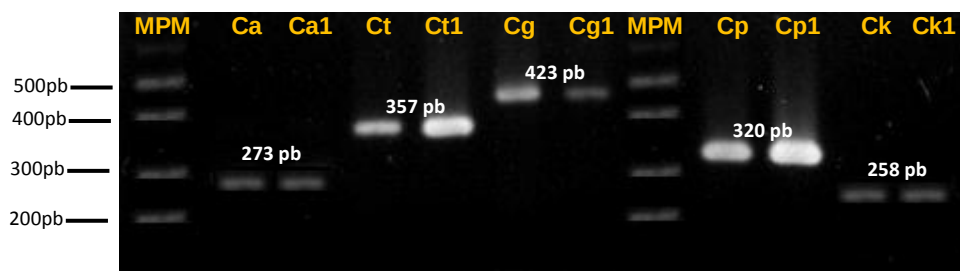
5 RESULTADOS

5.1 Frequência das Leveduras em Cultura de Secreção Vaginal e Identificação em nível de Espécie

Durante Março a Dezembro de 2010, foram coletadas 2092 amostras de secreção vaginal. Destas, 16% (384/2092) apresentaram cultura positiva para leveduras. Das quais foram excluídas 88 culturas positivas por não estarem de acordo com os critérios de inclusão do estudo.

Todos os 296 isolados de leveduras foram identificados como pertencentes ao gênero *Candida* com iniciadores espécie-específicos para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (**Figura 13**).

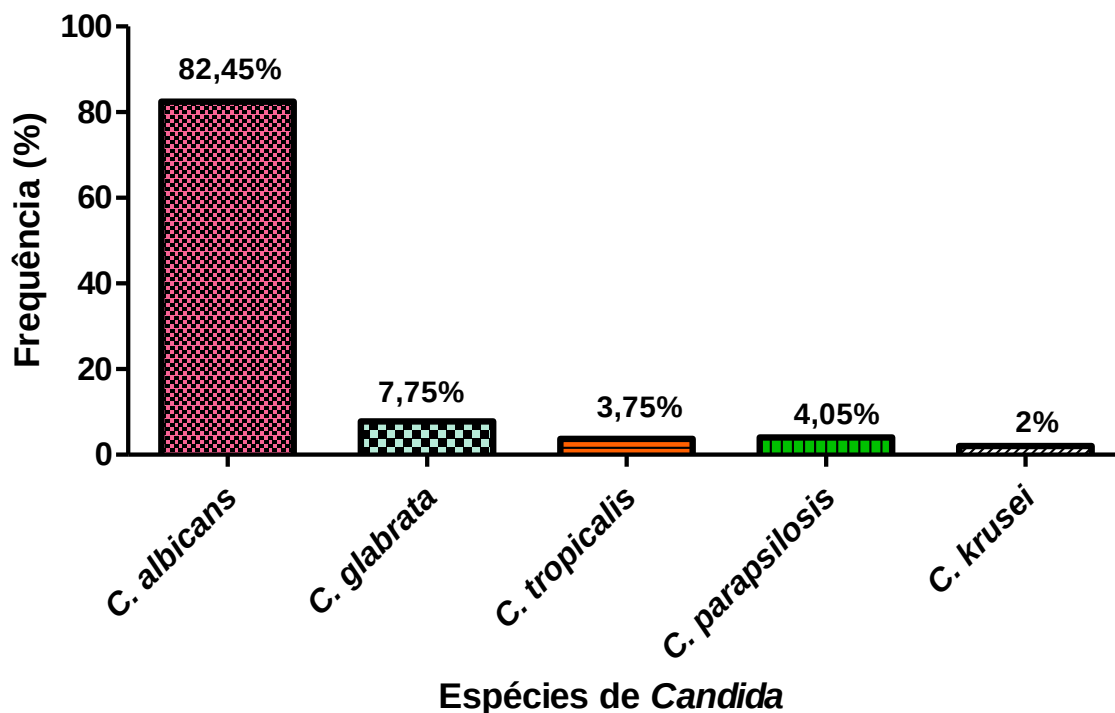
Figura 13 – Gel de agarose a 1,0 % com produtos da amplificação obtidos pela PCR de leveduras de secreção vaginal e cepas padrão.



MPM - Marcador de peso molecular de 100 pb; Ca – padrão *C. albicans*; Ca1 – isolado *C. albicans*; Cg – padrão *C. glabrata*; Cg1 – isolado *C. glabrata*; Ct – padrão *C. tropicalis*; Ct1 – isolado *C. tropicalis*; Cp – padrão *C. parapsilosis*; Cp1 – isolado *C. parapsilosis*; Ck – padrão *C. krusei* Ck1 – isolado.

Das espécies de *Candida* identificadas, *C. albicans* foi a mais frequente com 82,45% (244/296) dos isolados e entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. glabrata* foi a mais representativa com 7,75% (23/296) dos isolados (**Figura 14**).

Figura 14: Distribuição da frequência das espécies de *Candida* isoladas da secreção vaginal durante Março a Dezembro de 2010.



5.2. Distribuição das Espécies por Sintomas Clínicos, Faixas Etárias e Fatores Predisponentes

5.2.1 Sintomas Clínicos

Em relação à presença de sintomas clínicos nas pacientes com CVV, apenas 12,84% (38/296) não apresentaram sintomas. Houve relação significativa entre a presença de sintomas e a distribuição das espécies ($p = 0,026$). Os casos sintomáticos foram mais evidentes clinicamente nas infecções causadas por *C. albicans* ($p = 0,01$) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Distribuição da frequência de casos sintomáticos e assintomáticos em pacientes com candidíase vulvovaginal por espécies de *Candida* durante Março a Dezembro de 2010.

Casos	Espécies de <i>Candida</i>					Total %(N)
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	
	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	
Sintomáticos	89,75 (219)	78,26 (18)	72,73 (8)	75 (9)	66,67 (4)	87,16 (258)
Assintomáticos	10,25 (25)	21,74 (5)	27,27 (3)	25 (3)	33,33 (2)	12,84 (38)
Total %(N)	244	23	11	12	6	296

% (N) percentual e número de indivíduos estudados.

Dos 258 casos sintomáticos, corrimento ($p < 0,0001$) foi o principal sintoma clínico em todas as espécies de *Candida*, manifestando-se em 77,13% (199/258) das pacientes com CVV, como observado na **Tabela 2**. Em 57% (147/258) dos casos de CVV, as pacientes se queixaram da presença de mais de um sintoma.

Nas CVVs causadas por *C. albicans* foram evidenciados todos os sintomas clínicos com diferença significativa ($p < 0,0001$) em relação às outras espécies (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Distribuição das manifestações clínicas em pacientes com candidíase vulvovaginal por espécies de *Candida* durante Março a Dezembro de 2010.

SINTOMAS	Espécies					Total % (N)
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	
	% (N) ^a	% (N) ^b	% (N) ^c	% (N) ^d	% (N) ^e	
Prurido	59,36 (130)	50 (9)	62,5 (5)	44,44 (4)	75 (3)	58,53 (151)
Corrimento	76,71 (168)	83,33 (15)	75 (6)	66,66 (6)	100 (4)	77,13 (199)
Ardor	30,27 (66)	11,11 (2)	37,5 (3)	33,33 (3)	25 (1)	29,07 (75)
Dispareunia	6,84 (15)	11,11 (2)	12,5 (1)	11,11 (1)	0	7,36 (19)
Disúria	2,74 (6)	0	0	0	0	2,32 (6)
Total (N)	219	18	8	9	4	258

% (N) percentual e número de isolados.

Valor de p determinado por teste exato de Fisher, IC=95.

$p < 0,0001$ para a em relação b, c, d, e.

5.2.2 Faixa Etária

A média de idade das pacientes com CVV foi de $29,7 \pm 9,5$ anos, variando de 10 a 67 anos.

C. albicans obteve maior frequência na faixa etária entre 22 a 27 anos das pacientes com CVV ($p < 0,0001$) e decresceu com o aumento da idade em relação às outras espécies. Na faixa etária de 28 a 33 anos foi possível observar uma maior quantidade de pacientes com CVV causadas por espécies não-*albicans*, com destaque para *C. tropicalis* em 36,36% (4/11) dos adultos jovens (< 33 anos) e *C. glabrata* em 39,13% (39/23) das mulheres com meia idade (34 a 51 anos). Amostras positivas para *C. parapsilosis* também foram observadas em idades mais avançadas (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Distribuição das faixas etárias de pacientes com candidíase vulvovaginal por espécies de *Candida* durante Março a Dezembro de 2010.

Espécies	Todas as idades (N)	Faixa Etária									
		10-15 % (N)	16 – 21 % (N)	22-27 % (N)	28-33 % (N)	34-39 % (N)	40-45 % (N)	46-51 % (N)	52-57 % (N)	58-63 % (N)	64-69 % (N)
<i>C. albicans</i>	244	6,56 (16)	12,3 (30)	27,05 (66)	26,23 (64)	13,11 (32)	9,02 (22)	4,51 (11)	0,82 (2)	0	0,41 (1)
<i>C. glabrata</i>	23	0	13,04 (3)	17,39 (4)	30,43 (7)	17,39 (4)	13,04 (3)	8,69 (2)	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	11	18,18 (2)	0	18,18 (2)	36,36 (4)	9,09 (1)	18,18 (2)	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	12	0	8,33 (1)	16,66 (2)	33,33 (4)	16,66 (2)	16,66 (2)	0	0	0	8,33 (1)
<i>C. krusei</i>	6	0	0	33,33 (2)	33,33 (2)	0	33,33 (2)	0	0	0	0
Total % (N)	296	6,08 (18)	11,49 (34)	25,67 (76)	27,36 (81)	13,17 (39)	10,47 (31)	4,39 (13)	0,67 (2)	0	0,67 (2)

% (N) percentual e número de indivíduos estudados.

5.2.3 Fatores Predisponentes

Todas as pacientes apresentaram no mínimo um fator predisponente associado aos casos de CVV (**Tabela 4**).

Entre os fatores de riscos pesquisados, gravidez foi o mais frequente nos casos de CVV ($p < 0,05$). Na distribuição dos fatores predisponentes por espécies não houve diferença estatisticamente significativa (**Tabela 4**).

Tabela 4: Distribuição dos fatores de risco nas 296 pacientes com candidíase vulvovaginal por espécies de *Candida* durante Março a Dezembro de 2010.

Características	<i>C. albicans</i> %(N)	<i>C. glabrata</i> %(N)	<i>C. tropicalis</i> %(N)	<i>C. parapsilosis</i> %(N)	<i>C. krusei</i> %(N)	Total %(N=296)
Histórico de CVV ^a						
Sim	17,2 (42)	8,7 (2)	9,1 (1)	8,3 (1)	0	15,54 (46)
Não	82,8 (202)	91,3 (21)	90,9(10)	91,7 (11)	100 (6)	84,46 (250)
Diabética ^b						
Sim	0,8 (2)	4,3 (1)	0	8,3 (1)	0	1,35 (4)
Não	99,2 (242)	95,7 (22)	100 (11)	91,7 (11)	100 (6)	98,65 (292)
Tratamento antifúngico ^c						
Sim	15,6 (38)	8,7 (2)	18,2 (2)	8,3 (1)	0	14,53 (43)
Não	84,4 (206)	91,3 (21)	81,8 (9)	91,7 (11)	100 (6)	85,47 (253)
Gravidez ^d						
Sim	25,4 (62)	26,1 (6)	18,2 (2)	16,7 (2)	16,7 (1)	24,66 (73)
Não	74,6 (182)	73,9 (17)	81,8 (9)	83,3 (10)	83,3 (5)	75,34 (223)
Distúrbio Hormonal ^e						
Sim	0,8 (2)	0	0	0	0	0,68 (2)
Não	99,2 (242)	100 (23)	100 (11)	100 (12)	100 (6)	99,32 (294)

%(N) percentual e número de indivíduos estudados.

^a $p = 0,7704$ ^b $p = 0,1435$ ^c $p = 0,8145$ ^d $p = 0,9763$ ^e $p = 1,000$

5.3 Avaliação da Susceptibilidade aos Antifúngicos

As espécies de *Candida* apresentaram elevada resistência *in vitro* ao itraconazol em 89,7% (261/291) dos isolados, fluconazol em 52,6% (153/291) e anfotericina B em 66,7% (194/291). O cetoconazol foi o antifúngico mais ativo contra 78,7% (229/291) dos isolados, com intervalo de CIM variando de 0,0313 – 16 µg.mL¹.

Entre os imidazólicos, itraconazol foi o antifúngico menos ativo, principalmente frente aos isolados de *C. albicans* (88,85%), *C. glabrata* (100%) e *C. parapsilosis* (88,89%) (**Tabela 5**).

Em *C. krusei*, o antifúngico que não apresentou ação foi anfotericina B, sendo 100% dos isolados resistentes. Os isolados de *C. tropicalis* apresentaram a mesma proporção de resistência aos antifúngicos anfotericina B e itraconazol (**Tabela 5**).

As espécies que apresentaram sensibilidade dose dependente frente ao fluconazol (CIM 16 - 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi observada com maior frequência entre os isolados de *C. krusei* (50%) e *C. glabrata* (39,13%) (**Tabela 5**).

Cetoconazol foi o antifúngico mais eficaz contra às espécies de *Candida* estudadas, obtendo até 100% de sensibilidade para *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, frente ao qual somente 21,3% dos isolados foram resistentes. Este tipo de resistência foi encontrada principalmente entre os isolados de *C. albicans* e *C. glabrata* (**Tabela 5**).

Tabela 5 : Intervalo de concentração inibitória mínima, valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ e percentual de susceptibilidade para anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e fluconazol estratificados por espécies fúngicas segundo a metodologia de microdiluição em caldo do CLSI.

Espécies Fúngicas	Antifúngicos	Intervalo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CIM ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CIM ₉₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Susceptibilidade		
					% S	% SDD	% R
<i>C. albicans</i> (n=242)	Anfotericina B	0,25 – 16	1,32	5,32	36,77	0	63,23
	Cetoconazol	0,0313 – 16	7,85	15,25	76, 3	0	23,97
	Itraconazol	0,0625 – 16	6,84	15,42	1,65	9,50	88,85
	Fluconazol	0,125 – 64	7,64	15,55	38,44	3,71	57,85
<i>C. glabrata</i> (n=23)	Anfotericina B	1 – 16	1,42	5,74	8,70	0	91,30
	Cetoconazol	0,125 – 16	2,29	6,81	86,96	0	13,04
	Itraconazol	1 – 16	4,79	12,13	0	0	100
	Fluconazol	0,5 – 64	3,93	8,95	34,78	39,13	26,09
<i>C. krusei</i> (n=6)	Anfotericina B	2 – 16	2,27	7,65	0	0	100
	Cetoconazol	0,0313 – 16	3,17	7,20	100	0	0
	Itraconazol	0,25 – 16	1,80	6,09	0	16,67	83,33
	Fluconazol	1 – 64	1,96	6,44	50	50	0
<i>C. parapsilosis</i> (n=9)	Anfotericina B	0,25 – 2	1,34	5,25	55,56	0	44,44
	Cetoconazol	0,0313 – 4	4,92	9,46	100	0	0
	Itraconazol	0,5 – 16	2,50	7,54	0	11,11	88,89
	Fluconazol	0,5 – 64	3,93	8,95	77,78	11,11	11,11
<i>C. tropicalis</i> (n=11)	Anfotericina B	1 – 4	1,25	5,39	9,09	0	90,91
	Cetoconazol	0,0313 – 16	5,78	11,50	90,91	0	9,09
	Itraconazol	0,0313 – 16	4,53	10,87	9,09	0	90,91
	Fluconazol	0,125 - 64	6,08	13,55	27,27	18,18	54,55

% S – percentual de sensível ; % SDD - percentual de sensível dose dependente (fluconazol 16-32 e itraconazol 0,25-05); % R – percentual de resistência (fluconazol ≥ 64 e itraconazol ≥ 1). Critério de interpretação de acordo com CLSI. CIM₅₀ - concentração inibitória mínima para 50% dos isolados. CIM₉₀ - concentração inibitória mínima para 90% dos isolados.

5.4 Análise de Perfis de PCR – *Fingerprinting*

Nos perfis obtidos utilizando a reação de PCR com iniciador único (GTG)₅, foi evidenciada alta variabilidade intraespecífica entre os isolados da mesma espécie, o que resultou na elevada capacidade discriminativa da metodologia aplicada.

Para permitir uma melhor análise dos dendrogramas de algumas espécies, os isolados foram agrupados a partir de um nível de corte de 40%, 60% ou 75% de similaridade, escolhido de forma arbitrária após a análise de vários dendrogramas.

5.4.1 Tipagem Molecular de *C. krusei*

A amplificação com (GTG)₅ nos seis isolados da espécie *C. krusei* apresentou alta diversidade genética ($0,8000 \pm 0,1721$), produzindo quatro padrões genéticos distintos, que variaram de 12 a 14 fragmentos com peso molecular entre 300 e 1400 pb.

Foram formados três grupos, com nível de semelhança de 74% entre o grupo I e o grupo II e de 76% no grupo III quando comparado aos demais (**Figura 15**).

Figura 15 - Dendrograma dos perfis de amplificação com o iniciador (GTG)₅ em isolados de *Candida krusei*, construído utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard e método de agrupamento UPGMA.



Dois isolados do grupo III se relacionaram com similaridade de 80%, destes, 50% apresentaram perfil de resistência para anfotericina B e itraconazol (**Tabela 6**).

No grupo I os três isolados apresentam 100% de similaridade genética e exibiram o mesmo perfil de resistência para anfotericina B e de sensibilidade ao cetoconazol e fluconazol. A média de idade das pacientes que apresentavam esses isolados foi de 28 anos, todas relataram corrimento como a principal queixa clínica e gravidez em 33,3% dos casos.

Não foi observada relação entre os padrões genéticos de *C. krusei* e a resistência ao antifúngico itraconazol, para os outros não foi realizada análise estatística, pois a variável apresenta valor constante.

Tabela 6: Distribuição dos padrões e perfil de resistência aos antifúngicos testados nos isolados de *Candida krusei*.

Grupos	Padrões	Isolados	Fenótipo de Resistência			
			Anfotericina B % (N)	Cetoconazol % (N)	Itraconazol ^a % (N)	Fluconazol % (N)
I	P1	17, 130,282	100 (3)	0	66,6 (2)	0
II	P2	247	100 (1)	0	100 (1)	0
III	P3 e P4	13, 279	100 (2)	0	50 (1)	0

% (N) percentual e número de isolados.

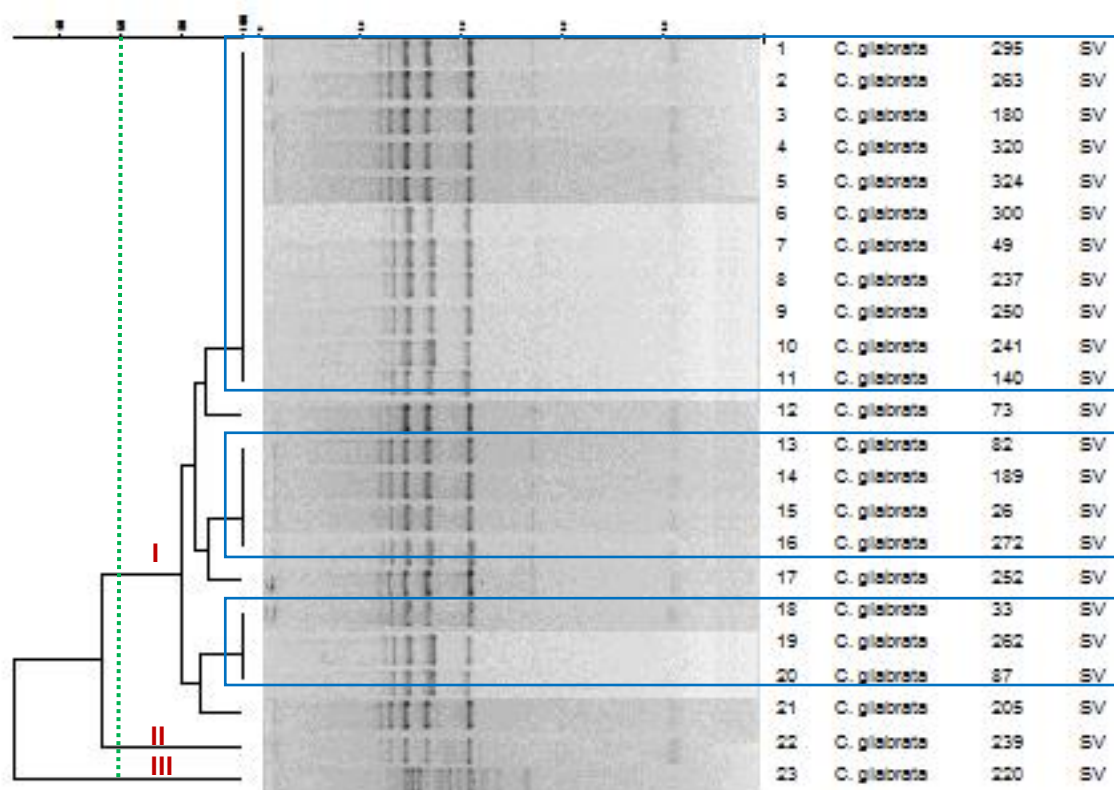
^a $p = 0,60$

5.4.2 Tipagem Molecular de *C. glabrata*

Na análise do dendrograma de vinte e três isolados de *C. glabrata*, o método de tipagem com o (GTG)₅ apresentou baixa diversidade genética quando comparado as outras espécies ($0,7470 \pm 0,0822$), por ter sido gerado apenas oito padrões genéticos distintos que apresentaram perfis de 6 a 14 bandas entre 200 a 1300 pb. (**Figura 16**).

Ao nível de 80% de semelhança o grupo I representou a maioria dos isolados com 91,3% (21/23) e apresentavam perfil de resistência para o itraconazol em 100% dos isolados (**Tabela 7**).

Figura 16 - Dendrograma dos perfis de amplificação com o iniciador (GTG)₅ em isolados de *Candida glabrata*, construído utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard e método de agrupamento UPGMA.



O grupo II é constituído por apenas um isolado e se assemelha 54% com o grupo I. O grupo III apresentou pouco relacionamento aos outros grupos, o que correspondeu apenas 25% de similaridade, foi obtido de uma paciente grávida, sintomática e apresentou perfil de resistência para anfotericina B e itraconazol (**Tabela 7**). Não foi evidenciada relação entre o perfil de resistência aos antifúngicos e os padrões genéticos gerados.

O padrão P1 constituído de onze isolados que apresentaram perfis idênticos, destes, 81,8% (9/11) exibiram resistência a anfotericina B e 100% ao itraconazol (11/11). As pacientes tinham média de idade de 32,6, apresentavam sintomas em 90,9% (10/11), gravidez em 27,3% (3/11) e uma relatou caso anterior de CVV com tratamento antifúngico.

Os padrões P3 (quatro isolados) e P5 (três isolados) apresentaram 100% de similaridade genética entre seus isolados, com perfil de resistência para anfotericina B (100%) e itraconazol (100%).

Tabela 7 : Distribuição dos padrões genéticos e perfil de resistência aos antifúngicos testados nos isolados de *Candida glabrata*.

Grupos	Padrões	Isolados	Fenótipo de Resistência			
			Anfotericina B ^a % (N)	Cetoconazol ^b % (N)	Itraconazol ^c % (N)	Fluconazol ^d % (N)
I	P1, P2, P3, P4, P5, P6	295, 263, 180, 320, 324, 300, 49, 237, 250, 241, 140, 73, 82, 189, 26, 272, 252, 33, 262, 87, 205	90,47 (19)	4,76 (1)	100 (21)	28,57 (6)
II	P7	SV 239	100 (1)	100 (1)	100 (1)	0
III	P8	SV 220	100 (1)	0	100 (1)	0

% (N) percentual e número de isolados.

^a $p=0,999$

^b $p=0,11$

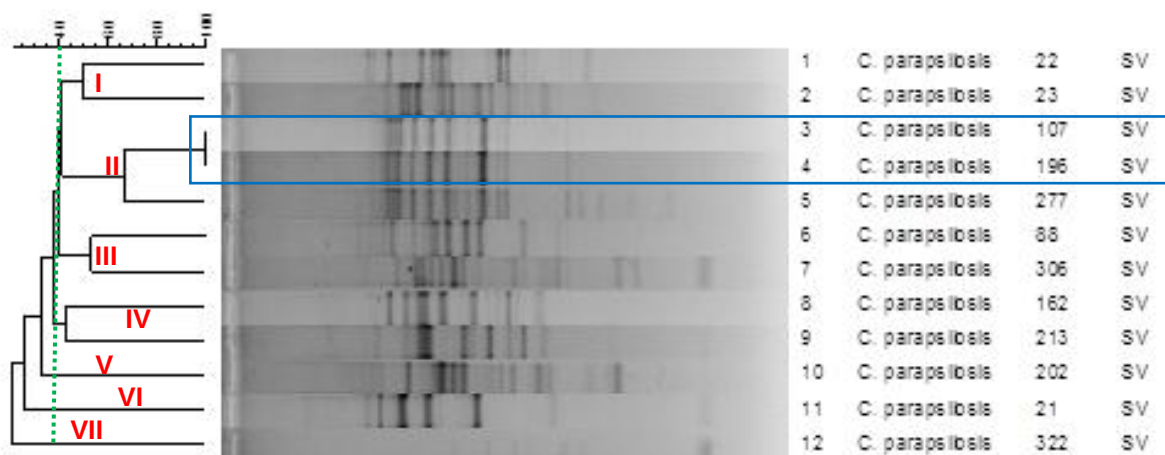
^c Não foi possível realizar análise estatística a variável apresenta valor constante.

^d $p=0,697$

5.4.3 Tipagem Molecular de *C. parapsilosis*

O método de tipagem com o microssatélite (GTG)₅ apresentou alta diversidade genética ($0,9848 \pm 0,0403$) entre os 12 isolados de *C. parapsilosis*. Foi possível observar a formação de 11 padrões genéticos distintos, os fragmentos gerados pela amplificação foram de 7 a 15 bandas entre 300 e 1300 pb.

Figura 17 - Dendrograma dos perfis de amplificação com o iniciador (GTG)₅ em isolados de *Candida parapsilosis*, construído utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard e método de agrupamento UPGMA.



Os isolados foram incorporados em sete grupos com similaridade de 40% entre si. Os dois isolados do grupo I se relacionaram com apenas 50% de

similaridade e apresentaram diferenças no perfil de resistência a anfotericina B e itraconazol observado apenas na amostra SV23 (**Tabela 8**).

Não foi possível observar relação entre os padrões genéticos de *C. parapsilosis* e a resistência aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e fluconazol com $p > 0,05$ (**Tabela 8**).

Tabela 8: Distribuição dos padrões genéticos e perfil de resistência aos antifúngicos testados nos isolados de *Candida parapsilosis*.

Grupos	Padrões	Isolados	Fenótipo de Resistência			
			Anfotericina B ^a	Cetoconazol ^b	Itraconazol ^c	Fluconazol ^d
			% (N)	% (N)	% (N)	% (N)
I	P1, P2	SV 22, 23	50 (1)	0	50 (1)	0
II	P3, P4	SV 196, 277, 107	0	0	50 (1)	0
III	P5, P6	SV 88, 306	0	0	50 (1)	0
IV	P7, P8	SV 162, 213	100 (2)	0	100 (2)	50 (1)
V	P9	SV 202	100 (1)	0	100 (1)	0
VI	P10	SV 21	100 (1)	0	100 (1)	0
VII	P11	SV 322	0	0	100 (1)	0

% (N) percentual e número de isolados.

^a $p= 1,0$

^b Não foi possível realizar análise estatística a variável apresenta valor constante.

^c $p= 0,999$

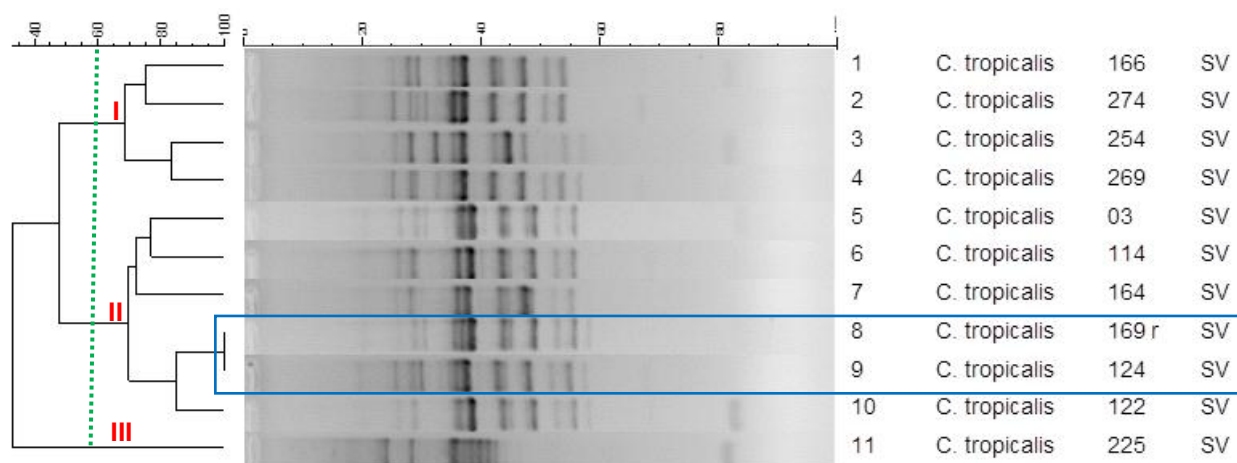
^d $p= 0, 999$

Dois isolados do grupo II se relacionaram com 100% de similaridade genética, estes, foram obtidos de pacientes com média de idade de 47 anos, com presença de sintomas em 50% (1/2) e ausência de fatores predisponentes. Os isolados apresentaram sensibilidade para anfotericina B, cetoconazol e fluconazol.

5.4.4 Tipagem Molecular de *C. tropicalis*

Dez padrões genéticos foram obtidos a partir dos 11 isolados de *C. tropicalis*, apresentando elevada diversidade genética ($0,9818 \pm 0,0463$). Na **Figura 18** se observa a formação de três grupos principais, com fragmentos que variaram de 9 a 12 bandas correspondendo entre 800 a 1400 pb.

Figura 18 - Dendrograma dos perfis de amplificação com o iniciador (GTG)₅ em isolados de *Candida tropicalis*, construído utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard e método de agrupamento UPGMA.



O único isolado do grupo III se assemelhou com 35% ao grupo I e II, apresentou perfil de resistência para anfotericina B, itraconazol e fluconazol e a pacientes relatou sintomas como ardor e dispareunia.

Os isolados do grupo I apresentaram aproximadamente 70% de similaridade, pôde-se observar a existência de alguns isolados compartilhando mais que 80% de similaridade, como o SV254 e SV269, ambos isolados apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade aos antifúngicos testados (**Tabela 9**).

No grupo II os isolados SV169 e SV124 apresentaram perfis idênticos, com 100% de resistência a anfotericina B e itraconazol. Uma paciente relatou está grávida, ter tido caso anterior de CVV e o isolado fúngico foi resistência ao fluconazol.

Na **Tabela 9** é possível observar os valores de *p* em relação a distribuição dos padrões genéticos e perfil de resistência aos antifúngicos testados nos isolados de *C. tropicalis*.

Tabela 9: Distribuição dos padrões genéticos e perfil de resistência aos antifúngicos testados nos isolados de *Candida tropicalis*.

Grupos	Padrões	Isolados	Fenótipo de Resistência			
			Anfotericina B ^a % (N)	Cetoconazol ^b % (N)	Itraconazol ^c % (N)	Fluconazol ^d % (N)
I	P1, P2, P3, P4	166, 274, 254, 269	100 (4)	0	100 (4)	75 (3)
II	P5, P6, P7, P8,P9	3, 114, 164, 169, 124, 122	83,3 (5)	16,7 (1)	83,3 (5)	33,3 (2)
III	P10	225	100 (1)	0	100 (1)	100 (1)

% (N) percentual e número de isolados.

^a $p=0,818$

^b $p=1,0$

^c $p=0,818$

^d $p=1,0$

5.4.5 Tipagem Molecular de *C. albicans*

Ao estudar a variabilidade genética entre os 244 isolados de *C. albicans* foram encontrados 172 padrões genéticos, revelando uma alta diversidade genética ($0,9963 \pm 0,0008$). Os fragmentos variaram de 12 a 20 bandas entre aproximadamente 400 a 1300 pb. Os isolados foram aliados a nível de 75% de semelhança em trinta e cinco grupos (**Figura 19**).

Os 46 isolados do grupo I foram divididos em três subgrupos (Ia, Ib e Ic). O subgrupo Ia constitui-se por 47,8% (22/46) dos isolados analisados, entre os quais se encontram com 80% de similaridade e representam 13 padrões genéticos, dos quais 6 exibem perfis idênticos. Ao nível de 85% de semelhança agrupam com o primeiro tipo os isolados que fazem parte do subgrupo Ib que inclui 23 dos 46 analisados 50,03% e representa 15 padrões distintos. O tipo Ic é constituído por apenas um isolado (2,17%) que se agrupa a um nível de 75% aos outros subgrupos.

O grupo VIII representou 18,85% (46/244) dos isolados que estão distribuídos em 26 padrões genéticos distintos. Foi subdividido VIIla e VIIlb, no primeiro os isolados se relacionam com 79% de similaridade e estão presentes nove padrões. No subgrupo VIIlb os isolados se assemelham com 80% de similaridade e oito padrões apresentam-se com 100% de similaridade.

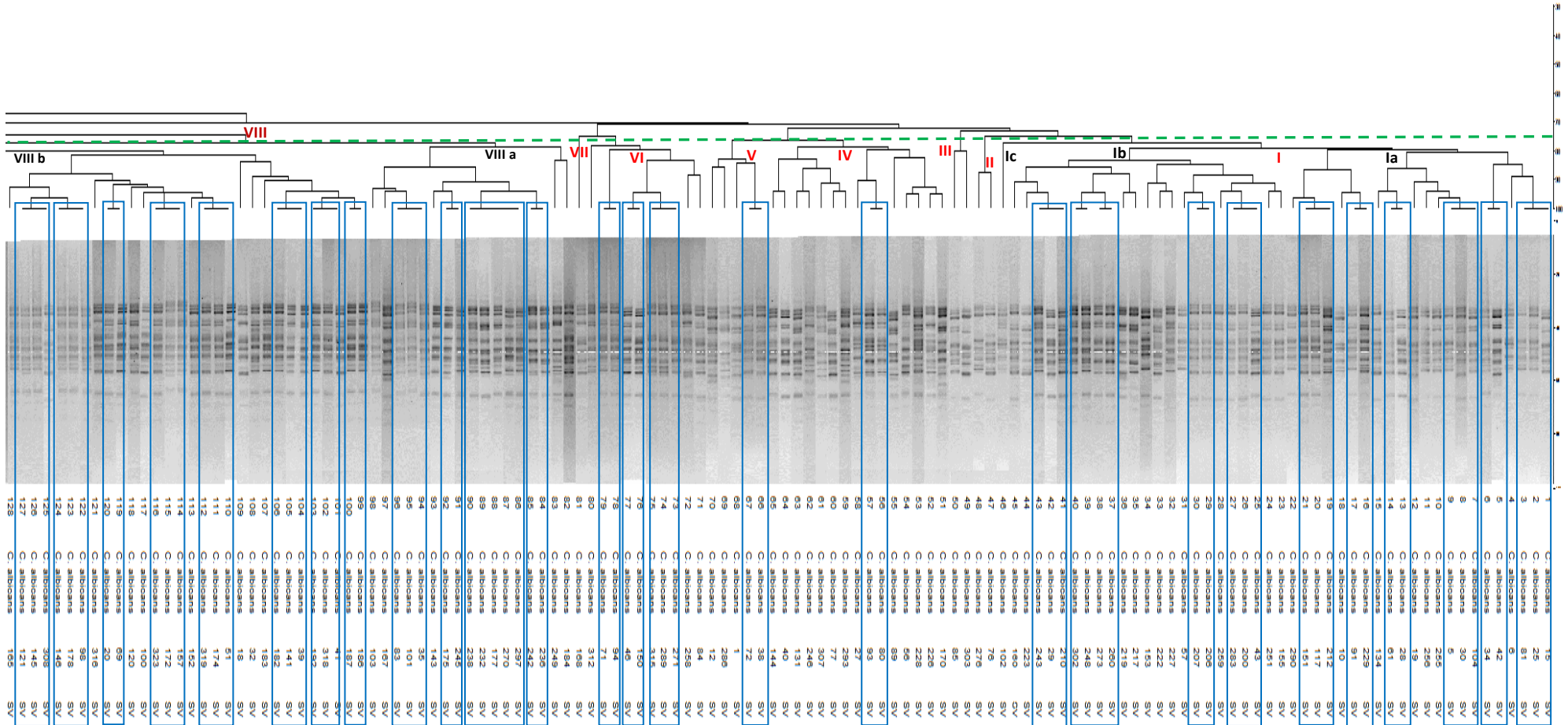
Entre os grupos formados, apenas os isolados do grupo III apresentaram 100% de resistência para anfotericina B e itraconazol e sensível para cetoconazol e fluconazol (**Tabela 10**). Quando avaliado cada padrão em relação ao perfil de resistência aos antifúngicos, não houve uma apresentação linear de resultados que pode ser avaliado na **Tabela 10**.

Dos 172 padrões gerados 44 (25,6%) apresentaram 100% de similaridade gênica entre os isolados pertencentes em cada perfil. O padrão genético oitenta e um foi determinado em dois isolados (SV178 e SV146) que apresentaram 100% de resistência para os antifúngicos testados nesse estudo. Foram isolados de pacientes com idade de 23 anos e 44 anos, mas apenas uma relatou presença de sintomas.

Quando analisados os isolados SV191 e SV193 encontrados no padrão cento e vinte um, observou-se perfil de resistência aos azólicos e poliênicos. Esses isolados eram provenientes de pacientes presentes na faixa de risco para aquisição de infecções fúngicas e que apresentavam sintomas, como prurido e corrimento, comumente encontrados nos quadros de vulvovaginites fúngicas.

Os isolados SV54 e SV55 pertencentes ao padrão cento e vinte e cinco apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B e cetoconazol e de resistência aos triazólicos (itraconazol e fluconazol). Esses isolados foram provenientes de secreção vaginal de duas pacientes com idades de 32 anos e 43 anos, que apresentavam queixa clínica de ardor e corrimento e não ofereciam fatores predisponentes para a aquisição de CVV.

Figura 19 - Dendrograma dos perfis de amplificação com o iniciador (GTG)₅ em isolados de *Candida albicans*, construído utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e método de agrupamento UPGMA.



Continuação da **Figura 19** apresentando dendrograma dos perfis de amplificação com o iniciador (GTG)₅ em isolados de *Candida albicans*, construído utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard e método de agrupamento UPGMA

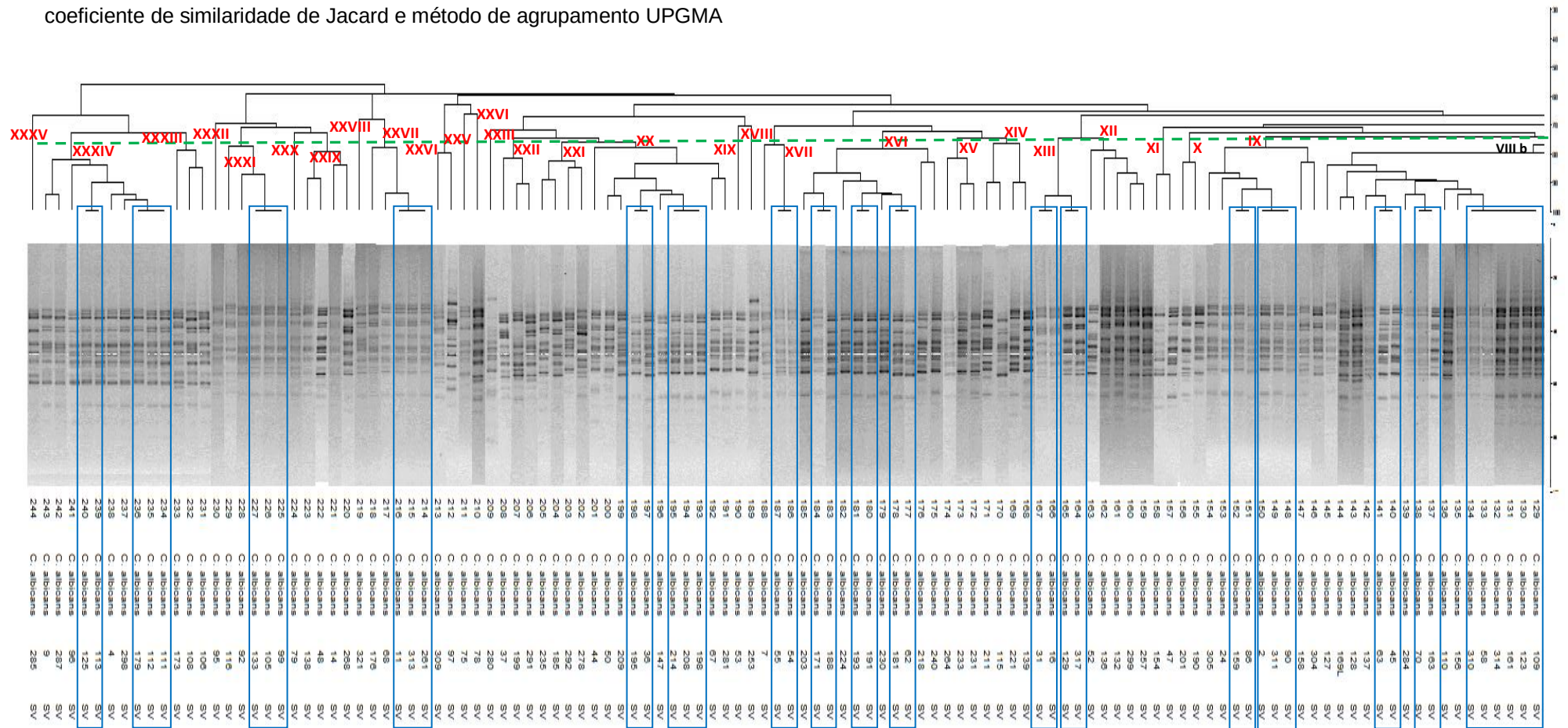


Tabela 10: Distribuição dos padrões genéticos e perfil de resistência aos antifúngicos testados nos isolados de *Candida. albicans*.

Grupos	Padrões	Isolados	Fenótipo de Resistência			
			Anfotericina B % (N)	Cetoconazol % (N)	Itraconazol % (N)	Fluconazol % (N)
I	P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29	15, 25, 81, 6, 42, 34, 104, 30, 5, 255, 256, 19, 28, 61, 134, 229, 91, 10, 212, 117, 151, 290, 155, 251, 43, 200, 283, 259, 206, 207, 57, 227, 222, 153, 217, 219, 260, 273, 248, 302, 210, 29, 243, 223, 160, 102	80,4 (37)	32,6 (15)	89,1 (46)	45,6 (21)
II	P30, P31	76, 276	100 (2)	0	100 (2)	50 (1)
III	P32, P33	303, 85	100 (2)	0	100 (2)	0
IV	P34, P35, P36, P37, P38, P39, P40, P41, P42, P43, P44, P45, P46, P47	170, 226, 228, 56, 89, 80, 93, 27, 293, 77, 307, 246, 131, 40, 144	53,3 (8)	13,3 (2)	73,3 (11)	33,3 (5)
V	P48, P49, P50, P51	38, 72, 1, 286, 12	60 (3)	0	40 (2)	60 (3)
VI	P52, P53, P54, P55, P56, P57	84, 258, 271, 289, 315, 150, 46, 94, 71, 312	50 (5)	10 (1)	60 (6)	100 (10)
VII	P58	168	0	100 (1)	100 (1)	100 (1)
VIIIa	P59, P60, P61, P62, P63, P64, P65, P66, P67	184, 249, 236, 242, 297, 270, 177, 232, 238, 245, 175, 143, 35, 101, 83, 167, 103	76,5 (13)	58,8 (10)	100 (17)	76,5 (13)
VIIIb	P68, P69, P70, P71, P72, P73, P74, P75, P76, P77, P78, P79, P80, P81, P82, P83, P84, P85, P86, P87, P88, P89, P90, P91, P92	186, 187, 41, 318, 192, 39, 141, 182, 183, 32, 18, 51, 174, 319, 152, 157, 172, 323, 100, 120, 69, 20, 316, 98, 178, 146, 308, 145, 121, 165, 109, 123, 161, 314, 58, 310, 156, 110, 163, 70, 284, 45, 63, 137, 128, 169L, 127,	68,1 (32)	25,5 (12)	53,2 (25)	55,3 (26)
IX	P93, P94, P95, P96, P97, P98	304, 158, 90, 311, 2, 86, 156, 24, 305	66,7 (6)	11, 1 (1)	88,9 (8)	55,5 (5)
X	P99, P100	190, 201	50 (1)	0	100 (2)	100 (2)
XI	P101, P102	47, 154	50 (1)	0	100 (2)	50 (1)
XII	P103, P104, P105, P106, P107	257, 299, 132, 136, 52	40 (5)	0	100 (5)	20 (1)
XIII	P108, P109	317, 129, 16, 31	100 (4)	25 (1)	75 (3)	75 (3)

% (N) percentual e número de isolados.

Continuação **Tabela 10:** Distribuição dos padrões genéticos e perfil de resistência aos antifúngicos testados nos isolados de *C. albicans*.

Grupos	Padrões	Isolados	Fenótipo de Resistência			
			Anfotericina B % (N)	Cetoconazol % (N)	Itraconazol % (N)	Fluconazol % (N)
XIV	P110, P111, P112, P113	139, 221, 115, 211	25 (1)	0	100 (4)	100 (4)
XV	P114, P115, P116,	231, 233, 264	33,3 (1)	0	66,6 (2)	66,6 (2)
XVI	P117, P118, P119, P120, P121, P122, P123, P124	240, 218, 62, 181, 230, 191, 193, 224, 188, 171, 203, 54, 55, 7	63,6 (7)	54,5 (6)	90,9 (10)	72,7 (8)
XVII	P125, P126	54, 55, 7	33,3 (3)	0	100 (3)	100 (3)
XVIII	P127	253	100 (1)	0	100 (1)	100 (1)
XIX	P128	53	0	0	100 (1)	0
XX	P129, P130, P131, P132, P133, P134, P135, P136	281, 67, 198, 208, 214, 147, 36, 195, 209, 50, 44	54,5 (6)	18,2 (2)	90, 9 (10)	36,4 (4)
XXI	P137, P138, P139, P140	278, 292, 185, 235	50 (2)	0	100 (4)	50 (2)
XXII	P141, P142, P143	291, 199, 37	33,3 (1)	0	100 (3)	100 (3)
XXIII	P144	280	0	0	0	0
XXIV	P145	78	0	0	100 (1)	0
XXV	P146	75	0	0	0	0
XXVI	P147, P148	97, 309	50 (1)	0	50 (1)	50 (1)
XXVII	P149, P150, P151	261, 313, 11, 68, 176	40 (2)	20 (1)	100 (4)	80 (3)
XXVIII	P152	321	100 (1)	0	100 (1)	100 (1)
XXIX	P153, P154, P155, P156	268, 14, 48, 138	75 (3)	25 (1)	75 (3)	50 (2)
XXX	P157	79	100 (1)	0	100 (1)	0
XXXI	P158, P159, P160	99, 105, 133, 92, 116	60 (3)	20 (1)	80 (4)	60 (3)
XXXII	P161	95	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)
XXXIII	P162, P163, P164	106, 108, 173	0	0	66,6 (2)	33,3 (1)
XXXIV	P165, P166, P167, P168, P169, P170, P171	111, 112, 179, 298, 4, 113, 125, 96, 287, 9	50 (5)	0	80 (8)	60 (6)
XXXV	P172	285	0	100 (1)	100 (1)	100 (1)

% (N) percentual e número de isolados.

6 DISCUSSÃO

6.1 Frequência das Leveduras em Cultura de Secreção Vaginal e Identificação em nível de Espécie

A distribuição de CVV tem sido observada em vários países, estudos realizados na Áustria, evidenciaram frequência de 30,4% (3184/10463) (PAULITSCH et al., 2006), na Inglaterra encontram maiores índices com 37% de CVV em mulheres na idade fértil (NYIRJESY, 2001). Quanto a sua distribuição na América Latina, foram analisados swabs vaginais de 5802 mulheres na Argentina, e a frequência de CVV observada foi em 21% (1218/5802) dos casos (ARECHAVALA et al., 2007).

No Brasil a frequência de vulvovaginites fúngicas vem emergindo a cada ano, neste trabalho o índice de vulvovaginites causadas por leveduras foram de 16% em um período de coleta de dez meses na cidade de Maceió-AL. Esta frequência é relativamente próxima ao encontrado por Camargo e colaboradores (2008), em estudo realizado no município de Santo Angelo – RS, com 88 swabs da mucosa vaginal, sendo possível isolar leveduras do gênero *Candida* em 18,18% (16/88) das amostras.

Um estudo realizado em Goiânia durante o ano de 2005, foram analisados 7004 exames citopatológicos de mulheres atendidas pelo sistema único de saúde, o que resultou em uma frequência relativamente mais baixa que o encontrado no presente estudo, sendo 8% (565/7004) dos casos de vaginoses causada por *Candida* spp., ficando atrás das vaginoses bacteriana que representou 20% (1412/7004) dos casos (RIBEIRO et al., 2007).

Entretanto, trabalhos realizados na cidade de Patos-Paraíba demonstrou índices mais elevados de leveduras como agente etiológico das vulvovaginites. Durante um levantamento com 321 exames vaginais, observou-se 22,4% (72/321) de casos positivos para leveduras do gênero *Candida*, seguida por *G. vaginalis* em 19,6% (63/321) dos casos (LEITE et al., 2011).

No presente estudo, *C. albicans* foi a espécie mais frequente em 82,45% (244/296) dos isolados provenientes de pacientes com candidíase vaginal. A

frequência de CVV em espécies de *Candida* não-*albicans*, correspondeu a 17,55% (52/296) e foram distribuídas entre *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Estes resultados corroboram com vários relatos obtidos no Brasil, onde a maioria dos casos de CVV é por *C. albicans*, embora nos últimos anos, um aumento foi observado na frequência de infecções de *Candida* não-*albicans*, especialmente devido a *C. glabrata* e *C. tropicalis* (NETO et al., 1999; COTRAN et al., 2000). Nyirjesy e colaboradores (1997) relataram maior taxa de espécies não-*albicans* do que o presente estudo: 32% dos 77 isolados de pacientes com vulvovaginite crônica.

De acordo com estudo realizado por Ferraza e colaboradores (2005) *C. albicans* foi a levedura mais isolada de secreção vaginal, o mesmo apresentou uma variação significativa nos percentuais encontrados de isolados de *Candida* não-*albicans* nas duas localidades pesquisada, com 22,6% (31/137) dos casos em Santa Catarina e 24% (24/100) em Maringá, estes resultados estão um pouco acima do observado em nosso estudo. A razão desse aumento não está ainda bem definida, mas pode estar associada ao uso generalizado de antifúngico, principalmente para *C. glabrata* que é menos susceptível ao fluconazol e geralmente menos sensível a anfotericina B (LYON et al., 2008; VERMITSKY et al., 2008).

Paulitsch e colaboradores (2006) avaliaram a frequência de infecções causadas por *Candida* não-*albicans* em pacientes que sofreram CVV em um período de quatro anos. Seus resultados revelaram que 12,1% (385/3184) dos casos foram provocados por *Candida* não-*albicans*, principalmente para *C. glabrata* e *S. cerevisiae*, entretanto *C. albicans* continuou sendo a causa mais comum de CVV, em 87,9% (2799/3184) dos casos.

Em trabalho desenvolvido com 286 amostras de pacientes atendidas no município de Ilhéus e Itabuna, na Bahia, foram isoladas de swabs vaginal 33,2% (95/286) cepas de leveduras distribuídas entre *C. albicans* em 74,5% (72/95) dos casos de CVV, *C. tropicalis* em 8,5% (8/95), *C. parapsilosis* em 5,3% (5/95), *C. krusei* em 3,2% (3/95), *C. glabrata* em 2,1% (2/95), *C. stellatoidea* em 2,1% (2/95) e *Trichosporon* spp em 3,2% (3/96) (ANDRIOLI et al., 2009). Esses resultados diferem do estudo quanto à distribuição das espécies não *albicans*. Entretanto resultados similares foram encontrados por Camargo e colaboradores (2008) com 81,25% (13/16) para *C. albicans*, seguidas por *C. tropicalis* com 6,25% (1/16), *C. glabrata* com 6,25% (1/16) e *C. krusei* com 6,25% (1/16).

Em Maceió/Alagoas os resultados dessa pesquisa apontaram perspectivas quanto ao conhecimento das principais espécies envolvidas nos quadros de CVV, os principais fatores de risco do hospedeiro para aquisição da doença, o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos mais utilizados na prática clínica, bem como o conhecimento dos padrões genéticos dessas leveduras.

6.2 Distribuição das Espécies por Sintomas Clínicos, Faixas Etárias e Fatores Predisponentes

6.2.1 Sintomas clínicos

No presente estudo, das 296 pacientes com CVV 87,16% (258) relataram sintomas e 12,84% (38) apresentaram-se assintomáticas. Na distribuição da presença de sintomas com relação às espécies, *C. albicans* foi mais marcante em 89,75% (219/258) dos casos. A ausência de sintomas foi relevante nas espécies não *albicans*, com 21% para *C. glabrata* e 33% para *C. Krusei*. Prurido e corrimento tem sido as manifestações clínicas mais clássicas observadas nas vaginites fúngicas. A presença de corrimento foi o principal sintoma clínico manifestando entre as pacientes participantes do estudo com 77,13% (199/258) dos casos sintomáticos, seguido de prurido, ardor, dispareunia e disúria.

Resultados obtidos em estudos anteriores descrevem as mesmas queixas clínicas observadas nas participantes do grupo sintomático de isolados identificados por *C. albicans*, com índices de 87% e 80,6%, sendo corrimento e prurido, os principais sintomas associados a CVV (FERRAZA et al., 2005; CORREIA et al., 2009).

Tendo em vista a presente investigação, nossos dados foram concordantes com Holanda e colaboradores (2005), que descreveram espécies não *albicans* ocorrendo em mulheres assintomáticas em 44%. Também relatou diversos sinais e sintomas, com destaque para prurido, leucorréia e eritema. Entretanto, em outros estudos outras queixas clínicas têm ocorrido com índices elevados como disúria, hiperemia e dispareunia (MENDLING et al., 2000; ROSA e RUMEL, 2004).

A resposta do hospedeiro frente à infecção por leveduras depende do sistema imunológico, fisiológico, bem como os fatores de virulência desses microrganismos. O significado de leveduras do gênero *Candida*, presente na vagina de mulheres assintomáticas, deve ser interpretados com cautela, para não realizar tratamentos dispensáveis e facilitar episódios de recorrência com cepas resistentes aos antifúngicos utilizados corriqueiramente.

6.2.1 Faixa etária e Fatores predisponentes

A predominância de pacientes com CVV, na faixa etária de 28 a 33 anos, está relacionada principalmente ao período fértil das mulheres, estes achados corroboram com outros estudos que ressaltam a presença de candidíase vulvovaginal em 35% das mulheres na faixa-etária de 31 a 40 anos (RIBEIRO et al., 2007; MCCLELLAND et al., 2009).

A maior parte das mulheres com infecções vaginais por *C. albicans* tem demonstrado pertencer à faixa-etária de 21 e 30 anos, diminuição nos quadros de infecções são observados à medida que a idade aumenta, embora isso não ocorra com *C. parapsilosis*, tornando-se mais frequente com o avanço na idade (VERMITSKY et al., 2008). Embora, no presente estudo o número de casos de *C. albicans* decresceu com o aumento da idade em relação às outras espécies, a faixa etária que obteve maior frequência foi entre 22 a 27 anos das pacientes com CVV.

Segundo Cavalcante e colaboradores (2005), leveduras raramente são isoladas em mulheres pré-menárquica ou pós-menopausa, sugerindo que a CVV tem dependência hormonal (para o aumento da quantidade de glicogênio), possibilitando a ocorrência destas, principalmente no período pré-menstrual. Esses comentários são condizentes com os resultados desse trabalho, no qual a frequência de mulheres com menos de 21 anos correspondeu a 17,56 (52/296) e com mais de 40 anos a 15,5% (46/296).

Em um levantamento epidemiológico de candidíase vulvovaginal, realizado por Corsello e colaboradores (2003) na Itália com 931 participantes, descreveram como fatores de risco o uso de contracepção oral (20,8%), uso recente de antibióticos (15,9%), gravidez (10,3%), histórico de VVC recorrente (10,0%), uso de

terapia de reposição hormonal (3,4%), enquanto a presença de diabetes e doenças imunossupressoras raramente foram encontradas. Esses resultados diferem do presente estudo, pois 24,66% (73/296) das pacientes relataram está grávida e 15,52% (46/296) tinham histórico de recorrência.

Alguns autores sugerem existir relação entre o aumento de níveis de estrogênio e a possibilidade de leveduras causarem CVV, devido, o estrogênio parece reduzir a habilidade que as células do epitélio vaginal tem para inibir a infecção por leveduras (FIDEL et al., 2000; HOLANDA et al., 2005).

Ao analisar os resultados de CVV nas pacientes gestantes, de um total de 73 (24,66%) leveduras do gênero *Candida* isoladas, 84,9% (62) foram identificadas como *C. albicans*, 8,3% (6) como *C. glabrata*, 2,7% (2) como *C. tropicalis*, 2,7% (2) como *C. parapsilosis* e 1,4% (1) como *C. krusei*.

Resultados semelhantes foram observados por Heredia e colaboradores (2006) que descreveram frequência de CVV na Argentina de 28% em mulheres grávidas, estando distribuídas entre as espécies de *C. albicans* com 90,4%, *C. glabrata* com 6,3%, *C. parapsilosis* com 1,1% e *C. kefir* 1,1%. Na Bolívia a prevalência de CVV em gestantes foi de 33,3%, distribuídos entre *C. albicans* com 77%, *C. parapsilosis* com 11%, *C. tropicalis* com 5%, *C. glabrata* com 3%, *C. guilliermondii* com 2%, *C. kefir* com 1% e *C. famata* com 1% (DUQUE et al., 2009).

6.3 Avaliação da Susceptibilidade aos Antifúngicos

As elevadas taxas de resistência *in vitro* observadas neste estudo ao itraconazol (89,7%), fluconazol (52,6%), anfotericina B (66,7%) e cetoconazol (21,3), sugerem que os perfis de susceptibilidade das leveduras vaginais têm mudado seu comportando, assemelhando-se ao das leveduras que causam infecções sistêmicas (MURIEL et al., 2000; PFALLER et al., 2003). Entretanto, esses resultados são divergentes com estudos anteriores sobre CVV (RIBEIRO et al., 2001; CONSOLARO et al., 2004).

Alguns pesquisadores concluíram que o teste de sensibilidade aos antifúngicos (TSA) só deve ser realizado em casos complicados de CVV (RIBEIRO

et al., 2001), mas em 2004 um outro grupo de pesquisadores, considerando a elevada percentagem de S-DD enfatizou a necessidade de padronização da TSA para o monitoramento de amostras vaginais e para o desenvolvimento de mecanismos para permitir que essas conclusões sejam correlacionadas com as manifestações clínicas (GALLE e MENDES-GIANINI, 2004).

Um crescente aumento de relatos de resistentes aos antifúngicos azólicos, especialmente o fluconazol, e menor susceptível a anfotericina B, merece destaque para as espécies de *C. glabrata* e *C. krusei* (CANUTO e RODERO, 2002). Os quadros de resistência observados para essas espécies foram relevantes para anfotericina B e itraconazol com mais de 90%, entretanto, em relação ao fluconazol os índices foram inferiores a 30%.

Santos e colaboradores (2009) descreveram isolados de *Candida* apresentando alto percentual de resistência aos azólicos, itraconazol (92,3%) e fluconazol (92,3%), e ao poliênico anfotericina B (7,7%), já o cetoconazol, apresentou-se efetivo sob as amostras testadas. Embora as amostras utilizadas fossem de urina, estão próximas as taxas encontradas nesse estudo. Em outras pesquisas também foram evidenciados taxas de resistências ao Itraconazol superior ao Fluconazol (DOCZI et al., 2002; MÍMICA et al., 2009).

Entretanto, diversos estudos demostram boa suscetibilidade aos antifúngicos polienos e azólicos para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (CATALÁN e MONTEJO, 2006; CHEN e SORRELL, 2007). Na pesquisa desenvolvida por Galle e colaboradores (2004) todos os isolados de *C. albicans* foram sensíveis à anfotericina B, e apenas um isolado da espécie não-*albicans* apresentou resistência.

Dentre os antifúngicos analisados o cetoconazol (21,3%) demonstrou melhor ação entre as espécies estudadas, comportamento semelhante avaliado por outros investigadores (RICHTER et al., 2005), nos quais 98,5% dos isolados de *Candida* foram sensível ao cetoconazol. Entretanto outros estudos obtiveram resultados divergentes dos já descritos, com 41,5% de cepas de *C. albicans* e 96% de *Candida* não-*albicans* resistente ao cetoconazol (DOTA et al., 2008).

No que diz respeito a susceptibilidade aos antifúngicos por espécies de *Candida* não-*albicans*, em estudo realizado por Richter e colaboradores (2005) isolados de *C. glabrata* e *C. krusei* apresentaram grande proporção de resistência ao itraconazol com 74,1% e 58,3% respectivamente. Os isolados também apresentaram elevada sensibilidade dose dependente ao fluconazol, *C. glabrata*

com 51,8% e *C. krusei* com 50%. Esses dados são semelhantes aos resultados observados no estudo com SDD para fluconazol em 39,13% dos isolados de *C. glabrata* e 50,0% para *C. krusei* e itraconazol resistente em 100% *C. glabrata* e 83,33% *C. krusei*.

Acredita-se que pacientes com infecções recorrentes, de isolados anteriormente sensíveis começam a apresentar um perfil de sensibilidade alterado, especialmente após longos períodos de exposição do hospedeiro ao mesmo antifúngico. O excesso de uso de azólicos, em especial o fluconazol, tem resultado um aumento no número de isolados resistentes (DA MATTA et al., 2007).

Em estudo realizado na Bélgica para avaliar a sensibilidade ao fluconazol por duas metodologias, foi determinada resistência em 21,1% dos 84 isolados de *C. albicans* com CIM $\geq 64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pelo método do CLSI, entretanto 8 isolados resistentes pelo CLSI foram sensível pelo método EUCAST (BAUTERS et al., 2002). Isso ilustra a dificuldade de padronização encontrada na interpretação do crescimento de fungo aos antifúngicos e a necessidade de novos testes.

Na busca de métodos práticos para determinação de antifungigrama na rotina de laboratórios clínicos, foram avaliados 88 isolados de leveduras pelo método de microdiluição e disco difusão, o primeiro método apresentou melhores resultados de resistência para o itraconazol (29%), cetoconazol (48,4%) e anfotericina B (1,1%), demonstraram a crescente necessidade de avaliação do perfil de sensibilidade aos antifúngicos (DOTA et al., 2011).

As taxas de resistência elevadas nos antifúngicos testados é um sinal de que o tratamento para CVV no local de estudo ainda é realizada de forma empírica. Estes resultados contribuem como alerta para a necessidade de realização de diagnósticos laboratoriais para isolamentos das leveduras causadoras de CVV, bem como a realização dos testes de susceptibilidade aos antifúngicos.

6.4 Análise de Perfis de PCR – *Fingerprinting*

O método de PCR-*fingerprinting*, o qual pode detectar polimorfismos no DNA genômico de fungos utilizando iniciadores com sequências simples, tem sido empregado com sucesso na tipagem epidemiológica de *Candida* (SCHÖNIAN et

al.,1993). Um marcador para ser utilizado como um sistema de tipagem genética deve apresentar um elevado polimorfismo, reprodutibilidade e viabilidade (SOLL, 2000). O microssatélite (GTG)₅ cumpriu com esses critérios e apresentou elevado poder de discriminação (0,7470 a 0,9963) nas linhagens de *Candida* para as espécies analisadas.

A diversidade mais elevada foi observada em *C. albicans* com valor de 0,9963. Em estudo realizado com método de genotipagem rápida para *C. albicans*, três marcadores microssatélites (CDC3, EF3 e HIS3) foram investigados por PCR-multiplex, e apresentaram elevado poder discriminatório com valor de 0,97, sugerindo que esses marcadores podem ser utilizados para estudos epidemiológicos (BOTTEREL et al., 2001).

Foulet e colaboradores (2005) investigaram três marcadores microssatélites polimórficos (RPM2, MTI e ERG3) para análise DNA *fingerprinting* de levedura da espécie de *C. glabrata*. Esses três marcadores juntos apresentaram um índice discriminatório de 0,84 e nenhum genótipo foi associada a qualquer dado clínico, entretanto poderia ser utilizado como um sistema de tipagem para investigar problemas de transmissão nosocomial de isolados ou a origem das infecções. Esses resultados comprovam o observado na espécie de *C. glabrata* que apresentou baixa diversidade (0,7470) e não foi evidenciada relação ao perfil de resistência e os achados clínicos.

Em estudo realizado na Malásia para genotipagem de espécies de *Candida* utilizando os iniciadores PA03 e RAPD-PCR, observou-se que esses marcadores foram viáveis para a diferenciação de várias espécies e sugeriram que as pacientes com candidíase vaginal recorrentes são mais frequentemente colonizada por um único isolado de *Candida* por um longo período de tempo, com microevolução menor devido a alterações genéticas acumuladas (CHONG et al., 2003).

O PCR-*fingerprinting* utilizando o microssatélite (GTG)₅ se mostrou um método reprodutível e com poder discriminatório para as espécies de *Candida* (THANOS et al., 1996). Silva-Filho e colaboradores (2005) determinaram o padrão de *Saccharomyces cerevisiae* após análise molecular baseada na PCR utilizando o iniciador (GTG)₅ e os fragmentos polimórficos identificados entre os isolados de *S. cerevisiae* permitiu a discriminação de 17 isolados nativos desta espécie, os quais foram confirmados pelo método convencional de identificação.

Em estudo utilizando o microssatélites (GTG)₅, ao comparar as impressões digitais da PCR espécie-específica para os isolados com cepas de referência, foi possível realizar identificação a nível das espécies de *Candida* (THANOS et al, 1996). Esse resultado foi observado no presente estudo, na espécie de *C. glabrata* que apresentou cinco padrões genéticos com mais de 80% de similaridade, com perfis contendo de 6 a 14 bandas entre 200 a 1300 pb, por esta razão a utilização deste marcador pode ser uma ferramenta importante para distinguir isolados dentro da mesma espécie.

Dos 244 isolados de *C. albicans* analisados pelo (GTG)₅, foi possível discriminar 172 padrões genéticos distintos. Assim como no estudo de Araújo (2006) que analisou 18 isolados de *C. albicans* e foram discriminados 17 padrões. Confirmando que existe alta variabilidade intra-específica na espécie de *C. albicans*. Brasileiro (2004) também fez uso desse marcador molecular em isolados de *Fusarium solani* e verificou que esta ferramenta obteve maior eficiência para caracterizar a variabilidade genética intra-específica.

No presente estudo foi observado que alguns isolados apresentaram 100% de similaridade, sugerindo que fossem cepas idênticas, e similaridade de 80% a 90%, o que pode refletir a microevolução de uma única linhagem entre os isolados de *Candida* na cidade de Maceió. Isso só foi possível, pois a técnica de tipagem molecular com (GTG)₅-PCR se mostrou uma metodologia rápida que gerou números de bandas o suficiente para apresentar um alto poder discriminatório.

7 CONCLUSÕES

Diante do exposto, o presente estudo permite concluir que:

- O número de casos de candidíase vaginal na cidade de Maceió foram relativamente próximo aos padrões nacionais, sendo a espécie de *C. albicans* o isolado mais frequente. Dentre as espécies de *Candida* não-*albicans*, houve preponderância de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, respectivamente.
- Indivíduos jovens, com presença de sintomas (prurido e corrimento) e fatores de riscos (gravidez e histórico de CVV) foram predominantes nos casos de candidíase vaginal.
- Na análise do perfil de susceptibilidade, todas as espécies apresentaram elevado índice de resistência ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B. Entretanto, o cetoconazol mostrou-se efetivo sobre as espécies de *Candida*.
- Estes resultados revelam que o marcador (GTG)₅ tem elevada capacidade de discriminação de linhagens de *Candida* para as espécies analisadas, o que resultou na alta variabilidade intraespecífica entre os isolados da mesma espécie.
- Alguns isolados fúngicos apresentaram padrões genéticos similares, entretanto, esses não demonstraram associação com o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos testados.
- É importante ressaltar que a identificação específica combinada ao conhecimento da atividade antifúngica através de teste de susceptibilidade *in vitro* deve nortear uma melhor conduta terapêutica para CVV.

REFERÊNCIAS

- ALVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.
- ANDRIOLI, J. L. et al. Frequência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. **Rev Bras Ginecol Obstet.** , v. 31, n. 6, p. 300-4, 2009.
- ANDRIOLI, V. T. Current and future antifungal therapy: new for antifungal therapy **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 16, n. 1, p. 317-21, 2000.
- ARAÚJO, M. A. S. **Caracterização molecular de espécies de *Candida* isoladas de portadores de AIDS e de portadores de Câncer atendidos em Hospitais-Escola de Maceió, Alagoas.** 115p. 2006. Tese (Doutorado em Biologia dos Fungos). Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2006.
- ARECHAVALA, A. I. et al. Identification and susceptibility against fluconazole and albaconazole of 100 yeasts' strains isolated from vaginal discharge. **Rev Iberoam Micol**, v. 24, n. 4, p. 305-8, 2007.
- ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Med Mycol**, v. 45, n. 7, p. 569-87, 2007.
- BADIA, X. et al. Meta-analysis on safety and efficacy of liposomal amphotericin B in the empirical treatment of febrile neutropenia. **Med. Clin. (Barc)**, v. 122, n. 16, p. 610-16, 2004.
- BAUTERS, T. G. M.; DHONT, M. A.; TEMMERMAN, M. I.; NELIS, H. J. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. **Am. J. Obstet. Gynecol**, v.187, p.569–574, 2002.
- BE, E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 11, n. 3, p. 415-29, 1998.
- BORIOLLO, M. F. G. et al. Multilocus enzyme electrophoresis typing of *Candida albicans* populations isolated from healthy children according to socioeconomic background. **Rev Bras Epidemiol**, v. 8, n. 1, p. 51-66, 2005.
- BOTTEREL, F. O.; DESTERKE, C.; COSTA, C.; BRETAGNE, A. P. Analysis of Microsatellite Markers of *Candida albicans* Used for Rapid Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.11, p. 4076–4081, 2001.
- BRASILEIRO, B. T. R. V.; COIMBRA, M. R. M.; JÚNIOR-MORAIS, M. A.; OLIVEIRA, N. T. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-

fingerprinting based on PCR markers. **Braz. J. Microbiol.** v. 35, n. 3, p. 205-210, 2004.

CAMARGO, F.P.; ALVES, I.A.; PARLOW, M.S.; GOULART, L.S. Isolamento de *Candida* sp. da Mucosa Vaginal de Mulheres Atendidas em um Serviço de Ginecologia do Município de Santo Ângelo – RS. **NewsLab**, v.87, p.96-104, 2008.

CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The lancet infectious diseases**, v. 2, n. 9, p. 550-63, 2002.

CARDOSO, B.C. **Efeito de antifúngicos em suspensões de biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. 2004.85f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia–Engenharia de Bioprocessos) – Programa de Pós-graduação da Escola de Engenharia e Universidade do Minho, Portugal. 2004.

CARRILLO-MUNOZ, A. J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioter**, v. 19, n. 2, p. 130-9, 2006.

CARUSO, M. et al. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. **Lett Appl Microbiol**, v. 34, n. 5, p. 323-8, 2002.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Rev Iberoam Micol**, v. 23, n. 1, p. 39-49, 2006.

CAVALCANTE, V. L. N.; MIRANDA, A. T.; PORTUGAL, G. M. P. Rastreamento de Candidose Va-ginal Durante a Prevenção do Câncer Cérvico-Uterino DST. **J bras Doenças Sex Transm**, v. 17, n. 1, p. 44-48, 2005.

CHEN, S. C. A.; SORREL, T. C. Antifungal agents – new drugs, old drugs. **The Medical Journal of Australia (MJA)**, v. 187, n. 7, p. 404-40, 2007.

CHONG, P. P.; LEE, Y. L.; TAN, B. C.; KEE, P. N. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.657–666, 2003.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Proposed standard M-27P. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 1992.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Aproved standard M-27A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 1997.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**. Proposed standard M-38P. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 1998.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi.** Approved standard - M-38A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2002a.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** Approved standard – second edition M-27A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2002b.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for disk diffusion susceptibility testing of yeasts.** Approved standard M-44A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2004.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Quality control minimal inhibitory concentration (MIC) limits for microdilution and MIC interpretative breakpoint.** Second informational supplement M-27S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2005.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Zone diameter interpretative standards, corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretative breakpoints, and quality control limits for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts.** Second informational supplement M44-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2007.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard.** Second edition M-38A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2008a.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** Approved standard – third edition M-27A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2008b.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** Third informational supplement M-27S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2008c.

COLOMBO, A. L.; GUIMARAES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. . **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

CONSOLARO, M. E. L. et al. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. **Rev Iberoam Micol**, v. 21, p. 202-205, 2004.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

COOKE, V. M. et al. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 7, p. 3622-7, 2002.

CORREIA, P. R. et al. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 31, n. 4, p. 177-81, 2009.

CORSELLO, S. et al. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 110, n. 1, p. 66-72, 2003.

CROCCOI, E. L. et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **An. Bras. Dermatol.**, v. 79, n. 6, p. 689-697, 2004.

DA MATTA, D. A. et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in Sao Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 57, n. 4, p. 399-404, 2007.

DALLE, F. et al. Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 12, p. 4554-9, 2000.

DI CONZA, J. A. et al. (GTG)5 microsatellite regions in citrinin-producing *Penicillium*. **Rev Iberoam Micol**, v. 24, n. 1, p. 34-7, 2007.

DIAZ-GUERRA, T. M. et al. A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 3, p. 1120-4, 2003.

DIMOPOULOS, G. et al. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 26, n. 6, p. 377-84, 2007.

DOCZI, I. et al. Aetiology and antifungal susceptibility of yeast bloodstream infections in a Hungarian university hospital between 1996 and 2000. **J Med Microbiol**, v. 51, n. 8, p. 677-81, 2002.

DORKO, E.; PILIPCINEC, E.; TKACIKOVA, L. *Candida* species isolated from cerebrospinal fluid. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 47, n. 2, p. 179-81, 2002.

DOTA, K. F. et al. Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, n., p. 201953, 2011.

DOTA, K. F. D. et al. Susceptibilidad de levaduras vaginales a los antifúngicos más utilizados en Maringá, Paraná, Brasil. **Acta Bioquím Clín Latinoam** v. 42, n. 4, p. 561-6, 2008.

DUQUE, C. M. et al. Candidiasis vulvovaginal en un grupo mujeres gestantes de medellín. **asociación colombiana de infectologia**, v. 13, n. 1, p. 14-20, 2009.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 12, p. 772-85, 2003.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, n. 2, p. 101-6, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 2, p. 314-9, 1995.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. In vitro antifungal susceptibility methods and clinical implications of antifungal resistance. **Med Mycol**, v. 38 Suppl 1, n., p. 293-304, 2000.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under linux and windows. *Molecular ecology Resources* 10: 564-567.

FARAH, C. S.; ASHMAN, R. B.; CHALLACOMBE, S. J. Oral candidosis. **Clin Dermatol**, v. 18, n. 5, p. 553-62, 2000.

FERRARI, T.C.A.; HAMDAN, J.S. Drogas antifúngicas. In: Rocha MOC, Pedroso ERP, Fonseca JGM, Silva AO, editores. **Terapêutica Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p. 251-66.

FERRAZZA, 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. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.

FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 71 Suppl 1, n., p. S21-7, 2000.

FEUERSCHUETTE, O. H. M. et al. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. **AFEMINA**, v. 38, n. 2, p. 31-36, 2010.

FIDEL, P. L., JR.; CUTRIGHT, J.; STEELE, C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. **Infect Immun**, v. 68, n. 2, p. 651-7, 2000.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FISHER, J. F. et al. Efficacy of a single intravenous dose of amphotericin B for *Candida* urinary tract infections: further favorable experience. **Clin Microbiol Infect**, v. 9, n. 10, p. 1024-1027, 2003.

FOULET, F.; NICOLAS, N.; ELOY, O.; BOTTEREL, F.; GANTIER, J. C.; COSTA, J. M.; BRETAGNE, S. Microsatellite Marker Analysis as a Typing System for *Candida glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4574–4579, 2005.

GALLE, L. C; MENDES-GIANINI, M. J. S. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **J Bras Patol Med Lab**, v.40, p. 229-236, 2004.

GE, S. et al. Correlation between Azole Susceptibilities, Genotypes, and ERG11 Mutations in *Candida albicans* Isolates Associated with Vulvovaginal Candidiasis in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 4, n. 8, p. 3126-3131, 2010.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 4, p. 501-17, 1999.

GONZALEZ-PEDRAZA AVILES, A. et al. Urinary tract infection by *Candida* species. **Aten Primaria**, v. 38, n. 3, p. 147-53, 2006.

GUEDES, R. C. M. et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Brutos de *Petiveria alliacea* L. **Lat. Am. J. Pharm**, v.28, n.4, p.520-4, 2009.

HEREDIA, M. G. et al. Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas: Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos. **Rev. argent. Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 9-12, 2006.

HOLANDA, A. A. R. et al. Candidíase vulvovaginal: uma revisão de literatura. **LILACS** v. 33, n. 5, p. 347-351, 2005.

HOSPENTHAL, D. R. et al. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar Candida. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 5, n., p. 1, 2006.

HOUANG, E. T. et al. Use of CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. **J Clin Pathol**, v. 50, n. 7, p. 563-5, 1997.

HSU, M. C. et al. Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. **J Med Microbiol**, v. 52, n. Pt 12, p. 1071-6, 2003.

JAIN, A. et al. Biofilms--a microbial life perspective: a critical review. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v. 24, n. 5, p. 393-443, 2007.

JANG, S. J. et al. PFGE-based epidemiological study of an outbreak of *Candida tropicalis* candiduria: the importance of medical waste as a reservoir of nosocomial infection. **Jpn J Infect Dis**, v. 58, n. 5, p. 263-7, 2005.

- JEFREYS, A. S. et al. Amplification of human onco minisatellites by the polymerase chain reaction towards DNA fingerprinting of single cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, n. 10, p. 7133-7141, 1988.
- KALSI, J. et al. Hospital-acquired urinary tract infection. **Int J Clin Pract.**, v. 57, n. 5, p. 388-391, 2003.
- KURTZMANN, C. P.; FELL, J. W. **The yeast: a taxonomic study**. 4 ed. New York, Elsevier 1998.
- KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1135-44, 2002.
- LACAZ, C. S. et al. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998.
- LASKER, B. A.; BUTLER, G.; LOTT, T. J. Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 3, p. 750-9, 2006.
- LEITE, M. C. A. et al. Prevalência dos agentes etiológicos das vulvovaginites através de resultados de exames citopatológicos: um estudo na Unidade de Saúde da Família em Patos – PB. **NewsLab**, v. 18, n. 1, p. 86-96, 2011.
- LI, Y. C. et al. Microsatellites within genes: Structure, function and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 6, p. 991-1007, 2004.
- LUCCHETTI, G. et al. Infecções do trato urinário: análise da frequência e do perfil de sensibilidade dos agentes causadores de infecções do trato urinário em pacientes com cateterização vesical crônica. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 41, n. 6, p. 383-389, 2005.
- LUMBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J. M. Systemic antifungal agents. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 21, n. 7, p. 366-79; quiz 380, 390, 2003.
- LYMAN, C. A.; WALSH, T. J. Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. **Drugs**, v. 44, n. 1, p. 9-35, 1992.
- LYON, J. P. et al. Antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. oral isolates obtained from denture wearers. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 28-33, 2008.
- LYON, J. P. M., L. M.; CARDOSO, M. A. G.; SAADE, J.; RESENDE, M. A. Antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. oral isolates obtained from denture wearers. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, n. 4, p. 668-672, 2008.

MAERTENS, J.; BOOGAERTS, M. The place for itraconazole in treatment. **J Antimicrob Chemother**, v. 56 Suppl 1, n., p. i33-i38, 2005.

MALANI, A. N.; KAUFFMAN, C. A. Candida urinary tract infections: treatment options. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 5, n. 2, p. 277-84, 2007.

MARTINEZ, R. An update on the use of antifungal agents **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 5, p. 449-60, 2006.

MCCLELLAND, R. S. et al. Prospective study of vaginal bacterial flora and other risk factors for vulvovaginal candidiasis. **J Infect Dis**, v. 199, n. 12, p. 1883-90, 2009.

MELLADO, E.; CUENCA-ESTRLLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Importancia clínica de los mecanismos de resistência de los hongos filamentosos a los antifúngicos. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 20, n. 10, p. 523-30, 2002.

MENDLING, W. et al. Strain specificity of yeasts isolated from different locations of women suffering from vaginal candidosis, and their partners. **Mycoses**, v. 43, n. 11-12, p. 387-92, 2000.

MÍMICA, L. M. J. et al. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 1, p. 17-23, 2009.

MONTEJO, J. C.; CATALAN, M.; DEL PALACIO, A. Prevention of invasive candidiasis in the critically ill non neutropenic patient. **Rev Iberoam Micol**, v. 23, n. 1, p. 32-4, 2006.

MURIEL, M. A. et al. Identificación de levaduras y sensibilidad in vitro a diversos antifúngicos. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 18, p.120-124, 2000.

NETO, A. A.; HAMDAN, J. S.; SOUZA, R. C. Prevalência da *Candida* na Flora Vaginal de Mulheres Atendidas num Serviço de Planejamento Familiar. **Rev. Bras. Gen. Obs.**, v. 21, n. 8, p. 441-445, 1999.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Risk factors for breakthrough candidemia. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 209-11, 2002.

NYIRJESY, P.; WEIT, M. V. ; GRODY, M. H. T.; LORBER, B. Over-the-counter and alternative medicines in the treatment of chronic vaginal symp-toms. **Obstet. Gynecol**, v 90, p.50-53, 1997.

NYIRJESY, P. Chronic vulvovaginal candidiasis. **Am Fam Physician**, v. 63, n. 4, p. 697-702, 2001.

ODDS, F. C. Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication **Mycologist**, v. 17, n. 2, p. 51-55, 2003.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; GOW, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 272-9, 2003.

PASSOS, X. S. et al. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 925-928, 2005.

PAULITSCH, A. et al. A 5-year (2000-2004) epidemiological survey of *Candida* and non-*Candida* yeast species causing vulvovaginal candidiasis in Graz, Austria. **Mycoses**, v. 49, n. 6, p. 471-5, 2006.

PEREIRA, M.M.F., **Prevalência de fenótipos-resistentes e espécies emergentes de leveduras e alga associadas a vulvovaginites**. 59p. 2003. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências). Universidade de São Paulo, 2003.

PFALLER, M. A. et al. Activities of fluconazole and voriconazole against 1586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: Report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. **J Clin Microbiol**, v.41, p.1440-1446, 2003.

PETRIKKOS, G.; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **Int J Antimicrob Agents**, v. 30, n. 2, p. 108-17, 2007.

PFALLER, M. A. et al. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of *Candida* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 6, p. 1723-7, 2002.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RIBEIRO, A. A. et al. Agentes microbiológicos em exames citopatológicos: estudo de prevalência. **RBAC**, v. 39, n. 3, p. 179-81, 2007.

RIBEIRO, E. L. et al. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas às Infecções nosocomiais. **Rev. NewsLab**, v. 64, n. 3, p. 106-28, 2004.

RIBEIRO, M. A. et al. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. **Mycopathologia**, v.151, p. 5-10, 2001.

RICHTER, S. S. et al. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 5, p. 2155-62, 2005.

ROSA, M. I.; RUMEL, D. Fatores Associados à Candidíase Vulvovaginal: Estudo Exploratório. **RBGO**, v. 26, n. 1, p. 65-70, 2004.

RUIZ, A. C.; CALDERÓN, D. M.; GÓMEZ, J. E. Variabilidade molecular de aislamientos de *Candida* spp. por la técnica de polimorfismos de ADN amplificados

aleatoriamente (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) en mujeres de Armenia, Colombia. **Revista Infectio**, v. 13, n. 1, p. 21-35, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

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

SANTOS, L.S.; BERNARDES, R.C.; MAGALHÃES, L.M.; SIQUEIRA, F.S.; KHOURI, S. Perfil de sensibilidade de amostras isoladas de casos de candidurias hospitalares aos antifúngicos convencionais. **Anais: Encontro Latino Americano de Pós-graduação**. 2009. Acesso: 22 de nov de 2011. Disponível em: http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquivos/RE_0612_1324_01.pdf

SCHONIAN, G. et al. Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction. **Mycoses**, v. 36, n. 5-6, p. 171-9, 1993.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 1, p. 40-79, 1999.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Ed. Guanabara Koogan, 1ª Edição, 2004.

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

SILVA FILHO, E. A. et al. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 32, n. 10, p. 481-6, 2005.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, n. 9577, p. 1961-71, 2007.

SOLL, D. R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 2, p. 332-70, 2000.

SULLIVAN, D. et al. Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 8, p. 2124-33, 1993.

TAY, S. T.; NA, S. L.; CHONG, J. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 2, p. 185-91, 2009.

THANOS, M. et al. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 3, p. 615-21, 1996.

VERMITSKY, J. P. et al. Survey of vaginal-flora *Candida* species isolates from women of different age groups by use of species-specific PCR detection. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 4, p. 1501-3, 2008.

WISE, M. G. et al. Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 6, p. 778-87, 2007.

YU, J. et al. *Candida* species distribution in the patients with high risk of deep fungal infections and relevant risk factors: a prospective cohort study. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 87, n. 42, p. 2991-3, 2007.

ZHOU, X. et al. Vaginal microbiota of women with frequent vulvovaginal candidiasis. **Infect Immun**, v. 77, n. 9, p. 4130-5, 2009.

ZIARRUSTA, G. B. Vulvovaginitis candidiásica **Rer. Iberoam Micol.**, v. 19, n., p. 22-24, 2002.

ANEXO

ANEXO A - Meios de Cultura

- Extrato de Levedura, Peptona e Dextrose (YPD) – 1000mL

Extrato de levedura.....10 g

Peptona20 g

Glicose20 g

Para a preparação do meio sólido, adicionar 20 g de Agar, 50 mg/L de ácido nalidíxico e 100 µL de verde de bromocresol a 220 mg por 100 mL.

- Ágar Sabouraud Dextrose (ASD)- 1000 mL

Dextrose..... 40 g

Peptona..... 10 g

Ágar..... 15 g

Todos os meios tiveram seus volumes ajustados para 1000 mL com água destilada e foram autoclavados a 121°C, por 15 minutos.

- RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*1640) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e com indicador de pH vermelho de fenol

Meio RPMI-1640 em pó.....10,4 g

MOPS34,53 g

Água destilada.....1.000 mL

O meio foi tamponado com ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (MOPS), em concentração final de 0,165 mol/mL, sendo o pH ajustado para 7,0, a 25°C, usando hidróxido de sódio 1 mol/L. A esterilização do meio foi realizada por filtração em membrana com poros de 0,22 µm.

ANEXO B - Soluções e Tampões

- Solução de Tris/EDTA (TE) pH 8,0

Tris.Cl (pH 8,0).....10 mM

EDTA (pH 8,0).....1mM

- Solução de NaCl 0,5 M – 100 mL

Massa x Molaridade x Volume

$$40 \times 0,5 \times 0,1 \text{ L} = 2\text{g}$$

- Solução de EDTA 0,5 M pH 8,0 – 100 mL

Massa x Molaridade x Volume

$$372,24 \times 0,5 \times 0,1 \text{ L} = 18,6\text{g}$$

- Solução de SDS 10% – 100 mL

SDS..... 10 g

Água destilada esterilizada90 mL

- Solução de Lise – 100 mL

Tris-HCl 1M pH 8,0.....20 mL

EDTA 0,5M pH 8,05 mL

SDS 10% 1,0 mL10mL

NaCl 0,5M..... 5 mL

Água destilada esterilizada60mL

- Clorofane 25:24:1 v/v

Fenol.....25 mL

Clorofórmio.....24 mL

Álcool isoamílico.....1mL

- Clorofil 24:1 v/v

Clorofórmio.....24 mL

Álcool isoamílico.....1mL

- Tampão Tris-Borato (TBE) 5X (p/ 1L)

Tris base..... 54,0 g

Ácido bórico27,5 g

EDTA 0,5M pH 8,020,0 mL

O volume foi completado com água destilada para 1000 mL

APÊNDICE

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.” (Resolução. nº 196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Eu,, tendo sido convidada a participar como voluntária do estudo Variabilidade Genética e Perfil de Susceptibilidade a Antifúngicos de Espécies de *Candida* Isoladas da Secreção Vaginal, recebi do Sr. Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) – Laboratório de Genética e Microrganismo da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina ao: Levantamento das principais espécies de *Candida* causadoras de infecções vaginais que acometem uma amostra de mulheres do Município de Maceió assim como os diversos perfis de sensibilidade aos antifúngicos.
- Que a importância deste estudo é: Contribuir com dados estatísticos mais concretos relacionados às infecções vaginais causadas por espécies de *Candida* no Brasil.
- Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: Determinar através de PCR a distribuição das principais espécies de *Candida* causadoras de vulvovaginite numa amostra de mulheres da população de Maceió/Alagoas, quais o perfil de sensibilidade a drogas antifúngicas e padrão genético, com base na amplificação do microssatélite (GTG)5.
- Que esse estudo começará em 01/03/2010 e terminará em 25/03/2012.
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: Serão coletadas amostras de secreção vaginal, seguindo as normas técnicas e éticas aplicáveis aos procedimentos de coleta. Estas amostras serão submetidas a uma análise inicial no laboratório coletado para rastreamento de leveduras causadoras de infecções vaginais, posteriormente serão enviadas ao laboratório BIOGEN para serem identificadas em nível de espécie utilizando métodos de biologia molecular. O DNA será extraído pelo método fenol-cloroformil e amplificado por PCR, após esse procedimento será aplicada a técnica de tipagem genética com o microssatélite (GTG)5 com posterior análise em gel de agarose a 1,5% e análise do perfil de resistência aos antifúngicos mais utilizados na prática clínica em Maceió/Alagoas.
- Que eu participarei das seguintes etapas: Participarei durante a coleta através da doação de material biológico. Com isto, encerra-se a minha participação neste estudo.
- Que os outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados são as seguintes: Não existem outros meios para se obter os mesmos resultados.
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: Nenhum.
- Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental são: Nenhum
- Que, se eu vier a sofrer algum dos danos previstos em virtude de minha participação na pesquisa, eu deverei ser indenizado das seguintes formas: Por não existir danos, não há formas de indenização.
- Que deverei contar com a seguinte assistência: Nenhuma, sendo responsável – Gabryelle Barbosa Cordeiro de Lima.
- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: Estar contribuindo para dados mais concretos em relação à infecção vaginal por espécies de *Candida* em mulheres em Maceió/Alagoas através desse estudo.
- Que a minha participação será acompanhada do seguinte modo: Será realizada a coleta de amostras vaginal seguindo padrões e normas éticas aplicadas à coleta. Portanto não há risco de nenhuma forma conhecida de contaminação. As coletas serão realizadas pelos Médicos responsáveis dos locais de coleta e colaboradores do projeto.
- Que, sempre que necessário, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- Que, as mulheres estudadas serão informadas dos resultados da pesquisa e junto com os pesquisadores estarão dispostas a discutir com as pessoas que constituíram a amostra da pesquisa os resultados obtidos de maneira clara e compreensível, criando a partir daí um diálogo fértil.

- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(o,a) participante-voluntári(o,a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a). Gabryelle Barbosa Cordeiro de Lima

Domicílio: (rua, praça, conjunto): Conjunto Arnon de Melo, Quadra-3, Bloco-21

Bloco: /Nº: /Complemento: Apartamento-203

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone: Poço / 57025-130, Maceió-AL, (82) 88266250.

Ponto de referência: Próximo a Praça Gonçalves Ledo

Endereço d(os,as) responsável(eis) pela pesquisa:

Instituição: Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho

Endereço: Rua Deputado José Lages

Bloco: /Nº: /Complemento: 1033, ap.104

Bairro: /CEP/Cidade: Ponta Verde / 57035-230/ Maceió

Telefones p/contato: 99817568

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DE ALAGOAS:

Rua Doutor Jorge de Lima 113, 3º andar. Trapiche da Barra, AL. CEP: 57010-382.

Telefone: 3315-6787

(Informações obrigatórias)

Maceió,

(Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou responsável legal - Rubricar as demais folhas)	Nome e Assinatura do(s) responsável(eis) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)

APÊNDICE B – Informações para Coleta de Secreção Vaginal

LOCAL:

Nº DO PRONTUÁRIO:

IDADE:

TEM FILHOS? () SIM () NÃO

É GESTANTE? () SIM, QUANTOS MESES? _____ () NÃO

PACIENTE É DIBÉTICA? () SIM () NÃO

O QUE SENTE?

() PRURIDO () ARDO () CORRIMENTO () DOR DURANTE RELAÇÕES SEXUAIS () AUSÊNCIA DE SINTOMAS () OUTROS, QUAL? _____

A QUANTO TEMPO APRESENTA OS SINTOMAS? _____

FEZ USO DE ALGUM TRATAMENTO?

() NÃO () SIM, QUANDO? _____

() ANTIBIÓTICOS () ANTIFÚNGICOS () CORTICÓIDES () ANTICONCEPCIONAIS

FAZ REPOSIÇÃO HORMONAL?

() NÃO () SIM, QUAL? QUANDO? _____

FEZ EXAME DE CULTURA ANTERIORMENTE?

() NÃO () SIM, QUANDO? O QUE DEU? _____

CARACTERÍSTICAS DA SECREÇÃO:

Cor: () Amarelo () Branco () Esverdeado () Sanguinolento () Incolor

Aspeto: () Purulento () Bolhoso () Normal

Quantidade: () Abundante () Escasso () Normal

Consistência: () Viscoso () Liquefeito () Normal

Odor: () Fétido () Odor de peixe () Ausência de odor