

Luciana Basili Dias

Candidíase vulvovaginal em pacientes gestantes e não gestantes atendidas no Hospital Geral Universitário de Cuiabá/MT – prevalência, identificação das leveduras e susceptibilidade aos antifúngicos através de duas metodologias distintas

**Universidade Federal de Mato Grosso
Faculdade de Ciências Médicas
Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Ciências da Saúde
Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais**

**Cuiabá – Mato Grosso
2007**

Universidade Federal de Mato Grosso
Faculdade de Ciências Médicas
Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Ciências da Saúde
Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais

Candidíase vulvovaginal em pacientes gestantes e não gestantes atendidas no Hospital Geral Universitário de Cuiabá/MT – prevalência, identificação das leveduras e susceptibilidade aos antifúngicos através de duas metodologias distintas

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências da Saúde**, Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Christine Hahn

Cuiabá – Mato Grosso
2007

“Experiência é o nome que nós damos aos nossos próprios erros”.
Oscar Wilde

“Ninguém é bom por acaso; a virtude deve ser bem aprendida”.
Chico Xavier

Dedico esta dissertação

À minha família, meu grande alicerce.

*Meu avô Miguel Basíli in memoriam, exemplo de amor e por sempre torcer
por mim.*

À minha orientadora Dra. Rosane Christine Hahn.

AGRADECIMENTOS

A Deus força maior que me guia, pela vida, fé, energia, saúde e por ter guiado sempre os meus caminhos dando-me coragem e garra nesta e em todas as caminhadas de minha vida!

Às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais (Albino e Francisca) pelo exemplo de vida, educação concedida, valores que me ensinaram, pelo esforço de sempre lutarem para os filhos conseguirem alcançar os objetivos, doação, incentivo, dedicação, confiança plena, respeito e amor que é o grande alicerce que sustenta nossa maravilhosa família. Amo-os muito. Vocês são tudo para mim. Obrigada!!!

A meus irmãos (Flávio e Miguel), pela nossa união, amor, carinho, amizade, pelo porto seguro de apoio, respeito que nos envolve e grande ajuda moral. Obrigada, vocês são minhas alegrias.

À Profa. Dra. Rosane Christine Hahn, pela orientação sempre concedida a mim, não só na realização deste trabalho, mas por todos os caminhos já percorridos ao seu lado, pelos ensinamentos acadêmicos, científicos e humanos, pela oportunidade, dedicação, atenção, carinho, paciência, confiança em mim depositada e grande amizade adquirida. Enfim, por tudo que já contribuiu à minha formação pessoal e profissional, transformando-me em uma pessoa melhor. Agradeço a Deus por ter conhecido-a e me colocado em seu caminho. Obrigada!!!

Ao Prof. Dr. José Meirelles Filho, coordenador da ginecologia/obstetrícia do Hospital Geral Universitário (HGU), pela colaboração ao abrir as portas para que esta pesquisa fosse realizada, por toda contribuição durante as coletas de materiais clínicos, ensinamentos quanto aos aspectos clínicos, co-orientação e empenho durante todo o trabalho.

À Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso (FCM / UFMT), pela oportunidade de conceder a pós-graduação e o mestrado em ciências da saúde.

Ao Prof. Dr. Francisco Souto, ex-coordenador da pós-graduação UFMT por todo o esforço em fazer crescer a pós-graduação e gentilezas prestadas.

Ao Prof. Dr. Cor Jesus, pelo apoio, sugestões, ensinamentos e colaborações nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Anselmo, coordenador da pós-graduação, por todas as gentilezas prestadas.

Ao Prof. Dr. Domingos Tabajara, diretor da FCM/UFMT, por todas as contribuições, mesmo indiretamente, para realização deste trabalho.

A todos os professores da pós-graduação que fizeram parte de minha formação, contribuindo com grandes conhecimentos.

À secretária da pós-graduação Ana Paula, pelas gentilezas prestadas.

A todos da secretaria da FCM/UFMT, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Micologia/UFMT - João, Daciene, Sebastião, Sara, Marilana, Katherine e Olívia pelo apoio, amizade, respeito, confiança, experiência trocada e convivência agradável.

À amiga Daciene, pela ajuda incansável, fundamental enquanto estive no IAL, pelas amostras enviadas, enfim, pela grande companhia e amizade adquirida.

Ao João Batista, pelo apoio, colaboração e auxílio imprescindível na formatação deste trabalho.

À Naiana, pelo auxílio na elaboração da apresentação em Powerpoint.

À amiga Katherine, pelo apoio e ajuda na rotina laboratorial (HGU) nos últimos meses, disponibilizando-me maior tempo para a conclusão deste trabalho.

A todos os mestrandos colegas em especial: Alberto, Cristiano, Íris, João Félix, Marlene, Neyres e Vera pela companhia, experiências trocadas e pelas amizades adquiridas!!!

Aos colegas do Laboratório de Investigação/UFMT - Ana Paula Muller, Aparecida, Eduardo, Gustavo, Marlene, Naiana, Ricardo e Rogério, pelo apoio e colaborações.

Às pessoas que conheci na pós-graduação, que de alguma forma, colaboraram com a minha formação.

Ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) - seção micologia - pela oportunidade de realizar os testes de sensibilidade aos antifúngicos.

À Profa. Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem - IAL, pela oportunidade, receptividade no IAL, ensinamentos adquiridos, acolhida em São Paulo e amizade adquirida.

À Dra. Maria Walderez Szeszs – IAL, pelos ensinamentos, ajuda fundamental nos testes de sensibilidade, pela companhia e amizade durante esta pesquisa.

A todos que me acompanharam no Instituto Adolfo Lutz, em especial: Andress, Dona Maria, Fumiko, Sandra Freitas, Sandra Brasil, Leo, Leda, Simone, Dulce, pela força e companhia durante esta etapa.

À Universidade de Cuiabá (UNIC), pelo incentivo, contrapartida financeira inicial e liberação para a realização deste trabalho.

À Profa. Ilza Martha, diretora do curso de farmácia UNIC, pela oportunidade e incentivo.

Aos professores, mestres e doutores da faculdade de farmácia da UNIC, que fizeram parte da minha formação acadêmica, contribuindo para esta etapa alcançada.

Ao Prof. Paulo Tamashiro, pelo grande incentivo para cursar o mestrado.

Aos colegas e funcionários da UNIC por todas as colaborações na realização deste trabalho.

À amiga Marta Rocha, pela ajuda técnica, fundamental na realização deste trabalho, pelo estímulo, atenção, carinho, lealdade, companhia, amizade e conversas agradáveis.

À amiga Juscinei (Nica), pela ajuda técnica na realização deste trabalho, carinho, amizade e conversas descontraídas.

À residente Larissa Silvério pela ajuda na realização da coleta de dados e materiais clínicos e pela amizade adquirida.

Aos acadêmicos de medicina 3º ano UNIC - Adriana, Ana Júlia, Emanuela, Franciele, Juliana, Kelly, Maria Carolina, Patrícia, Raquel e Thiago, vinculados, de forma voluntária, a este projeto, pela responsabilidade, dedicação e interesse em toda a etapa de coleta de materiais clínicos.

Aos acadêmicos de medicina 4º ano UNIC - Alessandra, Ana Paula, Camila, Carla, Karime, Maria Fernanda, Mariana, Michele, Naiana, Patrícia, vinculados, de forma voluntária, a este projeto, pela responsabilidade, dedicação e interesse em toda a etapa de coleta de materiais clínicos.

À amiga Helane pela força na seleção do mestrado, amizade, apoio e interesse em todo o projeto.

A todos os professores, médicos, residentes, alunos de ginecologia/obstetrícia do HGU, que contribuíram na clínica e etapa de coleta de materiais clínicos.

Às pacientes atendidas, neste período do desenvolvimento deste projeto, por aceitarem fazer parte do estudo, cedendo as amostras.

Ao Hospital Geral Universitário (HGU), pela oportunidade, interesse e incentivo.

À amiga Nicolina (Nicolini), pela ajuda técnica na realização deste trabalho, paz transmitida a todo o momento de convívio e amizade.

Ao farmacêutico-bioquímico Nestor, pelo apoio e atenção sempre.

Ao farmacêutico-bioquímico Eduardo Vessoni, pela amizade e contribuições nos momentos em que estive ausente do laboratório.

Aos colegas e funcionários do laboratório de análises clínicas do HGU pelo apoio durante a realização deste trabalho.

À Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso (SES/MT), pelo incentivo e liberação para qualificação profissional, contribuindo para melhor desempenho no desenvolvimento do projeto.

Ao Pablio Vinícius, por acreditar em mim e não medir esforços na liberação para a minha qualificação profissional.

À Coordenadoria de Assistência Farmacêutica (CAF), por contribuir com minha transferência para maior disponibilidade de horários na realização do mestrado.

À amiga Patrícia Freitas por todo apoio ao processo necessário da minha transferência.

Ao Centro Integrado de Apoio Psicossocial (CIAPS) Aduino Botelho por receber-me e favorecer a liberação para a minha qualificação profissional.

Aos colegas de trabalho do CIAPS Aduino Botelho pelo apoio e incentivo. Especialmente Niedja e Maria Idair, por não medir esforços na contribuição da minha licença.

Aos professores do ensino fundamental e médio que foram base à minha educação, contribuindo para que eu atingisse mais esta etapa em minha vida.

Ao tio Bartolomeu e tia Edinalva, pela força, incentivo, amizade e grande contribuição na revisão gramatical desta dissertação.

Ao Julio, pela gentileza prestada na tradução do resumo deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT), pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

À farmacêutica-bioquímica Tomoko, pela ajuda e apoio quando estive no IAL e pelas experiências trocadas.

À Andréia pela ajuda na execução do projeto.

Às amigas Scheila e Ellen, pela amizade, exemplo, incentivo e apoio. Vocês deixaram muitas saudades!!!

Ao amigo Gustavo e sua família, pelo apoio, companhia enquanto estive em São Paulo e pela valiosa amizade.

Ao Thiago Trindade, que através de suas atitudes, fez-me crescer muito neste período.

Aos colegas – amigos: Acy, Alanna, Ana Júlia, Camila Lopes, Carolina, Cleide, Dacie, Diniz, Duanra, Ednaldo, Elaine, Eli, Elizângela, Elizandra, Ellen, Evelin, Fabrício, Gabriela, Giseli, Glauco, Greicy, Gu, Gustavo, Iberê, Íris, John, Josi, Karen, Katherine, Keyla, Laiana, Luciana, Luís, Mari, Maria Elisângela, Maria Idair, Olívia, Rainúzia, Raquel, Rodrigo, Roney, Sara, Scheila, Stela, Thaysa, Tiago, Valéria, fica assim registrada a grande presença concedida em alguns ou todos os momentos de realização deste trabalho, com contribuições valiosas, estímulos, incentivos ou apenas colocando o sorriso em meu rosto.

Aos tios (as), primos (as), pela grande força, incentivo, estímulo, amizade e união de nossas famílias.

À minha avó Ana Maria *in memoriam* pela admiração.

A meu avô Miguel *in memoriam*, pelo apoio, incentivo, confiança e por sempre acreditar em mim.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB – Anfotericina B
ATCC – American Type Culture Collection
C. albicans – *Candida albicans*
C. colliculosa – *Candida colliculosa*
C. dubliniensis – *Candida dubliniensis*
C. famata – *Candida famata*
C. glabrata – *Candida glabrata*
C. guilliermondii – *Candida guilliermondii*
C. humicola – *Candida humicola*
C. inonspicua – *Candida inonspicua*
C. kefyr – *Candida kefyr*
C. krusei – *Candida krusei*
C. lusitaniae – *Candida lusitaniae*
C. magnoliae – *Candida magnoliae*
C. norvegensis – *Candida norvegensis*
C. parapsilosis – *Candida parapsilosis*
C. pseudotropicalis – *Candida pseudotropicalis*
C. rugosa – *Candida rugosa*
C. tropicalis – *Candida tropicalis*
C. vinaria – *Candida vinaria*
C-N – Carbono-nitrogênio
CDC – Center of Disease Control
CEP – Comitê de ética em pesquisa
CIM – Concentração inibitória mínima
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
CTZ – Cetoconazol
CVV – Candidíase vulvovaginal
CVVR – Candidíase vulvovaginal recorrente
dL – Decilitro
DMSO – Dimetilsulfóxido
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay
FCZ – Fluconazol

FDA – Food and Drug Administration
GAL – Galactose
GLI – Glicose
HGU – Hospital Geral Universitário
HIV – Human Immunodeficiency Virus
IAL – Instituto Adolfo Lutz
IC – Intervalo de confiança
ITZ – Itraconazol
Kg – Kilograma
 KH_2PO_4 – Fosfato de potássio monobásico
KOH – Hidróxido de potássio
L – Litro
Lab. - Laboratório
LAC – Lactose
MAL – Maltose
MEL - Melibiose
mg – Miligrama
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Sulfato de magnésio hepta hidratado
Mic. - Micologia
mL – Mililitro
mm - Milímetro
mol – Quantidade de matéria
MOPS – Ácido 3 –[N-morfolino] propanosulfônico
MT – Mato Grosso
NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards
°C – Graus Celsius
pH – Potencial hidrogeniônico
R – Resistente
RAF – Rafinose
RAPD – Randomly amplified polymorphic DNA
RPMI-1640 – Meio Roswell Park Memorial Institute - 1640
S – Suscetível
SAC – Sacarose
S. cerevisiae - *Sacharomyces cerevisiae*

SDD – Susceptível dose-dependente

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

T. inkin – *Trichosporon inkin*

TRE - Trealose

UFC – Unidade formadora de colônias

UNIC – Universidade de Cuiabá

XIL - Xilose

µg – Micrograma

µg/mL – Microgramas por mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspecto clínico do corrimento de candidíase vulvovaginal	10
Figura 2 - Estrutura química da anfotericina B	19
Figura 3 – Estrutura química do cetoconazol	21
Figura 4 – Estrutura química do fluconazol	22
Figura 5 – Estrutura química do itraconazol	23
Figura 6 – Kit utilizado para coleta e semeadura de material clínico	33
Figura 7 – Plaqueamento de colônias em meio CHROMagar	34
Figura 8 – Presença de tubo germinativo – <i>Candida albicans</i>	35
Figura 9 – Aspecto micromorfológico de <i>Candida albicans</i>	36
Figura 10 – Aspecto micromorfológico de <i>Candida parapsilosis</i>	36
Figura 11 – Aspecto micromorfológico de <i>Candida tropicalis</i>	36
Figura 12 – Aspecto micromorfológico de <i>Candida glabrata</i>	37
Figura 13 – Aspecto micromorfológico de <i>Candida krusei</i>	37
Figura 14 – Teste de fermentação de carboidratos, evidenciando a fermentação e formação de gás em glicose, maltose, galactose e trealose.	40
Figura 15 – Teste de assimilação de carboidratos	41

- Figura 16** – Placa de microtitulação com diferentes concentrações de itraconazol (CLSI) e amostras de leveduras do gênero *Candida*. 45
- Figura 17** – Placa ilustrando fitas de Etest (cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B). 46
- Figura 18** – Distribuição das pacientes não gestantes examinadas, segundo presença de sintomas e leveduras isoladas (*C. albicans* e não *albicans*), Hospital Geral Universitário de Cuiabá-MT, 2005-2006. 49
- Figura 19** — Distribuição das pacientes gestantes examinadas, segundo presença de sintomas e leveduras isoladas (*C. albicans* e não *albicans*), Hospital Geral Universitário de Cuiabá-MT, 2005-2006. 49
- Figura 20** – Identificação das espécies de leveduras do gênero *Candida* em pacientes não gestantes, Hospital Geral Universitário de Cuiabá-MT, 2005-2006. 50
- Figura 21** – Identificação das espécies de leveduras do gênero *Candida* em pacientes gestantes, Hospital Geral Universitário de Cuiabá-MT, 2005-2006. 51
- Figura 22** – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de quatro drogas antifúngicas (cetoconazol-Ctz, fluconazol-Fcz, itraconazol-Itz e anfotericina B-Amb) determinadas pelos métodos de susceptibilidade *in vitro* - CLSI e Etest de isolados de *Candida albicans* obtidos de pacientes não gestantes, n= 51 (A, B, C, D) e gestantes, n= 83 (E, F, G, H). 57
- Figura 23** – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de quatro drogas antifúngicas (cetoconazol-Ctz, fluconazol-Fcz, itraconazol-Itz e anfotericina B-Amb) determinadas pelos métodos de susceptibilidade *in vitro* - CLSI e Etest de isolados de *Candida parapsilosis* obtidos de pacientes não gestantes, n= 10 (A, B, C, D) e gestantes, n= 01 (E, F, G, H). 58
- Figura 24** – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de quatro drogas antifúngicas (cetoconazol-Ctz, fluconazol-Fcz, itraconazol-Itz e anfotericina B-Amb) determinadas pelos métodos de susceptibilidade *in vitro* - CLSI e Etest de isolados de *Candida tropicalis* obtidos de pacientes não gestantes, n= 04 (A, B, C, D) e gestantes, n= 01 (E, F, G, H). 59

Figura 25 – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de quatro drogas antifúngicas (cetoconazol-Ctz, fluconazol-Fcz, itraconazol-Itz e anfotericina B-Amb) determinadas pelos métodos de susceptibilidade *in vitro* - CLSI e Etest de isolados de *Candida glabrata* obtidos de pacientes não gestantes, n= 03 (A, B, C, D) e gestantes, n= 02 (E, F, G, H). 60

Figura 26 – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de quatro drogas antifúngicas (cetoconazol-Ctz, fluconazol-Fcz, itraconazol-Itz e anfotericina B-Amb) determinadas pelos métodos de susceptibilidade *in vitro* - CLSI e Etest de isolados de *Candida krusei* obtidos de pacientes não gestantes, n= 02 (A, B, C, D) e gestantes, n= 03 (E, F, G, H). 61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Morfologia das espécies de leveduras do gênero *Candida*. 38
- Tabela 2** – Prevalência de leveduras do gênero *Candida* em pacientes não gestantes e pacientes gestantes do Hospital Geral Universitário de Cuiabá-MT, 2005-2006. 48
- Tabela 3** – Perfil bioquímico (assimilação e fermentação) das espécies de leveduras do gênero *Candida* segundo Kwon-Chung & Bennett, 1992; Kurtzman & Fell, 1998. 52
- Tabela 4** - Variações das concentrações inibitórias mínimas (CIM), CIM₅₀ e CIM₉₀ de isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* em pacientes não gestantes, para quatro drogas antifúngicas, determinadas por duas metodologias. 62
- Tabela 5** - Variações das concentrações inibitórias mínimas (CIM), CIM₅₀ e CIM₉₀ de isolados de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* em pacientes gestantes, para quatro drogas antifúngicas, determinadas por duas metodologias. 63
- Tabela 6** – Comparação dos perfis de susceptibilidade *in vitro* de isolados de leveduras do gênero *Candida* em pacientes não gestantes, utilizando duas metodologias (CLSI e Etest). 66
- Tabela 7** – Comparação dos perfis de susceptibilidade *in vitro* de isolados de leveduras do gênero *Candida* em pacientes gestantes, utilizando duas metodologias (CLSI e Etest). 67
- Tabela 8** – Média, mediana e moda das concentrações inibitórias mínimas, expressos em µg/mL, para quatro drogas antifúngicas de isolados de leveduras do gênero *Candida* em pacientes não gestantes, para as duas metodologias utilizadas (CLSI e Etest). 68
- Tabela 9** – Média, mediana e moda das concentrações inibitórias mínimas, expressos em µg/mL, para quatro drogas antifúngicas de isolados de leveduras do gênero *Candida* em pacientes gestantes, para as duas metodologias utilizadas (CLSI e Etest). 69

RESUMO

A candidíase vulvovaginal é considerada um problema universal que atinge um número elevado de mulheres em todo o mundo.

O presente estudo objetivou a determinação da prevalência de candidíase vulvovaginal em pacientes gestantes ou não, seguida da identificação das espécies de leveduras do gênero *Cândida*, associadas à infecção fúngica, como também a determinação do perfil de susceptibilidade *in vitro* a quatro drogas antifúngicas.

Foram obtidos 160 (39,6%) isolados de leveduras a partir de 404 amostras de secreções vaginais. Das 404 pacientes avaliadas, 201 eram gestantes e 203 não. Das gestantes foram isoladas 90 (44,8%) leveduras do gênero *Candida* e das demais 70 (34,5%).

A pureza dos isolados foi aferida pelo emprego do meio de CHROMagar, o qual foi também útil à confirmação das espécies pela metodologia clássica. Os testes bioquímicos (zimograma e auxanograma) e morfológicos (prova do tubo germinativo e microcultivo em lâmina) constituíram a metodologia clássica.

Todos os isolados revelando colônias puras foram submetidos à determinação do perfil de susceptibilidade *in vitro*. Para a determinação deste perfil, foram utilizadas quatro drogas antifúngicas (cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B) através de duas metodologias: CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute” / microdiluição e Etest® – fitas impregnadas com concentrações de antifúngicos, comercialmente disponível.

Para as pacientes não gestantes foi obtida a seguinte distribuição: *Candida albicans* (72,9%), *C. parapsilosis* (14,3%), *C. tropicalis* (5,7%), *C. glabrata* (4,3%) e *C. krusei* (2,8%). Já nas gestantes 92,3% foram identificadas como *C. albicans*, 3,3% como *C. krusei*, 2,2% como *C. glabrata*, 1,1% como *C. parapsilosis* e 1,1% como *C. tropicalis*.

Todas as drogas testadas apresentaram excelentes atividades *in vitro* frente aos isolados. Considerando pacientes não gestantes, todos os isolados foram susceptíveis ao cetoconazol e a anfotericina B. Em relação ao fluconazol, apenas um isolado de *C. glabrata* de um total de três, mostrou-se susceptível dose-dependente pela metodologia do Etest, e um de *C. krusei* de um total de dois, mostrou-se resistente pela metodologia do CLSI e susceptível dose-dependente pela metodologia do Etest. Para o itraconazol, observou-se susceptibilidade dose-dependência para um, de um total de três isolados de *C. glabrata* e para os dois isolados de *C. krusei*, em ambas as metodologias utilizadas. Em relação às pacientes gestantes, não foi observada resistência para nenhuma das espécies avaliadas frente às quatro drogas. Apenas para o itraconazol, dois, de um total de três isolados de *C. krusei* mostraram-se susceptíveis dose-dependentes quando empregada à metodologia do CLSI.

De forma geral, houve boa correlação entre os resultados obtidos através de duas metodologias distintas (CLSI e Etest).

A leitura dos testes realizada com o emprego da técnica de microdiluição (CLSI) em aparelho de ELISA oferece maior precisão, eliminando problemas referentes à subjetividade da leitura visual. Por outro lado, a complexidade metodológica desfavorece o seu uso em laboratórios de rotina, sendo o Etest uma opção confiável, tendo como vantagens a praticidade e tempo de execução em que se pese o custo elevado. Por estes motivos, pode ser apontada como melhor opção para a rotina laboratorial nos casos de candidíase vulvovaginal, nos quais sejam úteis os testes de susceptibilidade *in vitro*.

ABSTRACT

Candidiasis is considered a universal problem that affects a great number of women throughout the world.

The purpose of this study was to determine the prevalence of vulvovaginal candidiasis in pregnant and nonpregnant patients, as well as to identify the species of yeasts of the genus *Candida* associated with the fungal infection and determine the *in vitro* susceptibility profile to four antifungal drugs.

One hundred sixty (39.6%) yeast isolates were obtained from 404 samples of vaginal secretions. Of the 404 patients evaluated, 201 were pregnant and 203 were not. From the pregnant patients, 90 (44.8%) yeasts of the genus *Candida* were isolated, while 70 (34.5%) yeasts were isolated from the other patients.

The purity of the isolates was measured by using CHROMagar medium, which was also useful in the confirmation of the species through the use of classic methods. Biochemical tests (zymogram and auxanogram) and morphological tests (germ tube test and microculture) constituted the classic methods.

All isolates revealing pure colonies were submitted to determination of the *in vitro* susceptibility profile. For that purpose, four antifungal drugs were used (ketoconazole, fluconazole, itraconazole, and amphotericin B) by two different methods: CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute” / microdilution and the Etest® – strips impregnated with concentrations of antifungals, which are commercially available.

For the nonpregnant patients, the following distribution was obtained: *Candida albicans* (72.9%), *C. parapsilosis* (14.3%), *C. tropicalis* (5.7%), *C. glabrata* (4.3%), and *C. krusei* (2.8%). Among the pregnant patients, 92.3% were identified as *C. albicans*, 3.3% as *C. krusei*, 2.2% as *C. glabrata*, 1.1% as *C. parapsilosis*, and 1.1% as *C. tropicalis*.

All four tested presented excellent *in vitro* activity with the isolates. In the nonpregnant patients, all isolates were found to be susceptible to ketoconazole and amphotericin B. As for fluconazole, only one *C. glabrata* isolate, of a total of three, showed dose-dependent susceptibility when using the Etest method, and one *C. krusei* isolate, of a total of two, showed susceptibility when using the CLSI method and dose-dependent susceptibility when using the Etest method. For itraconazole, dose-dependent susceptibility was observed for one of three *C. glabrata* isolates and the two *C. krusei* isolates, for both methods used. Among the pregnant patients, no resistance of any of the species evaluated, to any of the four drugs, was observed. Only for itraconazole, two of three *C. krusei* isolates showed dose-dependent susceptibility when the CLSI method was used.

In general, there was a good correlation between the results obtained through the two different methods (CLSI and Etest).

The microdilution technique (CLSI) on an ELISA device offers greater precision for test reading, eliminating problems with the subjectivity of visual reading. On the other hand, the complexity of the method makes it difficult to use it routinely, and the Etest is a reliable option with the advantages of being practical and fast to perform, despite its high cost. For these reasons, one can consider it as the best option for laboratory routine in cases of vulvovaginal candidiasis in which *in vitro* susceptibility tests may be helpful.

SUMÁRIO

1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	1
2. INTRODUÇÃO	5
O gênero Candida e as candidíases	6
Candidíase vulvovaginal	7
<i>Microbiologia / Fisiopatologia / Mecanismos defensivos</i>	<i>8</i>
<i>Formas de apresentação</i>	<i>11</i>
<i>Fatores predisponentes</i>	<i>12</i>
Diagnóstico micológico	13
Diagnóstico diferencial	14
Tratamento da candidíase vulvovaginal	16
Drogas antifúngicas	17
<i>Polienos</i>	<i>17</i>
<i>Derivados azólicos</i>	<i>19</i>
Resistência a drogas antifúngicas	24
Testes de susceptibilidade às drogas antifúngicas	24
Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI	25
Metodologia comercial (Etest).....	26
Correlação entre os resultados dos testes de susceptibilidade <i>in vitro</i> e os efeitos terapêuticos <i>in vivo</i>	27
Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	27
3. OBJETIVOS	29
Objetivo geral	30
Objetivos específicos	30
4. METODOLOGIA	31
Seleção de pacientes	32
Cultivo das amostras	32
Identificação das amostras	33
<i>Avaliação quanto à pureza</i>	<i>34</i>
<i>Pesquisa de tubo germinativo</i>	<i>34</i>

<i>Microcultivo</i>	35
<i>Provas bioquímicas</i>	39
<u>Zimograma</u>	39
<u>Auxanograma</u>	40
Testes de sensibilidade aos antifúngicos: cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B	42
<i>Cepas de referência</i>	42
<i>Microdiluição em caldo CLSI (2005)</i>	42
<i>Etest</i>	45
Procedimentos de análise dos resultados	46
5. RESULTADOS	47
Isolamento das amostras	48
Sintomatologia associada às pacientes e leveduras isoladas	48
Identificação das espécies	50
Determinação da concentração inibitória mínima de quatro drogas antifúngicas para os isolados de leveduras do gênero <i>Candida</i> de pacientes não gestantes e pacientes gestantes	53
<i>Microdiluição em caldo CLSI (2005)</i>	53
<i>Etest</i>	55
<i>Variação do perfil de susceptibilidade obtido pela metodologia de microdiluição segundo o documento M 27 A2 (CLSI, 2005)</i>	63
<i>Variação do perfil de susceptibilidade obtido pela metodologia comercial Etest</i>	64
<i>Grau de concordância entre as metodologias CLSI e Etest</i>	65
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÕES	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
9. ANEXOS	101

1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Candidíases são infecções fúngicas predominantemente endógenas e de caráter oportunista, envolvendo leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, que compreende aproximadamente 163 espécies, sendo apenas um número reduzido dessas, comprovadamente associadas a processos patológicos humanos, devendo-se destacar: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis* (Kwon-Chung & Bennet, 1992; Kurtzman & Fell, 1998; Lacaz et al., 2002a).

Distúrbios na defesa imune celular, alterações fisiológicas ou patológicas e desequilíbrios na microbiota normal, podem levar ao desenvolvimento das candidíases. A gravidade da doença dependerá mais diretamente do grau de alteração do hospedeiro do que do potencial patogênico dessas leveduras. Em função do caráter predominantemente endógeno, da habilidade de colonização e do oportunismo evidente dessas leveduras, as candidíases são bastante freqüentes e têm distribuição mundial (Lacaz et al., 2002a).

A partir dos anos 90, o fenômeno de resistência às drogas tornou-se um problema mais agudo associado a vários tipos de infecções, destacando-se aquelas relacionadas ao Human Immunodeficiency Virus (HIV), à tuberculose, além daquelas referentes às bactérias da microbiota humana normal, que são responsáveis por quadros graves de infecções hospitalares. Concomitantemente, têm-se observado a emergência e o aumento da ocorrência das infecções fúngicas, resultantes de alterações no sistema imune associadas à epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), tratamentos oncológicos através de quimioterapia e/ou radioterapia, transplantes de órgãos, além do uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos, que são responsáveis pela alteração da microbiota autoctone e favorecedores do aumento do número de microrganismos resistentes, tornando-se cada vez mais difícil o tratamento destas infecções (Cuenca-Estrela & Rodriguez-Tudella, 2002).

O aumento da ocorrência das infecções fúngicas tem evidenciado a necessidade do desenvolvimento de novas drogas antimicóticas. Atualmente são utilizados nas condutas terapêuticas basicamente dois grupos de antifúngicos: o grupo dos poliênicos e dos azóis que, apesar de serem drogas de eficácia comprovada, apresentam vários problemas associados ao seu uso, podendo-se destacar os efeitos colaterais, a ineficiência de alguns desses agentes frente às espécies emergentes e, principalmente, à detecção de várias amostras resistentes aos principais antifúngicos disponíveis.

Considerando a candidíase vulvovaginal, o CDC (Center of Disease Control) divide esta infecção fúngica em duas categorias: simples e recorrente. A simples tem gravidade leve à moderada, episódios esporádicos, não recorrentes, em uma hospedeira normal com uma espécie

de *C. albicans* sensível. Porém, a candidíase vulvovaginal recorrente, é assim considerada pela gravidade, recorrência, acometimento em uma hospedeira imunologicamente comprometida ou ser causada por uma espécie menos sensível, por exemplo, aquelas não-*albicans* (Sobel et al., 1998a).

Ao desencadear da infecção, alguns fatores predisponentes são apontados como contribuições significativas, dentre eles podem ser citados: gravidez, uso de anticoncepcionais, terapêutica com corticosteróides, antibioticoterapia, higiene pessoal deficiente, distúrbios endócrinos, roupas íntimas sintéticas, relações sexuais, agentes sensibilizantes da pele. Podem ainda ser citadas como fontes de re-infecção: parceiros masculinos, pele dos genitais, artigos de uso pessoal e trato gastrointestinal (Ziarrusta, 2002).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é a segunda causa mais freqüente de vulvovaginite. Estima-se que 75 % das mulheres terão um episódio de CVV ao longo de suas vidas, sendo que 40% a 50% destas teriam a segunda infecção e cerca de 5% poderiam adquirir padrão crônico, com episódios de repetição (Adad et al., 2001).

Leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por 15% a 25% dos casos de vulvovaginites, sendo causadas por espécies que habitam as mucosas vaginal e digestiva e que crescem em meio favorável ao seu desenvolvimento. *C. albicans* está presente como microbiota vaginal normal em 15% a 20% das mulheres adultas saudáveis e em 30% a 40% das grávidas. Outras espécies como *C. glabrata* e *C. parapsilosis* podem estar presentes em proporções relativamente menores (Bauters et al., 2002).

O diagnóstico da CVV deve ser bem estabelecido, com todos os critérios clínicos e exames laboratoriais adequados, para que não ocorram erros e o uso desnecessário de drogas antimicóticas. O autodiagnóstico de CVV, sem exame microscópico e/ou avaliação clínica, dificulta os estudos epidemiológicos e pode induzir resistência do microrganismo ao tratamento convencional.

Ao que tange à terapêutica da CVV, os azólicos orais tem sido bastante empregados com altas taxas de cura, e os efeitos colaterais são leves e infrequentes. Porém são contraindicados durante a gravidez. O regime de uma única dose oral com fluconazol é altamente eficaz em casos não complicados. As drogas antimicóticas tópicas atingem em média 80% de cura. Para os casos recorrentes, recomenda-se terapia antifúngica oral mantida por seis meses.

Em vários estados brasileiros têm sido registrados dados referentes ao perfil epidemiológico das espécies de leveduras isoladas, a partir de espécimens clínicos (secreções vaginais) provenientes de pacientes acometidas por quadros de candidíase vulvovaginal. Há

também relatos do perfil de susceptibilidade às drogas antifúngicas para as referidas espécies do gênero *Candida* (Aleixo Neto et al., 1999; Galle & Gianini, 2004; Ferraza et al., 2005).

No entanto, em que pese à reconhecida importância das candidíases vulvovaginais e o seu freqüente aparecimento devido aos fatores predisponentes classicamente conhecidos, em Cuiabá, a grande maioria dos laboratórios ainda não realiza a identificação das espécies de leveduras. Testes *in vitro* podem ser úteis para estabelecer o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos para leveduras do gênero *Candida* em vulvovaginites.

Atualmente tem-se observado o aumento de espécies não-albicans associados aos casos de candidíase vulvovaginal recorrente. Com o emprego dos azólicos observa-se que fracassos terapêuticos são infrequentes e quando ocorrem, estão relacionados à detecção destas espécies em episódios recorrentes.

Desta forma, considera-se relevante à realização do estudo da distribuição de espécies de leveduras do gênero *Candida* isoladas a partir de secreções vaginais, em pacientes com suspeita clínica de candidíase e determinar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro*, ainda não documentados na literatura no que se refere ao Estado de Mato Grosso.

2. INTRODUÇÃO

2.1. O gênero *Candida* e as candidíases

As leveduras são microrganismos predominantemente unicelulares, imóveis e congregam um grupo funcional de organismos heterotróficos que colonizam substratos contendo fontes de carbono. Com relação à faixa de temperatura são classificadas como mesófilos, crescendo preferencialmente entre 18° e 45° C. Taxonomicamente pertencem a 98 gêneros entre as classes Ascomycetes e Basidiomycetes (Kurtzman & Fell, 1998).

Leveduras do gênero *Candida* são classificadas no Reino Fungi, como membros do Phylum Ascomycota, divisão Deuteromycetes, ordem Saccharomycetales, família Saccharomycetaceae (Alexopoulos et al., 1996). O gênero *Candida* compreende aproximadamente 200 espécies que se reproduzem assexuadamente por brotamento. Essas leveduras possuem tanto a capacidade fermentativa quanto assimilativa, sendo capazes de crescer em uma variedade de substratos orgânicos (Segal & Baum, 1994). A maioria das espécies patogênicas cresce muito bem em cultivos aeróbios, embora possa crescer também em elevadas concentrações de gás carbônico atmosférico e em meios pobres ou ricos em nutrientes, com um pH entre 2,5 e 7,5 e temperatura entre 20°C e 38°C. Quase todas as espécies do gênero requerem biotina para o crescimento e algumas delas exigem um suplemento vitamínico mais elaborado (Odds, 1988a).

A classificação específica de *Candida* é baseada primariamente em critérios fisiológicos e morfológicos (Meyer & Ahearn, 1984). Isso inclui a diferenciação por padrões de assimilação e fermentação de carboidratos e atividades enzimáticas específicas. Além disso, devem-se considerar características micromorfológicas como tamanho e forma dos blastoconídios, produção de pseudomicélio e presença ou ausência de clamidoconídios (Segal & Baum, 1994).

As leveduras são ubíquas no meio ambiente, sendo encontradas no solo, na água, nos vegetais e como habitantes do corpo humano, fazendo parte da microbiota normal endógena. Podem estar presentes em espécimens clínicos, como resultado de contaminação ambiental, colonização ou processo infeccioso. Portanto, o significado de sua presença em material biológico, depende do número de amostras positivas com o mesmo organismo em um mesmo paciente, do número de colônias formadas e se o material é proveniente de sítios estéreis ou não (Mendes-Giannini & Melhem, 1996; Warren & Hanzen, 1999).

A maioria das espécies do gênero *Candida* habita uma variedade de nichos ecológicos, geralmente como saprófitas (Rose & Harrison, 1989). Apenas um pequeno número,

dessas espécies, associa-se aos processos patológicos humanos, representando grande interesse em clínica médica (Odds, 1988a). Do ponto de vista clínico, *C. albicans* é a principal espécie do gênero, associada à maioria das manifestações patológicas causadas por essas leveduras (Lacaz et al., 2002). Pelo fato dessa espécie fazer parte da microbiota humana normal, a doença apresenta um evidente caráter oportunista (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Além dessa espécie, são reconhecidas outras com potencial patogênico: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. pseudotropicalis* (ou *C. kefyr*), *C. lusitaniae* e *C. rugosa*.

Sullivan et al. (1993; 1995), descreveram uma espécie do gênero *Candida* atípica, isolada da cavidade oral de pacientes HIV sorotipos e portadores de SIDA; esta espécie foi denominada *C. dubliniensis*.

Independente do potencial patogênico de diferentes espécies do gênero *Candida*, é observado que as doenças determinadas por essas leveduras se constituem em quadros infecciosos essencialmente oportunistas, ocorrendo sempre em associações com alguma condição mórbida subjacente. Uma série de fatores predisponentes vem sendo associada à ocorrência das candidíases, podendo ser agrupados àqueles inerentes ao hospedeiro e, por outro, naqueles extrínsecos, ou referentes aos procedimentos médicos iatrogênicos (Odds, 1988a; Rippon, 1988; Kwon-Chung & Bennet, 1992; Lacaz et al., 2002a).

Quando há ruptura do equilíbrio, local ou imunológico, leveduras do gênero *Candida* passam do estado saprofítico para o patogênico, podendo formar pseudo-hifas, invadir tecidos e provocar candidíase, ocasionando sintomas indesejáveis (Fidel, 2002).

As candidíases podem acometer todos os tecidos do hospedeiro humano, ocasionando uma diversidade de quadros clínicos, tanto no que se referem à localização, podendo ser superficiais, profundas, localizadas ou disseminadas, quanto ao modo de evolução (agudo, subagudo, crônico ou episódico) e gravidade da doença, apresentando-se como infecções leves e benignas até graves ou mesmo fatais. Geralmente estão associadas, e progridem de acordo com o grau de acometimento do hospedeiro (Odds, 1988a; Rippon, 1988).

2.2. Candidíase vulvovaginal

A maioria das mulheres apresenta pelo menos um episódio de CVV ao longo de sua vida. Outras, porém, apresentam pelo menos três episódios infecciosos em um ano. Entretanto, 5% das mulheres apresentam candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), isto é, quando ocorre

quatro ou mais episódios em um ano. As recidivas são um desafio para os ginecologistas e alteram a qualidade de vida das mulheres (Hurley, 1981).

Candidíase vulvovaginal é um problema universal que afeta um número significativo de mulheres em todo o mundo. Esse tipo de infecção fúngica cria um desconforto na mulher muito grande, que pode comprometer a relação sexual e afetiva, devido às dificuldades de tratamento e o desconforto que elas sofrem (Kent, 1991).

A infecção micótica vulvovaginal foi descrita pela primeira vez por JS Wilkinson em 1949, o qual estabeleceu uma relação entre a existência de fungos na vagina e o aparecimento de uma vaginite. A partir deste momento os conhecimentos foram evoluindo progressivamente. Atualmente vulvovaginite micótica é causada por fungos leveduriformes e a maior parte por espécies pertencentes ao gênero *Candida* (Ziarrusta, 2002).

Peria (2003) verificou a presença de outros gêneros e espécies de leveduras, além de alga aclorofilada associadas à vulvovaginites, identificando *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, encontrou também, *C. famata*, *C. kefyr*, *C. vinaria*, *C. guilliermondii*, *Trichosporon asahii*, *T. inkin*, *Prototheca wickerhamii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhodotorula mucilaginosa*, em estudo realizado com 300 mulheres.

2.2.1. Microbiologia / Fisiopatologia / Mecanismos defensivos

São conhecidas mais de 200 espécies de leveduras do gênero *Candida*, sendo que apenas um pequeno número afeta o homem com caráter patogênico. *C. albicans* é muito comum e freqüentemente, é a espécie mais detectada em ginecologia (80 a 90% dos casos) (Sobel, 1996). *C. glabrata* é encontrada em 5 a 15% dos casos de candidíase vulvovaginal. Outras espécies detectadas em infecções ginecológicas são: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis* e *C. parapsilosis*. Neste sentido, nos últimos anos tem sido relacionado o aumento de outras espécies de leveduras do gênero *Candida* a uma maior taxa de recorrência de episódios de vulvovaginites (Ziarrusta, 2002).

O trato genital feminino apresenta um complicado biótipo microbiológico e as leveduras podem estar presentes na vagina com a ausência de sintomas clínicos sendo que as mulheres podem tornar-se colonizadas por diversos motivos, permanecendo por um longo período de suas vidas com esses microrganismos (Mendling et al. 2000).

Leveduras do gênero *Candida* são fungos oportunistas que podem ser encontrados em dois diferentes estados. Os esporos (blastosporos) constituem o fenótipo para extensão,

disseminação e transmissão. Compõem uma forma resistente do fungo e estariam associados com a colonização assintomática. Por outro lado, os pseudo-micélios são as formas germinativas, este fenótipo tem capacidade invasora tissular e ocasiona a sintomatologia própria da infecção (Ferrer, 2000).

O processo de patogênese da *Candida* segue três etapas, sendo a primeira à adesão. A adesão é muito importante para a sobrevivência dos esporos. A capacidade de adesão da *C. albicans* é maior que das outras espécies, isto poderia explicar a grande frequência desta espécie neste tipo de infecção. A adesão ocorre pela união de uma proteína transmembrana presente na membrana do fungo ao receptor de membrana da célula (Ziarrusta, 2002).

Existem fatores que podem atuar como promotores e facilitadores do processo de adesão. Um ambiente hiperestrogênico aumenta a exposição dos complexos glicoproteicos que atuam como receptores, facilitando assim, a aderência do fungo na superfície epitelial. Por isso, a candidíase vulvovaginal é menos frequente em situações de baixa de estrogênio, como na pré-menarca e pós-menopausa. Todavia, a gestação e a ingestão de anticoncepcionais orais de altas doses de estrogênios podem aumentar a chance de infecção (Ziarrusta, 2002).

Redd (1992) determinou que as altas taxas de hormônios contribuem para um aumento dos níveis de glicogênio, bem como o pH vaginal resultando numa disponibilidade maior de fontes de carbono para a multiplicação das leveduras.

Outro fator que pode afetar a capacidade de adesão dos fungos é a competição com a microbiota vaginal (lactobacilos vaginais). Os lactobacilos inibem a adesão do fungo à superfície epitelial por um processo de co-agregação e competição pelos receptores. Desta forma uma redução dos lactobacilos favorece o aumento da infecção (Veronesi, 1996; Ferrer, 2000; Ziarrusta, 2002).

Os bacilos de Doderlein, lactobacilos produtores de peróxido formam ácido láctico a partir do glicogênio, cuja produção e secreção são estimuladas pelos estrogênios. Este mecanismo propicia uma acidez adequada (pH 4,5) do ambiente vaginal, dificultando a maioria dos patógenos. As leveduras do gênero *Candida* são exceções, pois proliferam em ambiente ácido (Val & Almeida Filho, 2001). Os *Lactobacillus* também são capazes de produzir substâncias bactericidas capazes de inibir a formação de pseudo-hifas (Ziarrusta, 2002).

Biasoli et al (1999) demonstraram em seus trabalhos que as leveduras podem aumentar sua adesão sob variações de pH, principalmente em 7,2.

Após adesão, os esporos são capazes de penetrar no epitélio vaginal e causar a vulvovaginite. Para isto, é necessária a reprodução dos esporos e formação de pseudo-hifas. Uma vez formado os pseudo-micélios, as leveduras do gênero *Candida* são capazes de penetrar e

invadir o epitélio vaginal. Este processo de penetração está diretamente relacionado com a produção de uma série de proteases pelas pseudo-hifas capazes de destruir proteínas com função de defesa em nível de mucosa vaginal (Ziarrusta, 2002).

Os estrogênios promovem também a formação de pseudo-micélios, facilitando a penetração e conseqüentemente o aparecimento da infecção clínica (Ziarrusta, 2002).

A invasão epitelial ocasiona liberação de uma série de substâncias (prostaglandinas e bradicininas) com capacidade de induzir um processo inflamatório local: ocasionando edema, eritema e aumento do fluido vaginal. A leucorréia causada por leveduras do gênero *Candida* é composta de células vaginais esfoliadas e polimorfonucleares (Ziarrusta, 2002).

Acredita-se que uma das causas dessa doença esteja relacionada ao sistema imune, e que a recorrência vaginal seja devido a uma disfunção ou deficiência no sistema imunológico (Fidel & Sobel, 1998; Weissenbacher et al, 2000).

Além do equilíbrio da microbiota vaginal, outros fatores contribuem para a defesa vaginal: integridade da mucosa, presença das imunoglobulinas A e G e dos polimorfonucleares e monócitos (Val & Almeida Filho, 2001).

Os sintomas característicos da candidíase vulvovaginal são: prurido intenso, ardência, escoriação, edema, eritema vulvar ou vaginal, disúria e dispareunia. O corrimento vaginal é branco, espesso, floculado, com aparência de leite coalhado e inodoro (Figura 1) (Val & Almeida Filho, 2001; Shimp, 2002; Bates, 2003; Lopes Consolaro et al., 2004).



Figura 1 – Aspecto clínico do corrimento de candidíase vulvovaginal

Fonte: www.crbetinho.hpg.ig.com.br

2.2.2. Formas de apresentação

Segundo a forma de apresentação, a candidíase é classificada como: não complicada (candidíase vulvovaginal esporádica, candidíase vulvovaginal de grau leve a moderado, candidíase frequentemente associada à *C. albicans* e candidíase na ausência de gravidez) e complicada (candidíase vulvovaginal recorrente, candidíase vulvovaginal severa, candidíase não-albicans e alterações do hospedeiro – diabetes, imunodepressão e gravidez) (Sobel et al., 1998a).

No que diz respeito à candidíase vulvovaginal recorrente é definida como infecção por leveduras do gênero *Candida* caracterizada por quatro ou mais episódios em um período de 12 meses (Val & Almeida Filho, 2001).

Existe consenso sobre a necessidade de se determinar o fato a que se deve essa recorrência, e por qual motivo, a levedura persiste na vagina causando infecções (Millon et al, 1994).

Duas hipóteses foram formuladas para explicar os episódios de candidíase vulvovaginal recorrente. Por um lado pode ocorrer a reinfecção a partir de outros sistemas orgânicos (sistema digestivo, trato urinário, etc) ou por contaminação sexual (Sobel, 1985; Lanchares & Hernández, 2000). Por conseguinte, a recorrência ou recidiva pode ser devido à hipótese de diferentes biotipos de cepas detectadas em sucessivos episódios. A ausência de uma completa erradicação por um tratamento inadequado ou por existência de cepas resistentes pode ocasionar em falha terapêutica, ocasionando recidiva (Ziarrusta, 2002).

A maioria das infecções por *C. albicans* são de origem endógena decorrentes da proliferação ou da mudança de sítio da levedura, induzidos por alguns fatores predisponentes do hospedeiro ou do parasita, mas também pode existir a possibilidade de ocorrerem infecções exógenas (Ferrer, 2000).

Diferentes fatores têm sido observados em ambas as hipóteses, incluindo aqueles referentes ao agente infeccioso e ao hospedeiro. Reinfecção através de fonte digestiva (contaminação anal) e fonte sexual (contaminação através do parceiro) podendo ser consideradas infecções causadas pela mesma cepa. Quadros recidivantes geralmente causados por espécies não albicans, podem estar associados à virulência das cepas gerando resistência aos antifúngicos. As recidivas também podem estar relacionadas ao hospedeiro, através de causas imunológicas como baixa da imunidade humoral e celular ou não imunológicas como alteração da microbiota vaginal e aumento dos níveis de estrogênios (Ziarrusta, 2002).

2.2.3. Fatores predisponentes

A gravidez predispõe tanto a candidíase vulvovaginal primária quanto às recidivas. É especialmente mais freqüente a partir da 28ª semana de gestação. A infecção nesta situação supõe um desafio terapêutico importante provavelmente devido aos altos níveis de glicogênio produzido pelo epitélio vaginal estimulado pelos altos níveis de estrogênios gestacionais; favorecendo assim um elemento nutritivo e facilitador tanto da reprodução como da multiplicação dos fungos. Níveis elevados de progesterona podem apresentar efeito supressor sobre a imunidade celular, além de aumentar a expressão do gene responsável pela síntese celular do receptor epitelial destinado à ligação do fungo (Ziarrusta, 2002).

Do mesmo modo, a utilização de anticoncepcionais orais de altas doses de estrogênios, predispõe o aparecimento de candidíase vulvovaginal (Ziarrusta, 2002). Estudos mostram que quando são administrados baixos níveis de estrogênios, o nível da infecção mostra-se baixo. O mesmo autor sugere que a interrupção da administração de anticoncepcionais pode levar a cura de candidíase vulvovaginal (Sobel, 1992).

Os dispositivos intra-uterinos também têm sido associados a episódios de candidíase vulvovaginal, provavelmente por agirem como reservatório (Ziarrusta, 2002). O dispositivo intra-uterino “Diu” pode propiciar o aparecimento de candidíase vulvovaginal, devido ao surgimento do biofilme na sua superfície externa, que acaba por proteger as leveduras da ação dos antifúngicos (Marrie & Costerton, 1983; Parewijck et al, 1988; Auler et al, 2001a; Chandra et al, 2001).

Qualquer alteração nos níveis de glicose (especialmente em situações de hiperglicemia – diabetes ou em qualquer outro estado que produz a elevação do glicogênio vaginal) pode promover uma candidíase vulvovaginal. O excesso de glicogênio, além de aumentar os substratos nutritivos para os fungos, promove o aumento da capacidade de adesão dos fungos (Ziarrusta, 2002).

A utilização de antibióticos pode tanto aumentar a colonização quanto infecção por leveduras do gênero *Candida*. Os antibióticos agem na microbiota vaginal, eliminando o principal mecanismo de defesa vaginal frente aos fungos (Ziarrusta, 2002).

Doenças da tireóide, obesidade, corticoterapia, drogas imunossupressoras e infecção por HIV, parecem aumentar o risco de infecção causada por leveduras do gênero *Candida* (Sobel et al., 1998a; Val & Almeida Filho, 2001).

2.3. Diagnóstico micológico

O exame microscópico direto (à fresco) da candidíase vulvovaginal com solução salina se caracteriza por conter grande número de células epiteliais, esporos, micélios e leucócitos (Jovanovic et al., 1991). Com adição de hidróxido de potássio (KOH) a 10 ou 20%, há facilidade quanto à observação dos elementos fúngicos, clareando o material a ser examinado por dissolução dos grumos de células epiteliais, tornando-os transparentes, dissolvendo piócitos e hemácias, permitindo melhor visualização das leveduras e pseudo-hifas que adquirem aspecto intumescido (Val & Almeida Filho, 2001).

O ágar Sabouraud dextrose é o meio padrão para cultivo de fungos. O ágar Sabouraud modificado, acrescido de antibacteriano e cicloheximida é usado rotineiramente, pois a adição destes compostos objetiva inibir, respectivamente, bactérias e fungos contaminantes, presentes na microbiota normal da pele e/ou ambiente (Rippon, 1988a, Weitzman & Summerbell, 1995). No entanto, várias espécies de leveduras do gênero *Candida* que não *C. albicans*, são inibidas pela cicloheximida, o que desaconselha o uso exclusivo deste meio na rotina micológica.

As técnicas convencionais para identificação das espécies de leveduras do gênero *Candida* são baseadas principalmente em métodos bioquímicos, como fermentação e assimilação de carboidratos, habilidade em formar tubo germinativo a 37°C em soro e produzir clamidoconídios em ágar fubá acrescido de Tween 80 (Kurtzmann & Fell, 1998).

Para a identificação rápida e presuntiva de *C. albicans* verifica-se, primeiramente, a formação de tubo germinativo de amostra incubada em soro humano 37° C por 3 horas. A identificação das outras espécies é confirmada através de testes bioquímicos, que medem a capacidade de cada espécie de assimilar e fermentar compostos químicos que representam diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Há alguns anos estão disponíveis “kits” comerciais para identificação de leveduras pela técnica de turbidimetria (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

O microcultivo em ágar fubá acrescido de Tween 80, incubado a 28° C por até sete dias, evidencia a presença de clamidoconídios terminais, quando o isolado é *C. albicans*. Outras características micromorfológicas, tais como tipo de brotamento, presença ou não de pseudo-hifas e distribuição dos blastoconídios ao longo destas estruturas, podem definir, para o examinador experiente, outras espécies de leveduras do gênero *Candida* de interesse médico (Koneman et al., 2001a).

Odds & Bernaerts (1994) analisaram o meio de cultura cromogênico, CHROMagar Candida, para isolamento e diagnóstico diferencial de leveduras do gênero *Candida* em amostras clínicas.

2.4. Diagnóstico diferencial

Em se tratando de corrimento vaginal, o diagnóstico diferencial de candidíase vulvovaginal se faz necessário, com outras etiologias, pois implicará em diferentes tratamentos.

O corrimento vaginal é uma das preocupações mais frequentes entre as mulheres, principalmente, nas que estão em idade reprodutiva (Ferracin & Oliveira, 2005).

A secreção vaginal é uma resposta fisiológica do organismo feminino. Quando não existe processo patológico envolvido, o fluxo vaginal apresenta-se de cor clara ou branca, sendo composta de líquidos cervicais, podendo variar na quantidade e no aspecto, dependendo do período do ciclo menstrual. No entanto, quando algum processo infeccioso ou inflamatório encontra-se presente, as características da secreção modificam-se, caracterizando o corrimento vaginal (Shimp, 2002; Bates, 2003).

Observar a história da paciente como: início do corrimento, fase do ciclo menstrual, duração, cor, odor, história sexual ou uso concomitante de medicamentos, pode auxiliar no reconhecimento da causa e no tratamento adequado do corrimento vaginal. As causas que podem contribuir para a ocorrência de corrimento vaginal são: infecções sexualmente transmitidas (clamídia, gonorréia, tricomoníase, herpes simples), outras infecções (candidíase, vaginose bacteriana), causas comumente associadas às condições predisponentes (gravidez, iatrogenia, diabetes, câncer e condições dermatológicas) e por alterações fisiológicas (vaginite atrófica) (Ferracin & Oliveira, 2005, Moreira & Paula, 2006).

Os patógenos mais frequentes associados às vaginites, ao lado de leveduras do gênero *Candida*, são: bactérias, principalmente *Gardnerella vaginalis* e o protozoário flagelado *Trichomonas vaginalis* (Pray, 2001). Das infecções sexualmente transmissíveis, a infecção por *Chlamydia trachomatis* é a mais comum. A clamídia é um parasita intracelular que infecta o epitélio do canal endocervical e a uretra (Bates, 2003). Cerca de 80% das pacientes infectadas por clamídia são assintomáticas (“Centers for Disease Control and Prevention”, 2002), porém se os sintomas existem, se manifestarão de uma a três semanas após a infecção, como um corrimento vaginal purulento, sangramento pós-coital ou inter-menstrual, dor abdominal baixa e dispareunia (Bates, 2003).

A *Neisseria gonorrhoeae* é um diplococo gram-negativo que infecta os sítios de contacto sexual como o endocérnix, a uretra e o reto. O período de incubação do gonococo é de cinco a sete dias. Na maioria das vezes, a infecção é assintomática na mulher, mas pode aparecer um corrimento vaginal espesso e purulento. A infecção não tratada pode evoluir para doença inflamatória pélvica (Bates, 2003). O diagnóstico laboratorial de rotina da gonorréia se faz pela microscopia, coloração de Gram e cultura (Macseen & Ridgway, 1998).

Um corrimento vaginal abundante, delgado, espumoso e fétido, de cor acinzentada, amarelada ou esverdeada, constitui o principal sintoma da infecção por *Trichomonas vaginalis* em 70% das mulheres. A via primária de transmissão é o contacto sexual, com um período de incubação entre quatro a vinte dias após a exposição ao protozoário (Shimp, 2002).

O diagnóstico da tricomoníase em mulheres é baseado nos sintomas que a paciente apresenta, no exame pélvico e na avaliação laboratorial do corrimento vaginal. A paciente pode apresentar prurido, eritema vulvar, erosões na cérnix e linfadenopatia localizada. O pH do corrimento vaginal é geralmente maior que 4,5 e o exame microscópico revela a presença de leucócitos e trichomonas. A adição de KOH à 10% ao corrimento pode produzir um característico “odor de peixe” (Centers for Disease Control and Prevention, 2002).

A vaginose bacteriana é a causa mais comum de corrimento vaginal em mulheres em idade reprodutiva. É caracterizada por um crescimento anormal de bactérias anaeróbias como *Gardnerella vaginalis*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus*, *Prevotella*, *Bacteroides* e *Micoplasma hominis*, com concomitante diminuição de lactobacilos da microbiota normal (Shimp, 2002; Bates, 2003).

Os lactobacilos produzem o ácido láctico através da glicólise, e assim mantêm o pH vaginal ácido. A alcalinização repetida da vagina, que pode ser resultante de intercursos sexuais frequentes, uso de duchas vaginais ou período pré-menstrual, favorece a alteração da microbiota bacteriana vaginal (Soper, 1998). O “odor de peixe” pode aparecer por causa da produção de amins pelo metabolismo aeróbio (Bates, 2003).

Metade das mulheres com vaginose bacteriana é assintomática. Mas, os sintomas comuns incluem corrimento vaginal delgado, homogêneo e geralmente de cor branca, acinzentada, amarelo-esverdeada. Prurido, inflamação e irritação podem ocorrer em cerca de 15% das mulheres (Shimp, 2002).

O diagnóstico da vaginose bacteriana baseia-se no pH, sempre maior que 4,5, e na presença de células indicadoras ou “clue cells” no exame direto do corrimento (Bates, 2003).

A vaginite atrófica caracteriza-se por uma inflamação relacionada com a atrofia da mucosa, secundária a uma diminuição nos níveis de estrogênio (Bates, 2003). Com a diminuição

do estrogênio, o epitélio vaginal torna-se fino e a lubrificação vaginal diminui. Estas alterações provocam uma redução na produção de lactobacilos e um aumento do pH, favorecendo o crescimento de coliformes, contribuindo assim a produção do corrimento vaginal (Shimp, 2002). Além da diminuição da lubrificação vaginal, sintomas como irritação, secura, ardência, prurido e dispareunia podem ocorrer (Shimp, 2002; Bates, 2003). O corrimento vaginal se apresenta delgado, aquoso, fétido, de cor amarelada e ocasionalmente podendo conter sangue (Sobel, 1997; Shimp, 2002).

Durante a gravidez, a presença de um corrimento vaginal é comum e decorre principalmente da hipertrofia do epitélio vaginal com aumento de células contendo glicogênio (Bates, 2003).

Tratamento da candidíase vulvovaginal

A CVV não complicada responde prontamente à terapia antifúngica tópica ou oral de curso curto. Em geral, os antifúngicos imidazólicos aplicados topicamente durante 1-3 dias são os agentes mais efetivos, alcançando taxas de cura clínica em torno de 85-90%, quando comparados com a nistatina, a cura se estabelece em 75-80% (Sobel et al., 1998a).

Butaconazol, clotrimazol, miconazol e tioconazol têm espectros de ação similares, sendo que o terconazol tem melhor atividade contra espécies de *Candida* não albicans. A terapia com agentes orais apresenta taxa de cura ligeiramente melhor que a terapia com antifúngicos tópicos, sendo que a maioria das mulheres prefere a terapia oral pelo conforto da administração (Sobel et al., 1998b). Os antifúngicos orais que tem mostrado efeito nestas condições são: cetonaazol, itraconazol e fluconazol. O fluconazol é único antifúngico oral aprovado para o tratamento da CVV pela FDA – Food and Drug Administration (Val & Almeida, 2001).

Os esquemas de tratamentos têm sido preferencialmente os sistêmicos, pois erradicam os reservatórios genitais e extragenitais. É recomendável tratar ambos os parceiros principalmente em recidivas e insucessos (Halbe, 2000).

As doses únicas são os esquemas terapêuticos de escolha, devido a sua praticidade. A primeira dose única comercializada foi na década de 80 (formulação de 500 mg de clotrimazol). Posteriormente outras formulações foram lançadas com fenticonazol, tioconazol e sertonaazol alcançando grande difusão no mercado (Ziarrusta, 2002; Ferracin & Oliveira, 2005).

Na CVV complicada, há necessidade de terapia prolongada, sendo eleitos antifúngicos tópicos por mais de 07 dias, associados ou não, dependendo do quadro, com

antifúngicos orais em esquemas de doses maiores e prolongadas (Val & Almeida, 2001; Ferracin & Oliveira, 2005). Após controle da CVV deve ser instituída terapêutica medicamentosa prolongada. A profilaxia ou um regime de manutenção deve ser realizado por 6 meses, incluindo: fluconazol 150 mg (1 x por semana), cetoconazol 100 mg (1 x ao dia), itraconazol 100 mg (dias alternados) ou aplicação de imidazólico tópico diariamente (Sobel et al., 1998a; Sobel et al., 2001).

O tratamento de gestantes com candidíase vulvovaginal é mais difícil devido à resposta clínica ser mais lenta e as recorrências serem mais freqüentes. Em geral, a maioria dos agentes tópicos é eficaz, principalmente quando prescritos por longos períodos, de uma a duas semanas. Contudo, dose única com 500 mg de clotrimazol também tem mostrado eficácia em gestantes. Embora a absorção sistêmica do antifúngico tópico seja mínima, o potencial de risco ao desenvolvimento do feto durante o 1º trimestre deve ser avaliado em relação ao benefício materno (Sobel, 1993).

Em pacientes gestantes a experiência clínica oral com cetoconazol, fluconazol e itraconazol são limitadas, sendo que sua administração deve ser feita quando não houver disponibilidade de terapêutica alternativa (Halbe, 2000)

Drogas antifúngicas

Os organismos do reino Fungi compartilham com a célula do hospedeiro humano o caráter eucariota, com conseqüentes similaridades bioquímicas e fisiológicas que limitam, em muito, o arsenal terapêutico fúngico disponível. Portanto, as drogas antifúngicas apresentam, em geral, toxicidade significativa e poucos são os compostos que exibem seletividade suficiente para uso nas micoses humanas. A maioria dos agentes antifúngicos, comercialmente disponíveis, tem como alvo os esteróis da membrana celular fúngica, que se assemelham aos da célula humana. A parede celular fúngica é a única organela que não é encontrada nas células dos mamíferos; consequentemente, antifúngicos ativos contra este componente celular, provavelmente apresentarão menor toxicidade e serão mais bem tolerados (Ferrari & Hamdan, 1998).

2.6.1. Polienos

O mecanismo de ação primário dos polienos, representados aqui pela anfotericina B (Figura 2), reporta à ligação aos esteróis de membrana, preferencialmente ao ergosterol, o

principal esteroide presente na membrana de células fúngicas. Esta interação resulta na formação de poros, alteração da permeabilidade da membrana, levando à perda de sódio, potássio e outros constituintes citoplasmáticos, geralmente causando a morte da célula fúngica (Ferrari & Hamdan, 1998). O mecanismo envolvido na interação polieno-esteroide ainda não se encontra totalmente elucidado e para explicá-lo vários modelos moleculares vêm sendo propostos (Langlet et al., 1994).

Foi demonstrado, experimentalmente, que os efeitos letais produzidos por altas concentrações desta droga sobre fungos, não são apenas consequência do aumento da permeabilidade da membrana, mas podem implicar também em danos oxidativos à célula (Sokol-Anderson et al., 1986). Os mecanismos exatos envolvidos nesse processo permanecem por elucidar, mas alguns autores têm sugerido que a anfotericina B induziria uma cascata de reações oxidativas na célula fúngica, provavelmente devido à sua auto-oxidação (Brajtburg et al., 1990; Warnock, 1991).

A formulação convencional da anfotericina B, para uso médico, associa a esta droga o desoxicolato de sódio, cuja finalidade é solubilizá-la em água e estabilizar a suspensão na forma de micélios. A dose diária única de 1 mg/kg de peso corporal resulta em concentrações séricas máximas aproximadas de 1 a 2 µg/mL na primeira hora após a infusão, e estima-se que a sua meia-vida inicial seja em 24 a 48 horas. A anfotericina B convencional alcança maiores concentrações no fígado, baço, rins e pulmões (Christiansen et al., 1985). A principal via de excreção é a renal, mas há também eliminação por via hepatobiliar, e presume-se que parte da droga seja metabolizada (Gallis et al., 1990).

A anfotericina B produz freqüentes efeitos adversos, relacionados à infusão e tardios, por toxicidade celular e tecidual. Aqueles relacionados à infusão manifestam-se como febre, calafrios, taquicardia, hipertensão arterial, náuseas e vômitos. Os efeitos adversos tardios mais comuns são nefrotoxicidade e a anemia, que requerem correção de doses, intervalos de administração e, eventualmente, obrigam a uma suspensão da terapia (Pathak et al., 1998).

O uso clínico da anfotericina B é limitado pelos efeitos adversos e necessidade de aplicação endovenosa. Portanto, o antibiótico é mais empregado em casos de infecções fúngicas invasivas, particularmente em imunossuprimidos. Constituem indicações primárias de terapia com anfotericina B casos de criptococose, aspergilose, infecções disseminadas por leveduras do gênero *Candida* resistentes a triazólicos e infecções por certos agentes de feohifomicose e de hialohifomicose (Martinez, 2006).

Tentativas para reduzir a nefrotoxicidade específica surgiram nos últimos anos. Adicionalmente, a necessidade de se instituírem tratamentos agressivos para as micoses sistêmicas invasivas, com dosagens, necessariamente, mais altas, motivou o desenvolvimento de diferentes veículos para a administração de anfotericina B. Dentre eles, o encapsulamento de base lipossômica, a formação de complexos lipídicos e dispersões coloidais destacam-se com os melhores resultados na diminuição da toxicidade e aumento da eficácia terapêutica (Filippin & Souza, 2006).

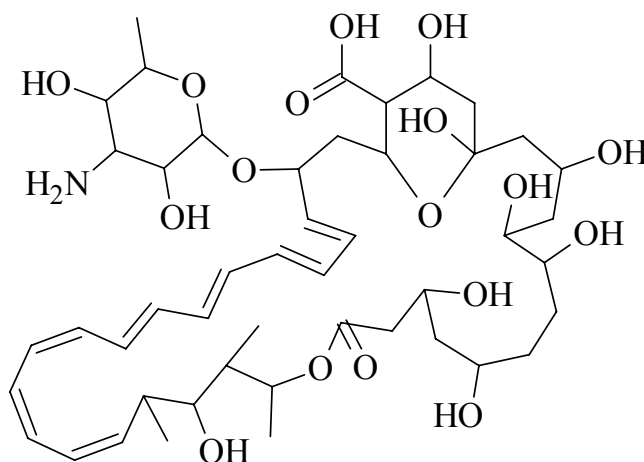


Figura 2 - Estrutura química da anfotericina B.

Fonte: Hamdan & Hahn, 2006.

Curr Med Chem - Anti-Infective Agents

2.6.2. Derivados azólicos

Os derivados azólicos são compostos sintéticos que vem emergindo como uma alternativa ao uso da anfotericina B, uma vez que apresentam uma menor toxicidade além de exibirem amplo espectro de ação e melhores propriedades farmacocinéticas (Saag & Dismukes, 1988; Lyman & Walsh, 1992).

A estrutura química dos azólicos compreende, basicamente, um ou mais anéis de cinco átomos de carbono (anel azólico), unido (s) ao restante da molécula por ligação do tipo C-N. Os imidazólicos (miconazol e cetoconazol) contêm dois átomos de nitrogênio no anel azólico, enquanto que, para os triazólicos (fluconazol e itraconazol), um terceiro átomo de nitrogênio foi introduzido neste anel (Gupta et al., 1994a). Considerando as drogas de uso sistêmico, encontram-se incluídos os imidazólicos: miconazol e cetoconazol e os triazólicos: fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol (Martinez, 2006). Embora haja diferenças na estrutura química das diversas drogas que compõem este grupo, é suposto que elas compartilhem um mecanismo de ação comum (Lyman & Walsh, 1992).

O mecanismo de ação primário de todos os derivados azólicos, incluindo tanto os imidazólicos quanto os triazólicos, envolve a inibição da biossíntese do ergosterol, que é o produto final da via metabólica de esteróis fúngicos. Isto ocorre através da inibição da enzima 14 α -demetilase, dependente do citocromo P-450, que participa da sequência de eventos envolvida na conversão de lanosterol e ergosterol. Esta inibição resulta no acúmulo de uma série de precursores metilados, incluindo o lanosterol, e diminuição ou mesmo ausência do produto final da via biossintética. Em seguida, a substituição do ergosterol pelos precursores metilados determinará a formação de membrana defectiva, com permeabilidade alterada (Lorens & Parks, 1990; Shimokawa & Nakayama, 1992; Espinel-Ingroff & Pfaller, 1995; Franzot & Hamdan, 1995; Kokjohn et al., 2003).

Este mecanismo de ação, fundamentado na inibição enzimática, é responsável pela atividade fungistática dos derivados azólicos (Pye & Marriot, 1982; Bossche & Marichal, 1992). Em nível molecular, foi descrito que um dos átomos de nitrogênio do anel azólico se ligaria ao grupo heme do citocromo P-450 fúngico, resultando na inibição da ativação deste citocromo e consequentemente, impedindo a função da enzima (Bossche & Marichal, 1992; Lyman & Walsh, 1992).

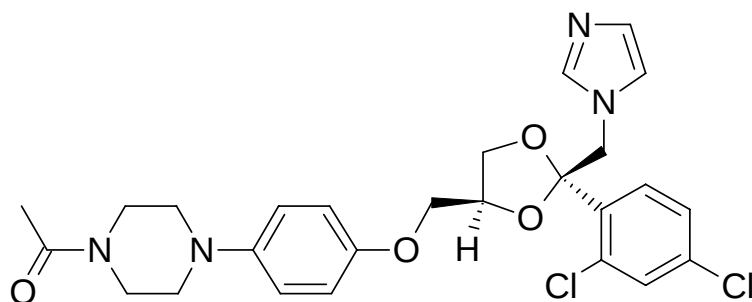
Outros efeitos antifúngicos dos derivados azólicos têm sido descritos, parecendo provir, essencialmente, das modificações estruturais da membrana plasmática, acarretadas pela inibição da biossíntese do ergosterol. Estes efeitos incluem: alteração da atividade de enzimas ligadas à membrana como a quitina-sintetase, interferência com o metabolismo respiratório, interferência na biossíntese de outros lipídios, inibição da formação de hifas e de tubo germinativo, entre outros (Watson et al., 1989; Barret-Bee et al., 1991; Bossche & Marichal, 1992; Lyman & Walsh, 1992; Van Den Anker et al., 1995; Ferrari & Hamdan, 1998; Sheehan et al., 1999).

Além disso, vem sendo aventado que os derivados azólicos poderiam exercer o efeito direto sobre os ácidos graxos da membrana alterando sua estrutura, desorganizando-a, ocasionando perda de aminoácidos e proteínas e interferindo na tomada de nutrientes pela célula. Os derivados azólicos poderiam ainda provocar a inibição de enzimas oxidativas e peroxidativas, com resultante aumento na formação de peróxido intracelular (Saag & Dismukes, 1988; Bossche & Marichal, 1992; Lyman & Walsh, 1992; Sheehan et al., 1999).

A toxicidade seletiva dos derivados azólicos é fato fundamentado pela evidência de que, embora alguns processos metabólicos da célula humana também dependam de reações

O cetoconazol (Figura 3) representou o primeiro derivado azólico com atividade antifúngica evidente e em disponibilidade para uso oral, com relatos de seu uso clínico remontando a 1979. Este antifúngico pode interferir em processos metabólicos da célula humana, tendo sido evidenciados também efeitos tóxicos em nível hepático e gastrointestinal (Gupta et al., 1994a; Ferrari & Hamdan, 1998).

A posologia varia de 200 a 600 mg diários, em dose única, e o tempo para obtenção da cura é variável com o tipo de infecção fúngica. Após a ingestão, atinge níveis plasmáticos elevados em uma a duas horas. A sua biodisponibilidade diminui quando tomado logo após as refeições e com antiácidos, cimetidina e ranitidina. É metabolizado na sua totalidade pelo fígado e eliminado *in natura* pelo rim, na percentagem de 2 a 4%. Quanto aos efeitos colaterais, raramente ocorre intolerância gástrica (náuseas, azia, vômitos, dores abdominais e diarreia). Tem sido relatado, também, prurido intenso, alopecia difusa, fotossensibilidade, mialgias, artralgias, insônia, nervosismo, anemia, leucopenia, eosinofilia e trombocitopenia. Em cerca de 5 a 10% dos casos ocorre elevação das transaminases e da amilase pancreática, que regredem quase sempre com a suspensão do tratamento. Alguns estudos demonstram que em cerca de 1 para 10.000 casos surge hepatite tóxica. É conveniente, portanto, acompanhar com dosagem de transaminases periódicas os pacientes submetidos a tratamentos prolongados com esse antifúngico (Lacaz et al., 2002b).



Curr Med Chem - Anti-Infective Agents

O fluconazol (Figura 4) possui características farmacocinéticas acentuadamente distintas daquelas de outros derivados azólicos atualmente em uso clínico, possuindo uma notável atividade antifúngica (Lyman & Walsh, 1992). Efeitos colaterais são raros e geralmente ocorrem em nível hepático e gastrointestinal (Gupta et al., 1994b; Ferrari & Hamdan, 1998).

A posologia varia de 100 – 1200 mg/dia. A dose habitual para candidíase invasiva é de 400mg/dia. Alguns autores recomendam doses mais elevada em caso de infecções por espécies não-albicans (Lumbreras et al., 2003).

O fluconazol é muito hidrossolúvel. Sua absorção oral é rápida e completa e não se modifica pela alimentação. Os níveis sanguíneos se alcançam entre a 2 a 4 horas e o estado de equilíbrio se consegue em quatro a cinco dias. Uma de suas características mais importantes é a elevada penetração nos líquidos biológicos de todo o organismo. É eliminado principalmente pela urina, sem metabolizar, embora grande parte seja reabsorvida nos túbulos renais. Os efeitos adversos mais comuns são distúrbios gastrointestinais, cefaléias e exantemas cutâneos (Lumbreras et al., 2003).

Este medicamento foi bem tolerado em experiências com voluntários humanos. Seu perfil, como antifúngico oral e intravenoso, sugere ter ele, potencial para representar importante avanço na terapêutica das infecções fúngicas, em especial nas candidíases e criptococose (Lacaz et al., 2002b).

O fluconazol é ativo contra leveduras incluindo leveduras do gênero *Cryptococcus*. A maioria de espécies de leveduras do gênero *Candida* é susceptível, embora algumas cepas de *C. glabrata* apresentem-se resistentes e *C. krusei* mostre-se intrinsecamente resistente (Mellado et al., 2002).

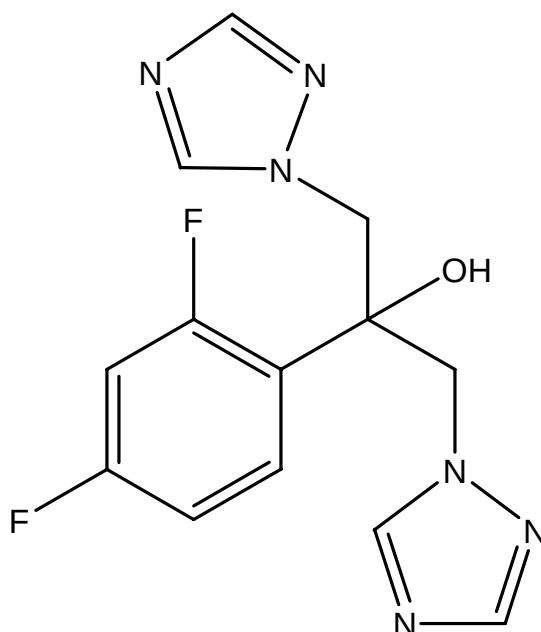


Figura 4 – Estrutura química do fluconazol

Fonte: Hamdan & Hahn, 2006.

Curr Med Chem - Anti-Infective Agents

O itraconazol (Figura 5) é um derivado triazólico insolúvel em água e altamente lipofílico (Negroni & Arechavala, 1993; Espinel-Ingroff & Pfaller, 1995). Em comparação com o cetoconazol, suas vantagens estão representadas pelo maior espectro de atividade antifúngica, melhor perfil farmacocinético e menor toxicidade (Lyman & Walsh, 1992).

A alta taxa de distribuição da droga, detectada em quase todos os tecidos, em níveis superiores às concentrações sanguíneas, explicaria a sua eficácia no tratamento de grande número de micoses humanas (Negroni & Arechavala, 1993; Espinel-Ingroff & Pfaller, 1995). Os efeitos colaterais deste composto, raramente detectados, geralmente envolvem o fígado e o trato gastrointestinal (Gupta et al., 1994b).

A posologia varia de 200 – 400 mg/dia estando disponível em forma de cápsulas e solução oral. A solução oral se apresenta com uma concentração de 10 mg/dL (Lumbreras et al., 2003).

Este medicamento é formalmente contra-indicado nos doentes sensíveis à medicação ativa ou a seus excipientes. Não há formação de reação de hipersensibilidade cruzada com outros imidazólicos. Foram relatados raros casos de hepatite tóxica reversível e formas mais graves, inclusive fatais, como do uso concomitante de múltiplas medicações. A função hepática e renal deve ser monitorada. O aumento das bilirrubinas e das transaminases pode ocorrer em 9% dos casos dos doentes tratados. Alterações no ritmo cardíaco foram relatadas quando da associação com anti-histamínicos, com terfenadina e astemizol (Lacaz et al., 2002b).

O itraconazol tem uma excelente atividade *in vitro* contra as leveduras, incluindo algumas espécies de *Candida* resistente ao fluconazol, embora também tenha fraca atividade contra a *C. krusei*. A maioria das cepas de *Cryptococcus neoformans* é sensível (Lumbreras et al., 2003).

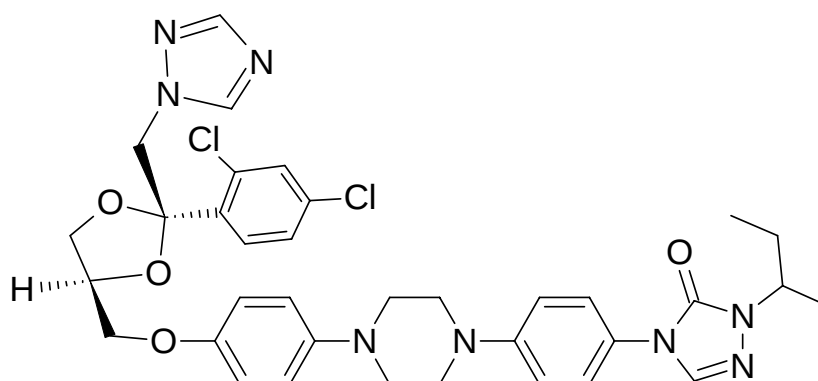


Figura 5 – Estrutura química do itraconazol

Fonte: Hamdan & Hahn, 2006.

Curr Med Chem - Anti-Infective Agents

2.7. Resistência a drogas antifúngicas

Infecções fúngicas causadas por patógenos leveduriformes comuns e emergentes têm se tornado cada vez mais frequentes, particularmente como resultado do aumento do número de pacientes imunocomprometidos. A introdução dos azólicos promoveu maiores opções terapêuticas, incluindo o uso prolongado de altas dosagens, o que ocasionou a emergência de resistência à terapia antifúngica (Espinell-Ingroff et al., 1998).

Ao se conceituar susceptibilidade e resistência deve-se considerar dois pontos de vista, o microbiológico e o clínico. Do ponto de vista microbiológico, uma amostra é resistente a um antifúngico quando sua concentração inibitória mínima (CIM) é elevada em relação à CIM habitual para a espécie. Clinicamente, deve-se considerar que amostras resistentes microbiologicamente podem responder perfeitamente ao tratamento, pois a concentração da droga no local da infecção pode ser maior que a CIM do microorganismo. Um fungo é resistente clinicamente quando continua crescendo e produzindo sintomatologia apesar da concentração do fármaco ser máxima no local da infecção (Rodriguez-Tudella et al., 2003).

Há vários mecanismos pelos quais a célula fúngica torna-se resistente aos azólicos: alterações da entrada da droga na célula fúngica, alterações no processamento intracelular, modificações na degradação do fármaco, alterações das enzimas que participam do mecanismo de ação das drogas, mutações, alterações de enzimas que participam do processo de biossíntese do ergosterol e alterações nas bombas de efluxo (Rodriguez-Tudella et al., 2003). Sanglard et al. (1997) identificaram genes envolvidos no sistema de efluxo em *C. albicans* e demonstraram que eles podem conferir resistência ao fluconazol, outros azólicos e uma variedade de outros compostos.

2.8. Testes de susceptibilidade às drogas antifúngicas

Ao contrário dos testes de susceptibilidade a antibacterianos, os testes de susceptibilidade a antifúngicos não são comumente realizados na maioria dos laboratórios clínicos. Há uma década, testes de susceptibilidade a antifúngicos eram ocasionalmente executados e não havia cuidados no seu desenvolvimento e na padronização. Este fato é inaceitável e atribuído a testes intra e interlaboratoriais apresentando resultados com baixas reprodutibilidade e concordância (Perea & Patterson, 1999).

Os primeiros testes visando à padronização foram desenvolvidos por Espinel-Ingroff et al. (1992) tornando possível a comparação de resultados e abrindo caminho para o desenvolvimento de outros testes.

O surgimento de espécies patogênicas com resistência intrínseca aos antifúngicos, principalmente pelo uso de terapia antifúngica profilática, tem aumentado a necessidade de desenvolvimento e padronização de testes de susceptibilidade aos antifúngicos (Cuenca-Estrella et al., 2002).

Um fator preponderante deve sempre ser levado em consideração: a associação dos testes *in vitro* à resposta *in vivo*, que dependerá essencialmente do estado do indivíduo, incluindo doença pré-existente e resposta imune celular (Conti et al., 1999).

Nos últimos anos foram desenvolvidas técnicas para o estudo da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos, sendo o método de microdiluição em caldo considerado a técnica de referência. O National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) aprovou um primeiro padrão para estudar a sensibilidade dos antifúngicos frente a leveduras em 1999 (documento M27-A) (NCCLS, 1997), modificado posteriormente e aprovado no ano 2002 o padrão (documento M27-A2) (NCCLS, 2002). Em 2005 passou a ser denominado Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (CLSI, 2005).

Métodos alternativos foram surgindo conforme a necessidade de técnicas que podem ser usadas para o diagnóstico diário em laboratório clínico (Vandenbossche et al., 2002), as técnicas de difusão em ágar são amplamente difundidas, sendo o Etest o mais utilizado em nosso meio (AB Biodisk, 1994).

2.9. Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI

A partir de 1982, o NCCLS, que em 2005, foi denominado CLSI, preocupado com a determinação precisa da metodologia dos testes e do ponto de resistência aos antifúngicos, criou uma subcomissão para elaborar normas e métodos para testes de susceptibilidade a antifúngicos, semelhantes àqueles usados com agentes antibacterianos. Isso se fez necessário, devido à inexistência de uma concordância dos valores de CIM de diferentes antifúngicos estabelecidos por diversos laboratórios, dificultando a orientação sobre a terapêutica a ser empregada no tratamento (Murray, 1991).

Em 1998, Espinel-Ingroff et al., fizeram uma análise do protocolo M27-A, do então NCCLS. Este protocolo trata da metodologia padronizada e aprovada para testes de

susceptibilidade aos antifúngicos para espécies de leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. Os autores citados recomendam meios de culturas, técnicas e critérios alternativos para a determinação das CIM para leveduras, ao mesmo tempo, propuseram procedimentos técnicos para fungos filamentosos gerando dados para o protocolo M38-P, que foram, então, utilizados para estes fungos.

Em 2002, o documento M-27A sofreu algumas modificações (M-27A2) para melhor adaptar a metodologia da microdiluição, que é mais atrativa para testes de susceptibilidade antifúngica que a macrodiluição (pela execução mais fácil e por motivos econômicos) passando a incluir a leitura de 24 horas para *Candida* spp devido ao crescimento “trailing” (crescimento residual). Em função desse problema, um isolado que se determina como susceptível em 24 horas pode apresentar-se completamente resistente em 48 horas de incubação (NCCLS, 2002).

O método de macrodiluição proposto pelo CLSI (2005), utiliza o meio de cultura sintético RPMI-1640 com tampão MOPS, um inóculo de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, 48 horas de incubação a 35° C para leveduras do gênero *Candida* e 72 horas para *Cryptococcus neoformans*, e um esquema para preparação de diluições em duplicata. Para os azólicos, o critério recomendado para a determinação da CIM é de 80% de inibição no crescimento, comparado com o controle de crescimento. Já o teste de microdiluição é idêntico ao método de macrodiluição, exceto pelo volume. As suspensões do inóculo estão diluídas em 1:1000 para se obter duas vezes as concentrações teste. O experimento é realizado em duplicata. Controvérsias existem sobre o tempo de incubação (24 ou 48 horas). Um tempo de incubação menor seria instrumento eficiente em laboratórios clínicos.

2.10. Metodologia comercial (Etest)

O Etest é um método utilizado para determinar quantitativamente a susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos, baseado em gradientes de concentração dos antifúngicos empregados em fita plástica, através da técnica de difusão em ágar. Este método nos permite determinar uma cepa como sensível ou resistente, pois também determina a concentração inibitória mínima (CIM) (Sanchez & Jones, 1992; Colombo et al., 1995).

Esta técnica tem sido usada por muitos autores, pois é de fácil e rápida execução e interpretação dos resultados, características estas que fazem da técnica a mais difundida para estudo da sensibilidade aos antifúngicos (AB Biodisk, 1994).

2.11. Correlação entre os resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro* e os efeitos terapêuticos *in vivo*

São realizados testes de susceptibilidade para detecção de resistência dos microorganismos aos antifúngicos, auxiliando na eleição da melhor alternativa de tratamento e reduzindo a possibilidade de falha terapêutica. Em micologia, a ocorrência de espécies patogênicas com resistência intrínseca e secundária tem determinado a grande importância desses testes. Entretanto, estabelecer a relevância clínica dos resultados *in vitro* – *in vivo*, tem sido uma tarefa complexa, uma vez que os testes de susceptibilidade são realizados em condições padronizadas utilizando uma fase constante de crescimento do microorganismo, condições fixas de pH, temperatura, umidade e concentração de oxigênio. No tratamento de uma infecção não há nada padronizado; numerosos fatores relacionados ao microorganismo, ao hospedeiro e ao fármaco influenciam na correlação *in vitro* – *in vivo* (Rex et al., 1997; Costa et al., 2001; Cuenca-Estrela & Rodriguez-Tudella, 2002).

Os testes de susceptibilidade às drogas antifúngicas, podem ter maior utilidade na determinação de casos onde os isolados se originam de pacientes que apresentam falha terapêutica ou que tenham recebido medicação antifúngica profilática ou então, quando consideradas amostras de espécies pouco frequentes, das quais se desconhece totalmente o perfil de susceptibilidade. Nestes casos, os estudos de susceptibilidade *in vitro* podem ajudar a eleger a melhor alternativa farmacológica e oferecer informações para aumentar a dose ou empregar combinação de drogas. Apresentam também, importante papel em epidemiologia, pois podem ser conhecidos os perfis de susceptibilidade de diferentes espécies, a taxa de ocorrência destes perfis e estabelecidos quais os tratamentos provavelmente mais adequados (Rex et al., 1997; Cuenca-Estrela & Rodriguez-Tudella, 2002).

2.12. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM não é uma medida química ou física. Fatores como a farmacocinética das drogas, resposta imunológica do paciente, estágio de evolução da doença infecciosa, regime de administração medicamentosa realizada pelo paciente, sítio acometido pela infecção e gravidade da mesma, virulência do patógeno e interações hospedeiro/microorganismo e/ou droga/droga têm sido sugeridos como aspectos mais significativos na determinação dos resultados clínicos, do que os valores obtidos *in vitro*. Um valor baixo da CIM nem sempre

resulta em sucesso terapêutico. Porém, a obtenção de valores altos, sugerindo resistência fúngica, freqüentemente corresponde à falha terapêutica medicamentosa (Espinel-Ingroff et al., 1998).

A interpretação dos testes de susceptibilidade aos antifúngicos foi avaliada pelo CLSI, para os valores de CIM capazes de determinar susceptibilidade e/ou resistência às drogas normalmente empregadas.

Assim, para o fluconazol $\text{CIM} \leq 8,0 \mu\text{g/mL}$ respondem às doses padrões (100 – 200 mg/dia). Resposta à terapia com doses mais altas (400 – 800 mg/dia tem sido requerida em situações onde os valores de CIM foram 16 a 32 $\mu\text{g/mL}$. Para isolados com valores de $\text{CIM} \geq 64 \mu\text{g/mL}$, uma droga alternativa deve ser utilizada no tratamento do processo infeccioso. O CLSI estabeleceu valores de CIM para agrupar amostras como susceptíveis refletindo aquelas nas quais os valores de CIM foram $\leq 8,0 \mu\text{g/mL}$; amostras susceptíveis, mas dependentes da concentração da droga, aquelas que apresentaram valores de CIM de 16 a 32 $\mu\text{g/mL}$ e amostras resistentes aquelas cujos valores de CIM foram $\geq 64 \mu\text{g/mL}$.

Para o itraconazol, isolados cujos valores de CIM foram $\leq 0,125 \mu\text{g/mL}$ são considerados susceptíveis à droga. Valores de CIM compreendidos entre 0,25 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ são susceptíveis, mas dependem da concentração da droga utilizada. Isolados cujas CIM são $\geq 1,0 \mu\text{g/mL}$ estão associados à grande probabilidade de falha na terapêutica por desenvolvimento de resistência (CLSI, 2005).

Em relação ao cetoconazol o CLSI (2005), apenas registra que os valores das concentrações da droga geralmente são encontrados entre 0,03 – 16 $\mu\text{g/mL}$. Este fato é justificado, pois até o presente momento não há uma boa correlação entre os valores de CIMs encontrados *in vitro* e a terapêutica *in vivo*.

De acordo com CLSI (2005), as CIMs da anfotericina B, para isolados de leveduras do gênero *Candida*, apresentam-se agrupados em pequeno intervalo entre 0,25 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e quando se obtém um valor de CIM de anfotericina B $> 1,0 \mu\text{g/mL}$ para um isolado de *Candida* spp, é provável que o isolado seja resistente à anfotericina B.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar a prevalência e o perfil de susceptibilidade *in vitro* a quatro drogas antifúngicas de espécies de leveduras do gênero *Candida*, isoladas em pacientes atendidas no ambulatório de ginecologia/obstetrícia do Hospital Geral Universitário de Cuiabá/MT.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Obter colônias isoladas de leveduras do gênero *Candida* a partir de pacientes gestantes ou não atendidas no ambulatório de ginecologia/obstetrícia do Hospital Geral Universitário de Cuiabá/MT.

3.2.2. Avaliar, através da técnica de CHROMagar, a pureza das colônias isoladas e confirmar a identificação das espécies a partir de secreções vaginais obtidas.

3.2.3. Determinar a prevalência de candidíase vulvovaginal e das espécies de leveduras do gênero *Candida* na população avaliada.

3.2.4. Realizar a identificação específica das leveduras através de técnicas laboratoriais padronizadas (tubo germinativo, microcultivo, zimograma e auxanograma).

3.2.5. Determinar o perfil de susceptibilidade *in vitro* das espécies isoladas a quatro antifúngicos através de metodologia de referência CLSI microdiluição.

3.2.6. Determinar o perfil de susceptibilidade *in vitro* das espécies isoladas a quatro antifúngicos utilizando kit comercialmente disponível (Etest).

3.2.7. Comparar os valores de CIM, obtidos através de duas metodologias distintas (CLSI e Etest), para avaliar a sensibilidade do método disponível comercialmente (Etest) em relação ao de referência (CLSI), visando a sua possível utilização em laboratório clínico.

4. METODOLOGIA

4.1. Seleção de pacientes

Para a realização de estudo descritivo de prevalência, foram incluídas, pacientes (gestantes ou não) atendidas no ambulatório de ginecologia/obstetrícia do Hospital Geral Universitário de Cuiabá/MT, no período compreendido entre novembro de 2005 a novembro 2006. As pacientes avaliadas neste estudo apresentaram algum sinal ou sintoma de leucorréia. Destas, foram coletadas secreções vaginais com auxílio de swabs estéreis, objetivando a realização de culturas para fungos.

Profissionais médicos e/ou residentes realizaram entrevistas com as pacientes incluídas, seguindo questionário específico (Anexo 1) previamente elaborado, visando à elucidação de fatores predisponentes, possivelmente, associados à vulvovaginite micótica e elucidação do agente etiológico.

Todas as coletas só foram realizadas após assinatura do termo de consentimento pelas pacientes, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do HGU/UNIC em 26 de agosto de 2005 (Anexo 2).

As pacientes atendidas foram divididas em dois grupos quanto à sintomatologia apresentada: assintomáticas, presença de apenas um sintoma (corrimento característico) e sintomática, pacientes que apresentaram dois ou mais sintomas (corrimento característico, prurido vulvovaginal, ardência vulvovaginal, disúria e dispareunia).

A classificação adotada em nosso estudo segue parcialmente aquela proposta por Lopes Consolaro et al. (2004). Estes autores classificam as mulheres em assintomáticas quando há ausência ou presença de apenas um sintoma. Quanto às pacientes sintomáticas, há concordância que as mesmas devam apresentar dois ou mais sintomas.

4.2. Cultivo das amostras

Todas as amostras clínicas foram cultivadas em dois tubos de vidro contendo ágar Sabouraud-dextrose (DIFCO) (Figura 6), acrescido de cloranfenicol à concentração de 100 mg/L de meio. O pH foi ajustado entre 5,6 e 6,0 (Koneman et al., 1989).

O meio de cultura ágar Sabouraud-dextrose foi obtido comercialmente (DIFCO) e seu preparo procedeu de acordo com orientações do fabricante.

As amostras clínicas também foram diretamente semeadas em um tubo de vidro com ágar Mycosel, contendo cicloheximida em sua composição (DIFCO) (Figura 6), com pH

ajustado entre 6,7 e 7,1. Este foi utilizado objetivando o isolamento e triagem na identificação das espécies, já que a cicloheximida pode inibir o crescimento de algumas espécies de leveduras do gênero *Candida*.

O meio de cultura ágar Mycosel foi obtido comercialmente (DIFCO) e seu preparo procedeu de acordo com orientações do fabricante.

Os meios cultivados foram incubados a 25° C por até sete dias. As culturas que não apresentaram qualquer crescimento em relação a colônias fúngicas foram consideradas negativas.

No momento das coletas um swab com material clínico, foi introduzido em um tubo de salina estéril (Figura 6), para realização do exame à fresco, cujo objetivo era observar a presença ou ausência de células ovaladas/arredondadas e pseudo-hifas com características morfológicas sugestivas de leveduras do gênero *Candida*.

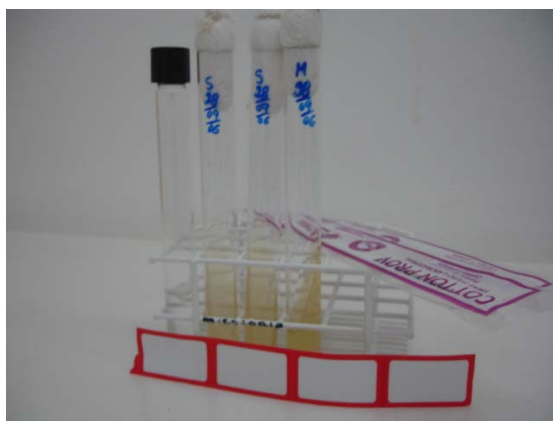


Figura 6 – Kit utilizado para coleta e semeadura de material clínico

Fonte: Imagem obtida pela autora
Lab. Micologia - HGU

4.3. Identificação das amostras

Após detecção das colônias isoladas, em células leveduriformes, foi realizado um esfregaço delgado e posteriormente corado utilizando-se a técnica de coloração de Gram para visualização de características morfotintoriais. A partir dos resultados pós-coloração de Gram, as leveduras foram submetidas à identificação.

A identificação foi realizada a partir de culturas puras, repicadas em tubo de vidro contendo ágar Sabouraud, 24 horas antes de seu uso. Este procedimento visa à obtenção de

células leveduriformes em fase exponencial de crescimento. Para a identificação de leveduras do gênero *Candida*, vários taxonomistas vêm propondo, além de estudos micromorfológicos, o uso de uma série de provas bioquímicas (Odds, 1988a).

4.3.1. Avaliação quanto à pureza

Após isolamento, as colônias foram testadas quanto sua pureza através de plaqueamento em meio cromogênico CHROMagar *Candida* (BBL). Este procedimento foi útil para isolar e identificar presuntivamente: colônias de coloração verde claro – sugestivas de *C. albicans*, colônias de cor azul – sugestivas de *C. tropicalis*, colônias apresentando coloração rosa em diferentes tonalidades e aspectos – sugestivas de outras espécies de leveduras do gênero *Candida* (Figura 7). O fundamento deste método preconiza a utilização do substrato β glicosaminidase (Cooke et al., 2002, Quindós et al., 2001) e a diferenciação das leveduras de acordo com a morfologia e a cor das colônias (Carrillo Munõz et al., 2001, Fotedar & Al-Hedaithy, 2002).

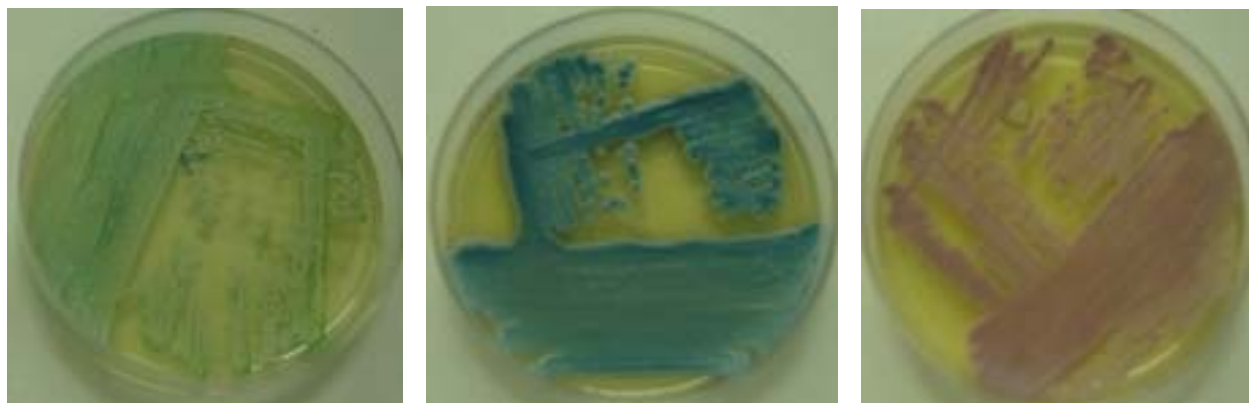


Figura 7 – Plaqueamento de colônias em meio CHROMagar

Fonte: Imagem obtida pela autora

Amostras nº: 32, 78, 08 respectivamente.

4.3.2. Pesquisa de tubo germinativo

Em relação às características micromorfológicas, foi verificado, em primeiro momento, a habilidade de formação de tubo germinativo ou efeito Reynolds-Braude. Para visualização desta característica, uma pequena quantidade da colônia foi transferida para um

tubo, previamente esterilizado, contendo 0,5 mL de soro humano e incubada a 37° C em banho maria por três horas. Após este período, uma gota desta suspensão foi examinada ao microscópio entre lâmina e lamínula. A evidenciação de tubo germinativo configura teste positivo e, presuntivamente, diagnóstico de *C. albicans* (Figura 8) (Koneman et al., 2001b).



Figura 8 – Presença de tubo germinativo – *Candida albicans*

Fonte: Imagem obtida pela autora, Lab. Mic. – HGU
Amostra nº: 32

4.3.3. Microcultivo

O microcultivo ou técnica de Ridell (Lacaz et al., 1991) foi realizado com o objetivo de visualizar as estruturas morfológicas típicas de cada espécie do gênero. Ágar fubá, acrescido de Tween 80, com pH ajustado entre 5,8 e 6,2, foi distribuído, com auxílio de pipeta estéril, em camada fina sobre lâminas previamente preparadas em câmara de microcultivo. Após solidificação do meio, cada amostra foi semeada em três linhas finas, horizontais e paralelas na superfície do ágar e coberta com lamínula. Após a adição de água destilada estéril ao algodão presente na placa, para obtenção de câmara úmida, o sistema fechado foi incubado a 25° C, por até três dias. A leitura foi executada anotando-se a presença de pseudomicélio, arranjo dos blastosporos (ocorrendo em grupos ou cachos, no início da hifa e/ou ao longo desta, isolados ou aos pares nos pontos de constrição ou irregularmente distribuídos no pseudomicélio). A presença de clamidósporos foi anotada como diagnóstico presuntivo de *C. albicans* (Figura 9). As outras espécies do gênero foram avaliadas conforme características morfológicas específicas (Tabela 1) (Figura 10 a 13).

O meio de cultura ágar fubá foi obtido comercialmente – agar Corn Meal (DIFCO) e seu preparo obedeceu às orientações do fabricante.

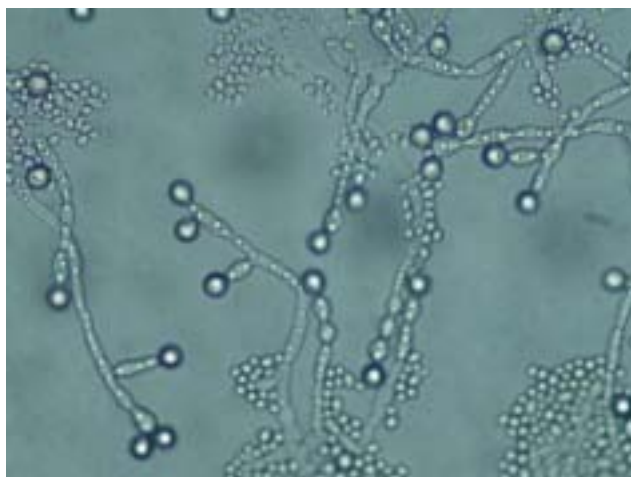


Figura 9 – Aspecto micromorfológico de *Candida albicans*.

Fonte: Imagem obtida pela autora, Lab. Mic. – HGU
Amostra nº: 32



Figura 10 – Aspecto micromorfológico de *Candida parapsilosis*

Fonte: Imagem obtida pela autora, Lab. Mic. – HGU
Amostra nº: 08

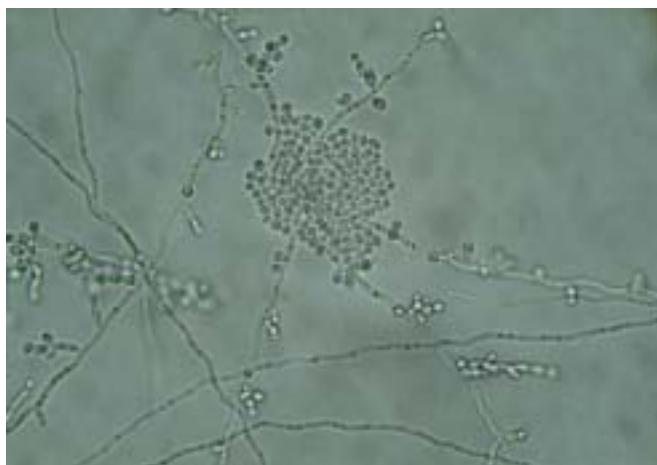


Figura 11 – Aspecto micromorfológico de *Candida tropicalis*

Fonte: Imagem obtida pela autora, Lab. Mic. – HGU
Amostra nº: 78

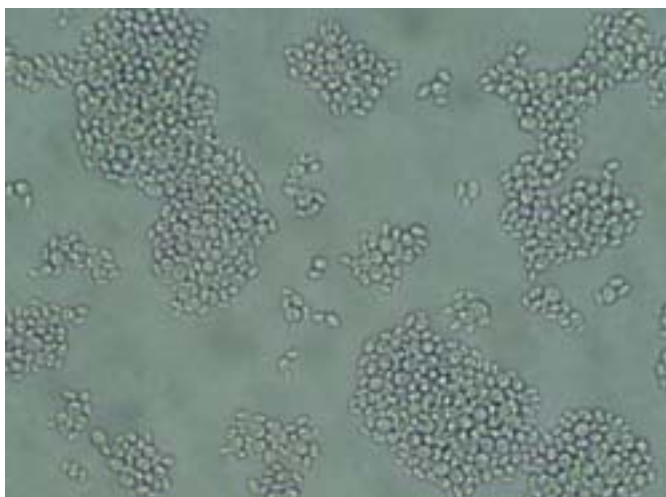


Figura 12 – Aspecto micromorfológico de *Candida glabrata*

Fonte: Imagem obtida pela autora, Lab. Mic. – HGU
Amostra n°: 74

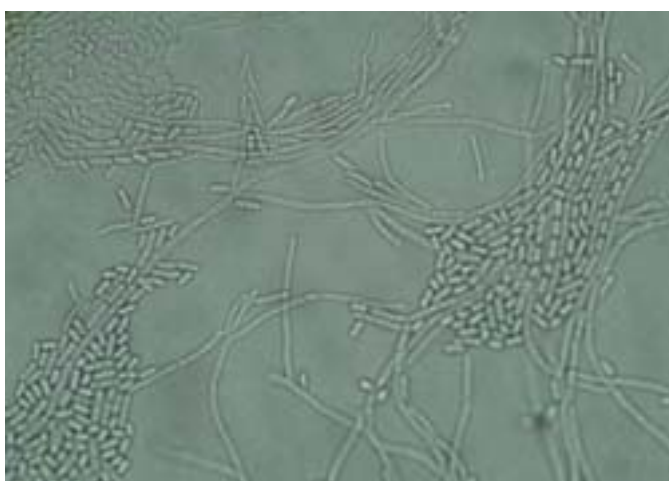


Figura 13 – Aspecto micromorfológico de *Candida krusei*

Fonte: Imagem obtida pela autora, Lab. Mic. – HGU
Amostra n°: 41

Tabela 1 – Morfologia das espécies de leveduras do gênero *Candida*.

Levedura	Forma de conídios	Pseudo-hifas	Micromorfologia	Tubo germinativo	Colônias	Taxa de crescimento	Outras características úteis
<i>C. krusei</i>	Esferas, elipses e blastoconídios alongados, ovais, vários tamanhos	Sim	Células longas, finas, retas, com ramificações arboriforme e cadeias de blastoconídios das junções intercelulares; como palitos de fósforos cruzados.	Ausente	Semelhante à <i>C. albicans</i> , porém mais fosca	2 - 3 dias	Colônias muito velhas tornam-se amarelo-esverdeadas foscas, com franja periférica.
<i>C. parapsilosis</i>	Blastoconídios esféricos e elípticos	Sim	Células fina, curtas, curvas pronunciadas; ocasionalmente células gigantes, blastoconídios isolados, em cachos e cadeias curtas nas pseudo-hifas.	Ausente	Compacta, úmida, branca, brilhante ou creme , pode ser rendada	2 – 3 dias	Colônias velhas tornam-se sulcadas com bordas marrons
<i>C. tropicalis</i>	Blastoconídios ovóides ou alongados	Sim	Pseudo-hifas longas, ramificadas, com blastoconídios em qualquer lugar na pseudo-hifa. Clamidoconídios ocasionais.	Ausente	Branca a creme	2 – 3 dias	A franja periférica pode estar submersa no ágar.
<i>C. glabrata</i>	Blastoconídios pequenos	Não	Não apresenta pseudo-hifas apenas pequenos blastoconídios agrupados.	Ausente	Cremosa, creme, lisa e brilhante	3 – 4 dias	Colônias antigas formam película.

4.3.4. Provas bioquímicas

4.3.4.1. Zimograma

No teste de fermentação de carboidratos foi utilizado o meio basal (conforme fórmula abaixo), acrescido de azul de bromotimol e distribuídos em alíquotas de 2 mL em tubos de Kahn contendo tubos de Durham invertidos, para visualização de gás. As amostras foram testadas quanto à habilidade de fermentar glicose, galactose, maltose, sacarose, lactose, trealose, xilose, melibiose e rafinose. Para tanto, foi adicionado 1 mL da solução de cada carboidrato (preparadas à concentração de 6%) a cada tubo de meio de cultura autoclavados.

Meio Basal (Van Der Walt & Yarrow, 1984)

- Peptona	7,5 g
- Extrato de levedura	4,5 g
- Azul de bromotimol	0,4 g
- Água destilada	1000,00 mL

O pH foi acertado para 6,5. Logo após, o azul de bromotimol foi dissolvido em etanol e adicionado, aos poucos, a este meio até obtenção de coloração verde intensa.

Para a preparação do inóculo, uma pequena porção da levedura foi ressuspensa em 5 mL de salina estéril. A concentração celular foi avaliada através do cartão de Wickerham – trata-se de uma técnica que permite uma estimativa da densidade de células de uma suspensão, tendo sido estabelecidos quatro níveis de concentração celular com avaliação feita comparativamente, observando-se o crescimento baseado no seguinte critério: 0 (poucas células – linhas totalmente visíveis), 1 (densidade fraca – linhas visíveis, um pouco embaçadas), 2 (densidade média – linhas embaçadas e difusas), 3 (densidade forte – linhas não visíveis).

Foram transferidos 0,1 mL da suspensão obedecendo ao critério 2 para cada um dos nove tubos de meio basal, contendo os diferentes açúcares. A bateria de testes foi incubada a 25° C e as leituras foram realizadas periodicamente observando-se a produção de ácido através da mudança de coloração do meio basal para amarelo e a formação de gás capturado no interior do tubo de Durham. As observações foram feitas por um período máximo de sete dias (Lacaz et al., 1991). Os resultados foram considerados positivos em função da produção de gás (Figura 14).

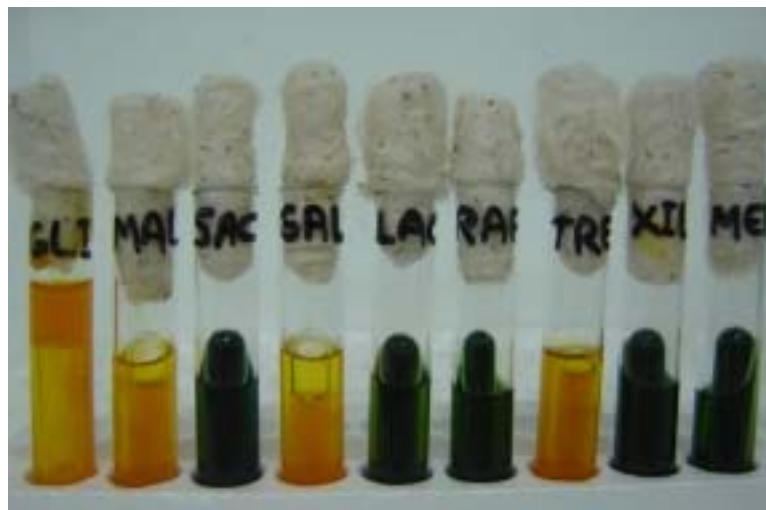


Figura 14 – Teste de fermentação de carboidratos, evidenciando fermentação e formação de gás em glicose, maltose, galactose e trealose.

Fonte: Imagem obtida pela autora, Lab. Mic. – HGU
Amostra nº: 32 – *C. albicans*

4.3.4.2. Auxanograma

Este teste foi realizado visando observar o padrão de assimilação de nove carboidratos (glicose, galactose, maltose, sacarose, lactose, trealose, xilose, melibiose e rafinose) como única fonte de carbono. Para isto, foram preparados: meio C e uma solução de vitaminas, conforme descrito a seguir.

Meio C (Lacaz et al., 1991)

- Sulfato de amônio 5,0 g
- Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4) 1,0 g
- Sulfato de Magnésio Hepta Hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,5 g
- Ágar 20 g
- Água destilada 1000,00 mL

Solução de Vitaminas

- Biotina 0,10 mg
- Niacina 6,00 mg

- Piridoxina	10,00 mg
- Riboflavina	1,00 mg
- Tiamina	6,00 mg
- Pantotenato de cálcio	6,00 mg
- Inositol	1,00 mg
- Ácido fólico	10,00 mg
- Cloreto de colina	10,00 mg
- Água destilada	100,00 mL

Placas de Petri esterilizadas, de 140 mm de diâmetro, foram marcadas no fundo, em nove pontos equidistantes, com as siglas correspondentes aos carboidratos utilizados. Em cada placa foram dispensados 0,1 mL de solução de vitaminas, 4 mL da suspensão de leveduras preparada em salina esterilizada, correspondendo ao critério 2 do cartão de Wickerham e aproximadamente 45 mL de meio C fundido e resfriado (aproximadamente 45° C) (Van Der Walt & Yarrow, 1984).

Este inóculo correspondeu a uma concentração celular de $1 - 6 \times 10^6$ UFC/mL, de acordo com experimentos preliminares. A mistura obtida na placa foi cuidadosamente homogeneizada, evitando-se a formação de bolhas e deixada solidificar à temperatura ambiente. Após solidificação, os carboidratos foram distribuídos em quantidades mínimas nos pontos previamente marcados (Campbell & Stewart, 1980), com auxílio de palitos esterilizados. A incubação foi feita à temperatura de 25°C, por até 72 horas e a leitura foi realizada diariamente. O resultado foi considerado positivo, quando da evidenciação do halo de crescimento em torno de cada carboidrato (Figura 15).



Figura 15 – Teste de assimilação de carboidratos.

Fonte: Imagem obtida pela autora, Lab. Mic. – HGU
Amostra nº: 32 – *C. albicans*

4.4. Testes de sensibilidade aos antifúngicos: cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B.

4.4.1. Cepas de referência

As amostras de referência utilizadas neste estudo corresponderam à (*C. parapsilosis* – ATCC 22019 e *C. krusei* – ATCC 6258) e foram gentilmente cedidas pela Dra. Márcia S. C. Melhem - Instituto Adolfo Lutz - SP.

4.4.2. Microdiluição em caldo - CLSI (2005)

As drogas antifúngicas utilizadas em forma de pó foram: cetoconazol (Sigma, St. Louis, USA), itraconazol (Janssen – Cilag do Brasil), fluconazol (Pfizer do Brasil) e anfotericina B (Sigma, St. Louis, USA). As drogas cetoconazol, itraconazol e fluconazol foram gentilmente cedidas pelos laboratórios fabricantes.

A solução-mãe de cada antifúngico foi preparada conforme recomendação do M27 A2 (CLSI, 2005), utilizando a seguinte equação:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência da substância } (\mu\text{g/mg)}}$$

A solução-mãe de fluconazol (FCZ) na concentração de 5120 $\mu\text{g/mL}$, com potência de 100%, foi preparada em água destilada e as soluções-mãe de cetoconazol (CTZ), com potência de 100%, itraconazol (ITZ) com potência de 100% e anfotericina B (AMB), com potência de 80%, ambos com concentração de 1600 $\mu\text{g/mL}$, foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções-mãe dos quatro antifúngicos foram divididas em pequenas quantidades e colocadas em tubos estéreis para armazenamento em freezer à temperatura de -70°C .

No teste de susceptibilidade, cada antifúngico foi avaliado em 10 concentrações diferentes, preparadas conforme documento M 27 A2 (CLSI, 2005) (Anexos 3 e 4). Para cetoconazol, itraconazol e anfotericina B, as concentrações foram iguais a 8 $\mu\text{g/mL}$ à 0,015 $\mu\text{g/mL}$ e para fluconazol compreendidos entre 64 $\mu\text{g/mL}$ à 0,12 $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2005).

As provas foram realizadas em placas de microtitulação com tampa (Evergreen Scientific, USA), contendo 96 orifícios e fundo plano. Cada antifúngico foi distribuído em uma placa de microtitulação em alíquotas de 100 µL, desde a coluna 2 até a coluna 11, correspondendo cada coluna, à uma concentração diferente. A coluna 2 correspondeu à maior concentração do antifúngico e a coluna 11 à menor concentração. Todos os orifícios das linhas de A a H foram preenchidos com antifúngicos, exceto os orifícios da coluna 1 e 12, reservados para controle de esterilidade e controle de crescimento respectivamente.

As placas com diferentes concentrações de antifúngicos foram cobertas com película plástica (Parafilm) e congeladas à temperatura de - 70° C. Para realização dos testes, as placas foram descongeladas a temperatura ambiente, 30 à 40 min antes da utilização.

O meio de cultura utilizado no teste de antifungigrama foi o RPMI-1640 (Sigma Chemical, St. Louis, USA) com 0,165 mol/L de MOPS e pH 7,0.

Meio RPMI – 1640 (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato) (CLSI, 2005).

L-arginina	0,200 g/L	Glicina	0,010 g/L
Biotina	0,0002 g/L	PABA	0,001 g/L
L-aspargina	0,050 g/L	L-histidina	0,015 g/L
D-pantotênico	0,0002 g/L	Piridoxina	0,001 g/L
L-ácido aspártico	0,020 g/L	L-hidroxi prolina	0,020 g/L
Cloreto de colina	0,003 g/L	Riboflavina	0,0002 g/L
L-ácido glutâmico	0,020 g/L	L-isoleucina	0,050 g/L
Ácido fólico	0,001 g/L	Tiamina	0,001 g/L
L-cistina	0,0652 g/L	L-leucina	0,050 g/L
Mioinositol	0,035 g/L	Vitamina B12	0,000005 g/L
L-glutamina	0,300 g/L	L-lisina	0,040 g/L
Niacinamida	0,001 g/L	Nitrato de cálcio	0,100 g/L
L-metionina	0,015 g/L	L-treonina	0,020 g/L
Cloreto de potássio	0,400 g/L	D-glicose	2,000 g/L
L-fenilalanina	0,015 g/L	L-triptofano	0,005 g/L
Fosfato de sódio	0,800 g/L	Glutation	0,001 g/L
Sulfato de magnésio	0,0488 g/L	L-tirosina	0,029 g/L
L-prolina	0,020 g/L	Vermelho de fenol	0,005 g/L
Cloreto de sódio	6,000 g/L	L-valina	0,020 g/L
L-serina	0,030 g/L		

Este meio é sintético e recomendado através de resultados obtidos por estudos comparativos dentre vários meios sintéticos (Fromtling et al., 1993).

O controle de esterilidade do meio RPMI-1640 foi feito na primeira coluna em todas as placas. Os orifícios da coluna 1 receberam apenas 200 µL de RPMI-1640 que serviram para comprovar a ausência de contaminação do meio. O controle de crescimento da reação foi feito em todas as placas na coluna 12 com 100 µL de RPMI-1640 e 100 µL do inóculo da levedura, considerando adequado quando a absorbância foi maior que 0,4 (Galgiani & Stevens, 1976).

Para preparação do inóculo as amostras de leveduras do gênero *Candida* foram cultivadas em tubos contendo meio Sabouraud sólido sem cloranfenicol e incubadas a 35° C durante 24 horas. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente com alça esterilizada e ressuspensa em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85% estéril, com turbidez após a homogeneização em vórtex, equivalente a escala 0,5 de McFarland, com concentração equivalente a 1×10^6 a 5×10^6 células por mL (CLSI, 2005). A leitura da turbidez foi feita em espectrofotometria a 530 nm. Após preparo do inóculo foi feita uma diluição 1:50 e depois 1:20 com meio de cultura RPMI-1640, para obter um inóculo com concentração de 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL.

O inóculo, referente a cada amostra de levedura, foi distribuído nas placas contendo antifúngico (CTZ, FCZ, ITZ, AMB), em alíquotas de 100 µL e incubados à temperatura de 35° C por um período de 48 horas. As placas de AMB foram protegidas da luz durante todo o processo. Em todos os testes foram utilizadas as cepas padrão de referência *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 para controle de qualidade da reação.

A leitura das placas foi realizada através de leitura visual após 48 horas de incubação a 35° C, observando presença ou ausência de crescimento visível, depois de agitar as placas no agitador de Kline. Os poços de microdiluição receberam uma pontuação (escore). O crescimento em cada poço foi comparado com o poço controle de crescimento com auxílio de um espelho de leitura; assim cada poço recebeu um valor numérico, usando a seguinte escala: 0 – opticamente claro; 1 – crescimento indefinido; 2 – redução proeminente de crescimento; 3 – ligeira redução do crescimento; e 4 – nenhuma redução do crescimento. O valor de CIM da anfotericina B foi definido como a menor concentração que se observa o escore 0, sendo a CIM para os azólicos a menor concentração em que foi observado o escore 2, o que corresponde à aproximadamente 50% da inibição do crescimento (CLSI, 2005). Toda leitura visual foi confirmada pela leitura da absorbância de luz, em leitor de ELISA com comprimento de onda de 492 nm, através do espectrofotômetro Multiskan Titertek (Flow Laboratories, Sweden) 48 horas após preparação das placas (Figura 16).

As cepas padrão de referência apresentaram valores de CIM dentro dos intervalos abaixo para validar os resultados, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, CTZ = 0,06 – 0,25 µg/mL, FCZ = 0,5 – 4 µg/mL, ITZ = 0,12 – 0,50 µg/mL, AMB = 0,5 – 2 e *Candida krusei* ATCC 6258, CTZ = 0,25 – 1 µg/mL, FCZ = 16 - ≥64 µg/mL, ITZ = 0,25 – 1 µg/mL, AMB = 0,5 – 2 µg/mL.

Após a leitura das placas e análise de dados, os resultados foram considerados válidos quando: as cepas padrão apresentaram valor de CIM dentro do intervalo acima citado, o controle de esterilidade não apresentou crescimento e o controle positivo apresentou crescimento considerado satisfatório.

A interpretação dos resultados das drogas testadas foi realizada conforme documento M27 A2 (CLSI, 2005).



Figura 16 – Placa de microtitulação com diferentes concentrações de itraconazol (CLSI) e amostras de leveduras do gênero *Candida*.

Fonte: Imagem obtida pela autora
Seção Micologia - IAL

4.4.3. Etest

O Etest foi utilizado de acordo com instruções do fabricante (AB Biodisk, Solna, Sweden). Meio RPMI-1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio com glicose 2% protegido com tampão MOPS, pH 7,0 e 1,5 % de Bacto ágar (DIFCO Laboratories, USA) foi preparado em placas para o uso do Etest. Cada colônia de levedura do gênero *Candida* a ser testada, foi repicada em ágar Sabouraud dextrose sem cloranfenicol e incubada por 24 h à 35° C. Foram realizadas suspensões individuais das colônias a serem testadas em 5 mL de salina (0,85 %) estéril correspondendo a 0,5 da escala de McFarland. Cada suspensão foi inoculada em

placas de Petri de 150 mm contendo ágar RPMI-1640, usando swab estéril, estriando de forma homogênea toda a superfície do ágar. Aguardou-se 15 min para absorver (secar) o excesso da mistura, após as fitas Etest impregnadas com os antifúngicos: cetozonazol, itraconazol e anfotericina B em concentração de 32 a 0,002 µg/mL e o antifúngico fluconazol na concentração de 256 a 0,016 µg/mL, foram aplicadas sobre a superfície do ágar com o auxílio de pinça estéril. A CIM dos compostos foi determinada como a concentração mais baixa da droga que a elipse conseguiu inibir e interceptar a tira de antifúngico, após incubação à 35° C e leitura realizada após 24 hs (Figura 17).



Figura 17 – Placa ilustrando fitas de Etest (cetozonazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B).

Fonte: Imagem obtida pela autora
Seção Micologia - IAL

4.5. Procedimentos de análise dos resultados

Os dados foram tabulados e analisados com auxílio da planilha eletrônica Microsoft-Excel, versão 2000 e Epi-Info, versão 6.04d. A distribuição das espécies do gênero *Candida* foi descrita nos grupos de gestantes e não gestantes e segundo presença ou ausência de sintomatologia. Diferenças nessas proporções foram analisadas pelo teste do qui-quadrado com correção de Yates. A concordância entre os resultados dos valores de CIM observados nas duas metodologias (CLSI e Etest) foi analisada pelo coeficiente de correlação de Pearson e os resultados do perfil de susceptibilidade estabelecidos pelo ponto de corte da CIM foram avaliados pela estatística Kappa que exclui os resultados concordantes por acaso. Para todas as análises considerou-se o nível de significância de 95%.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento das amostras

Os espécimens clínicos (secreções vaginais) foram colhidos de pacientes atendidas no ambulatório de ginecologia/obstetrícia do Hospital Geral Universitário de Cuiabá – MT, no período compreendido entre novembro 2005 a novembro de 2006. O número total correspondeu a 404 pacientes, sendo 203 referentes a pacientes não gestantes e 201 a pacientes gestantes.

A partir das 404 amostras de secreções vaginais, foram obtidos 160 isolados de leveduras do gênero *Candida*, resultando uma prevalência (IC 95%) total de candidíase vulvovaginal de 39,6 % (35% – 44%). Considerando pacientes não gestantes, foram obtidos 70 isolados de leveduras do gênero *Candida*, com prevalência (IC 95%) de 34,5% (28% – 41%). Nas pacientes gestantes foram obtidos 90 isolados de leveduras do gênero *Candida*, com prevalência (IC 95%) de 44,8% (38% – 52%) (Tabela 2).

A idade média das pacientes não gestantes foi de 30,7 anos, variando de 16 a 54 anos e das pacientes gestantes correspondeu a 25,3 anos, variando entre 16 a 41 anos.

Tabela 2 – Prevalência de leveduras do gênero *Candida* em pacientes não gestantes e pacientes gestantes do Hospital Geral Universitário de Cuiabá-MT, 2005-2006.

Pacientes	Isolamento leveduras gênero <i>Candida</i>		Prevalência (IC 95%)
	(n)		
Não gestantes	70		34,5 % (28% – 41%)
Gestantes	90		44,8 % (38% – 52%)
Total	160		39,6 % (35% – 44%)

5.2. Sintomatologia associada às pacientes e leveduras isoladas

Em relação à sintomatologia presente em pacientes, durante a coleta do material clínico, foi observado que: entre as pacientes não gestantes, 13 (18,6%) apresentaram-se assintomáticas (7 com *C. albicans* e 6 não *albicans*) e 57 (81,4%) apresentaram-se sintomáticas (44 com *C. albicans* e 13 não *albicans*). Esta diferença, no entanto, não foi estatisticamente significativa ($p=0,16$) (Figura 18).

Entre as pacientes gestantes, 14 (15,5%) apresentaram-se assintomáticas (12 com *C. albicans* e 2 não *albicans*) e 76 (84,4%) apresentaram-se sintomáticas (71 com *C. albicans* e 5

não albicans). Esta diferença, contudo, não foi estatisticamente significativa ($p= 0,30$) (Figura 19).

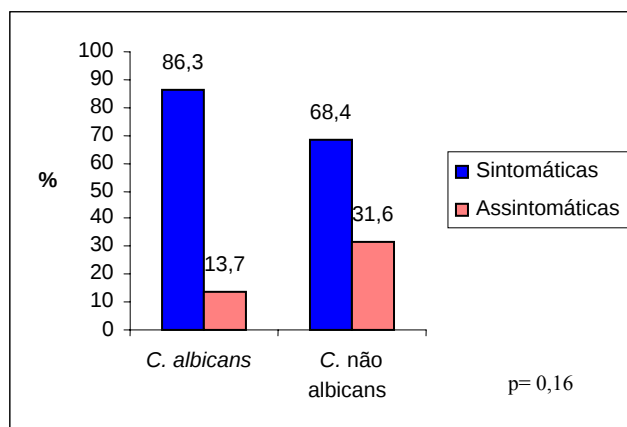


Figura 18 – Distribuição das pacientes não gestantes examinadas, segundo presença de sintomas e leveduras isoladas (*C. albicans* e não albicans), Hospital Geral Universitário de Cuiabá-MT, 2005-2006.

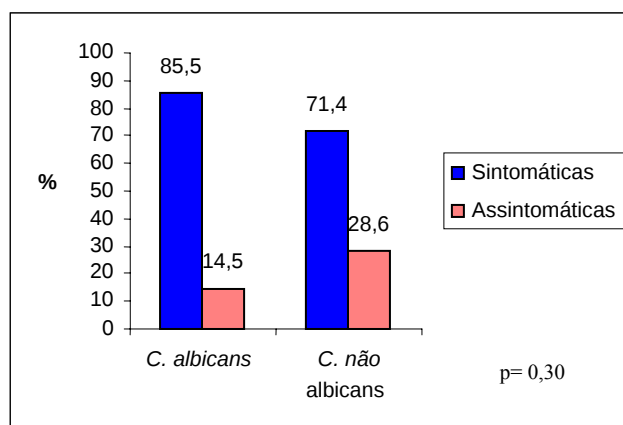


Figura 19 – Distribuição das pacientes gestantes examinadas, segundo presença de sintomas e leveduras isoladas (*C. albicans* e não albicans), Hospital Geral Universitário de Cuiabá-MT, 2005-2006.

5.3. Identificação das espécies

As 160 amostras de leveduras do gênero *Candida* isoladas, a partir de secreções vaginais, foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Candida*, através de esfregaço obtido de colônias coradas pela técnica de Gram. Em sequência, as colônias foram testadas quanto a pureza, através do plaqueamento em meio CHROMagar. E este procedimento não serviu apenas para avaliar a pureza das colônias, mas, contribuir de forma presuntiva na identificação das mesmas, através da coloração observada: *C. albicans* – colônias verdes, *C. tropicalis* – colônias azuis e *Candida* spp – colônias rosas. A confirmação da identificação das espécies de leveduras do gênero *Candida* isoladas, foi realizada através das provas do tubo germinativo, microcultivo, características bioquímicas: auxanograma e zimograma. As características bioquímicas (assimilação e fermentação) das espécies de leveduras do gênero *Candida* estão representadas na tabela 3.

As amostras de pacientes não gestantes identificadas obedecem a seguinte distribuição: 51 (72,9%) foram identificadas como *C. albicans*, 10 (14,3%) como *C. parapsilosis*, 4 (5,7%) como *C. tropicalis*, 3 (4,3%) como *C. glabrata* e 2 (2,8%) como *C. krusei* (Figura 20). Já nas pacientes gestantes: 83 (92,3%) foram identificadas como *C. albicans*, 3 (3,3%) como *C. krusei*, 2 (2,2%) como *C. glabrata*, 1 (1,1%) como *C. parapsilosis* e 1 (1,1%) como *C. tropicalis* (Figura 21).

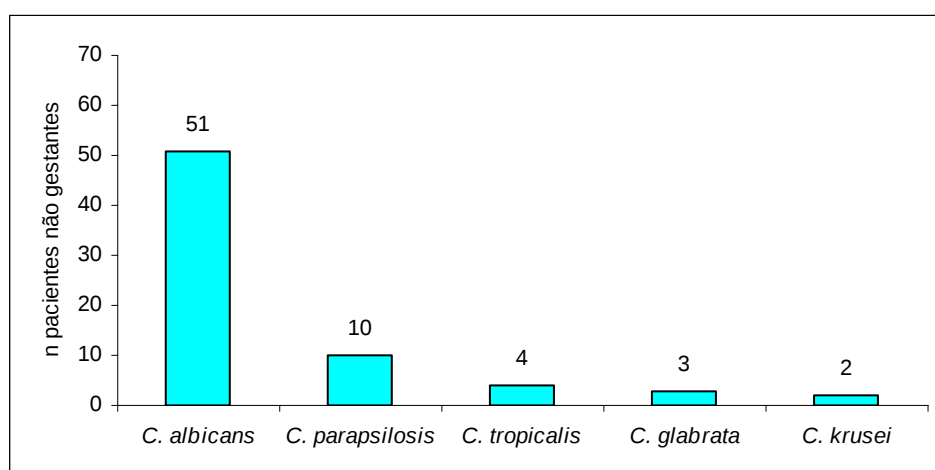


Figura 20 – Identificação das espécies de leveduras do gênero *Candida* em pacientes não gestantes, Hospital Geral Universitário de Cuiabá-MT, 2005-2006.

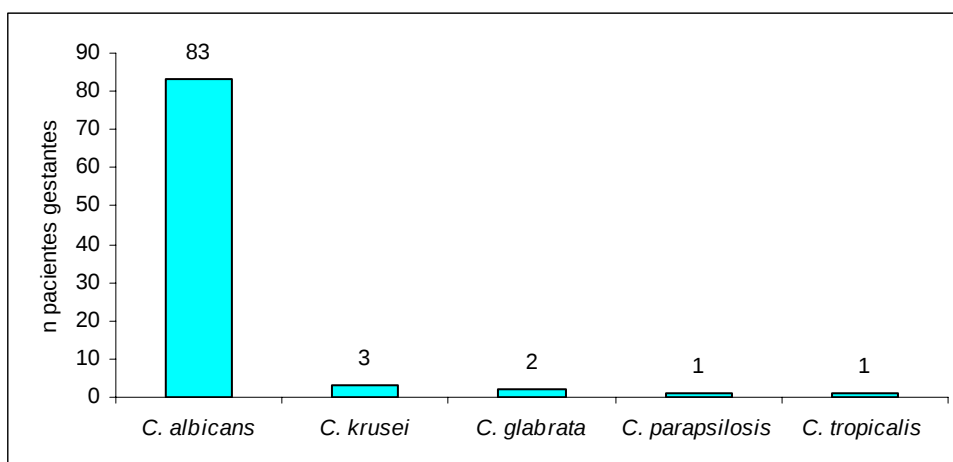


Figura 21 – Identificação das espécies de leveduras do gênero Candida em pacientes gestantes, Hospital Geral Universitário de Cuiabá-MT, 2005-2006.

Tabela 3 – Perfil bioquímico (assimilação e fermentação) das espécies de leveduras do gênero *Candida* segundo Kwon-Chung & Bennett, 1992; Kurtzman & Fell, 1998.

Espécies	Assimilação									Fermentação								
	GLI	MAL	SAC	GAL	LAC	RAF	TRE	XIL	MEL	GLI	MAL	SAC	GAL	LAC	RAF	TRE	XIL	MEL
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+(v)	-	-	+/-		-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-(v)	-(v)	+/- (v)	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+(v)	+	-	-	+	+	-	+	+	+(v)	+(v)	-	-	+/-	+/-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-

GLI: Glicose, MAL: Maltose, SAC: Sacarose, GAL: Galactose, LAC: Lactose, RAF: Rafnose, TRE: Trealose, XIL: Xilose, MEL: Melibiose
V = Variável

5.4. Determinação da concentração inibitória mínima de quatro drogas antifúngicas para os isolados de leveduras do gênero *Candida* de pacientes não gestantes e gestantes.

Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas do cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B para os 70 isolados de leveduras do gênero *Candida* de pacientes não gestantes e 90 isolados de leveduras do gênero *Candida* de pacientes gestantes, pela metodologia de microdiluição proposta pelo CLSI e por metodologia comercial usando fitas de Etest, com leitura realizada após 48 horas e 24 horas respectivamente. Os resultados das CIM das quatro drogas, para cada amostra das pacientes não gestantes e gestantes considerando as duas metodologias (Anexos 5 a 14), estão representados nas figuras 22 a 26.

A variação entre os valores mínimos e máximos das CIM das amostras de pacientes não gestantes está representada na tabela 4, e ainda os valores da CIM₅₀ e CIM₉₀. Estes valores representam a concentração inibitória mínima suficiente para inibir 50% dos isolados e 90% dos isolados respectivamente.

A CIM₉₀ dos isolados de *C. tropicalis* e *C. glabrata* e as CIM₅₀ e CIM₉₀ dos isolados de *C. krusei* não foram determinadas devido ao restrito número de amostras.

A variação entre os valores mínimos e máximos das CIM das amostras de pacientes gestantes está representada na tabela 5, assim como os valores da CIM₅₀ e CIM₉₀. A CIM₉₀ dos isolados de *C. krusei* e as CIM₅₀ e CIM₉₀ dos isolados de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, como anteriormente mencionado, não foram determinados devido ao número diminuto de amostras.

5.4.1. Microdiluição em caldo CLSI (2005)

Os valores de CIM dos antifúngicos expressos em µg/mL, para as amostras de pacientes não gestantes após 48 horas foram: *C. albicans* oscilaram entre 0,015 – 0,25 para o cetoconazol, 0,12 – 1,0 para o fluconazol, 0,015 – 0,12 para o itraconazol e 0,015 – 0,5 para a anfotericina B. Com relação aos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, respectivamente, pôde-se observar valores de 0,015 e 0,015 µg/mL para o cetoconazol, 0,25 e 0,50 µg/mL para o fluconazol, 0,03 e 0,06 µg/mL para o itraconazol e 0,06 e 0,12 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 4).

Para os isolados de *C. parapsilosis* de pacientes não gestantes os valores oscilaram entre 0,015 – 0,03 µg/mL para o cetoconazol, 0,12 – 2,0 µg/mL para o fluconazol, 0,015 – 0,06

µg/mL para o itraconazol e 0,015 – 0,12 µg/mL para a anfotericina B. Com relação aos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, respectivamente, pôde-se observar valores de 0,015 e 0,03 µg/mL para o cetoconazol, 0,25 e 1,0 µg/mL para o fluconazol, 0,015 e 0,03 µg/mL para o itraconazol e 0,03 e 0,12 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 4).

Para os isolados de *C. tropicalis* de pacientes não gestantes os valores oscilaram entre 0,015 – 0,25 µg/mL para o cetoconazol, 0,12 – 0,5 µg/mL para o fluconazol, 0,015 – 0,06 µg/mL para o itraconazol e 0,12 – 0,12 µg/mL para a anfotericina B. Com relação aos valores de CIM₅₀, pôde-se observar 0,015 µg/mL para o cetoconazol, 0,12 µg/mL para o fluconazol, 0,015 µg/mL para o itraconazol e 0,12 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 4).

Para os isolados de *C. glabrata* de pacientes não gestantes os valores oscilaram entre 0,015 – 0,25 µg/mL para o cetoconazol, 0,12 – 4,0 µg/mL para o fluconazol, 0,015 – 0,25 µg/mL para o itraconazol e 0,015 – 0,25 µg/mL para a anfotericina B. Com relação aos valores de CIM₅₀, pôde-se observar 0,06 µg/mL para o cetoconazol, 0,12 µg/mL para o fluconazol, 0,06 µg/mL para o itraconazol e 0,03 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 4).

Para os isolados de *C. krusei* de pacientes não gestantes os valores oscilaram entre 0,06 – 1,0 µg/mL para o cetoconazol, 2,0 – 64 µg/mL para o fluconazol, 0,25 – 0,25 µg/mL para o itraconazol e 0,015 – 0,5 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 4).

Não foi possível estabelecer os valores de CIM₉₀ para as espécies: *C. tropicalis* e *C. glabrata* e os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ para a espécie *C. krusei*, isoladas das pacientes não gestantes devido ao restrito número de isolados.

Entretanto, para as pacientes gestantes os valores de CIM referentes à *C. albicans* após 48 horas oscilaram entre 0,015 – 0,25 µg/mL para o cetoconazol, 0,12- 1,0 µg/mL para o fluconazol, 0,015 – 0,12 µg/mL para o itraconazol e 0,015 – 0,25 µg/mL para a anfotericina B. Com relação aos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, respectivamente, pôde-se observar valores de 0,015 e 0,03 µg/mL para o cetoconazol, 0,25 e 0,25 µg/mL para o fluconazol, 0,03 e 0,06 µg/mL para o itraconazol e 0,06 e 0,12 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 5).

Para os isolados de *C. krusei* de pacientes gestantes os valores oscilaram entre 0,12 – 0,25 µg/mL para o cetoconazol, 0,12 – 1,0 µg/mL para o fluconazol, 0,06 – 0,25 µg/mL para o itraconazol e 0,015 – 0,5 µg/mL para a anfotericina B. Com relação aos valores de CIM₅₀, pôde-se observar 0,12 µg/mL para o cetoconazol, 0,25 µg/mL para o fluconazol, 0,25 µg/mL para o itraconazol e 0,25 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 5).

Para os isolados de *C. glabrata* de pacientes gestantes os valores oscilaram entre 0,015 – 0,03 µg/mL para o cetoconazol, 0,12 – 2,0 µg/mL para o fluconazol, 0,03 – 0,03 µg/mL para o itraconazol e 0,12 – 0,12 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 5).

Não foi possível estabelecer os valores de CIM₉₀ para a espécie: *C. krusei* e os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ para a espécie: *C. glabrata*, isoladas das pacientes gestantes devido ao pequeno número de amostras.

Para as espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* isoladas de pacientes gestantes, não foi possível demonstrar a oscilação dos valores de CIM, bem como os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ devido a presença de apenas um isolado de cada espécie neste grupo.

5.4.2. Etest

Os valores de CIM dos antifúngicos referentes a *C. albicans* para as amostras de pacientes não gestantes após 24 horas oscilaram entre 0,003 – 0,38 µg/mL (cetoconazol), 0,094 – 1,5 µg/mL (fluconazol), 0,002 – 0,125 µg/mL (itraconazol) e 0,008 – 0,125 µg/mL (anfotericina B). Com relação aos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, respectivamente, pôde-se observar valores de 0,006 e 0,012 µg/mL para o cetoconazol, 0,38 e 1,0 µg/mL para o fluconazol, 0,016 e 0,047 µg/mL para o itraconazol e 0,064 e 0,125 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 4).

Para os isolados de *C. parapsilosis* de pacientes não gestantes os valores oscilaram entre 0,004 – 0,032 µg/mL para o cetoconazol, 0,038 – 2,0 µg/mL para o fluconazol, 0,006 – 0,16 µg/mL para o itraconazol e 0,008 – 0,19 µg/mL para a anfotericina B. Com relação aos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, respectivamente, pôde-se observar valores de 0,012 e 0,023 µg/mL para o cetoconazol, 0,5 e 0,75 µg/mL para o fluconazol, 0,012 e 0,064 µg/mL para o itraconazol e 0,047 e 0,19 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 4).

Para os isolados de *C. tropicalis* de pacientes não gestantes os valores oscilaram entre 0,003 – 0,016 µg/mL para o cetoconazol, 0,125 – 0,75 µg/mL para o fluconazol, 0,023 – 0,047 µg/mL para o itraconazol e 0,023 – 0,19 µg/mL para a anfotericina B. Com relação aos valores de CIM₅₀, pôde-se observar 0,006 µg/mL para o cetoconazol, 0,125 µg/mL para o fluconazol, 0,023 µg/mL para o itraconazol e 0,047 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 4).

Para os isolados de *C. glabrata* de pacientes não gestantes os valores oscilaram entre 0,004 – 0,25 µg/mL para o cetoconazol, 0,25 – 16 µg/mL para o fluconazol, 0,023 – 0,5 µg/mL para o itraconazol e 0,064 – 0,38 µg/mL para a anfotericina B. Com relação aos valores de CIM₅₀, pôde-se observar 0,012 µg/mL para o cetoconazol, 0,25 µg/mL para o fluconazol, 0,064 µg/mL para o itraconazol e 0,094 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 4).

Para os isolados de *C. krusei* de pacientes não gestantes os valores oscilaram entre 0,023 – 0,5 µg/mL para o cetoconazol, 1,5 - 32 µg/mL para o fluconazol, 0,25 – 0,25 µg/mL para o itraconazol e 0,016 – 0,047 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 4).

Não foi possível estabelecer os valores de CIM₉₀ para as espécies: *C. tropicalis* e *C. glabrata* e os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ para a espécie *C. krusei*, isoladas das pacientes não gestantes devido ao restrito número de isolados.

Já para as pacientes gestantes os valores de CIM referentes à *C. albicans* após 24 horas oscilaram entre 0,002 – 0,16 µg/mL para o cetoconazol, 0,094 – 2,0 µg/mL para o fluconazol, 0,003 – 0,125 µg/mL para o itraconazol e 0,006 – 0,19 µg/mL para a anfotericina B. Com relação aos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, respectivamente, foram observados valores iguais a 0,006 e 0,012 µg/mL para o cetoconazol, 0,38 e 1,0 µg/mL para o fluconazol, 0,016 e 0,047 µg/mL para o itraconazol e 0,047 e 0,125 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 5).

Para os isolados de *C. krusei* de pacientes gestantes os valores oscilaram entre 0,023 – 0,38 µg/mL para o cetoconazol, 1,5 – 8,0 µg/mL para o fluconazol, 0,008 – 0,1 µg/mL para o itraconazol e 0,064 – 0,38 µg/mL para a anfotericina B. Com relação aos valores de CIM₅₀, foram observados valores iguais a 0,19 µg/mL para o cetoconazol, 8,0 µg/mL para o fluconazol, 0,094 µg/mL para o itraconazol e 0,125 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 5).

Para os isolados de *C. glabrata* das pacientes gestantes os valores oscilaram entre 0,064 – 0,125 µg/mL para o cetoconazol, 2,0 – 4,0 µg/mL para o fluconazol, 0,047 – 0,125 µg/mL para o itraconazol e 0,016 – 0,094 µg/mL para a anfotericina B (Tabela 5).

Não foi possível estabelecer os valores de CIM₉₀ para a espécie: *C. krusei* e os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ para a espécie: *C. glabrata*, de pacientes gestantes devido ao pequeno número de isolados.

Para as espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* provenientes de pacientes gestantes, não foi possível demonstrar a oscilação dos valores de CIM, bem como os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ devido à presença de apenas um isolado de cada espécie neste grupo.

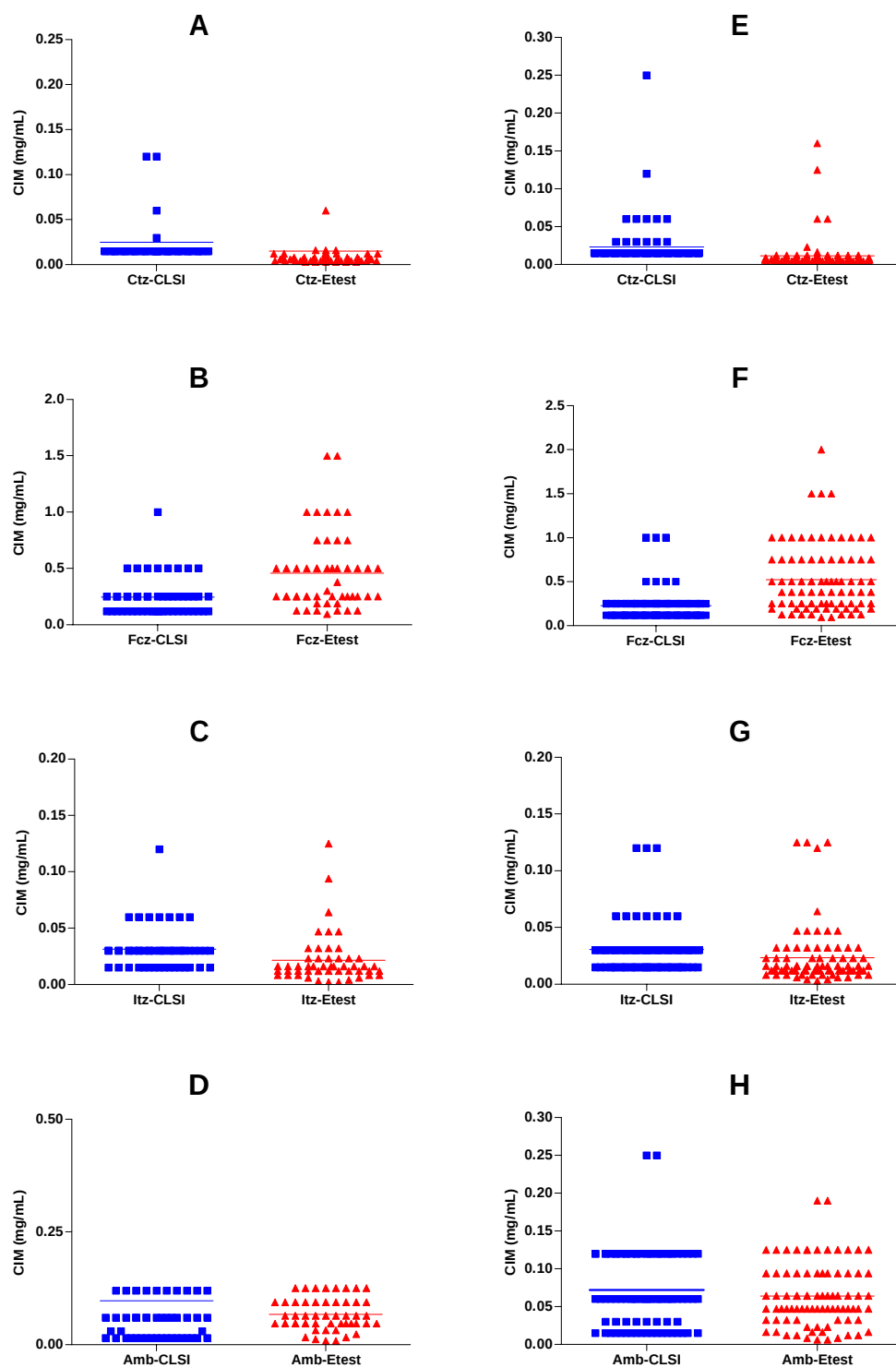
Candida albicans

Figura 22 – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de quatro drogas antifúngicas (cetoconazol-Ctz, fluconazol-Fcz, itraconazol-Itz e anfotericina B-Amb) determinadas pelos métodos de susceptibilidade *in vitro* - CLSI e Etest de isolados de *Candida albicans* obtidos de pacientes não gestantes, n= 51 (A, B, C, D) e gestantes, n= 83 (E, F, G, H).

Candida parapsilosis

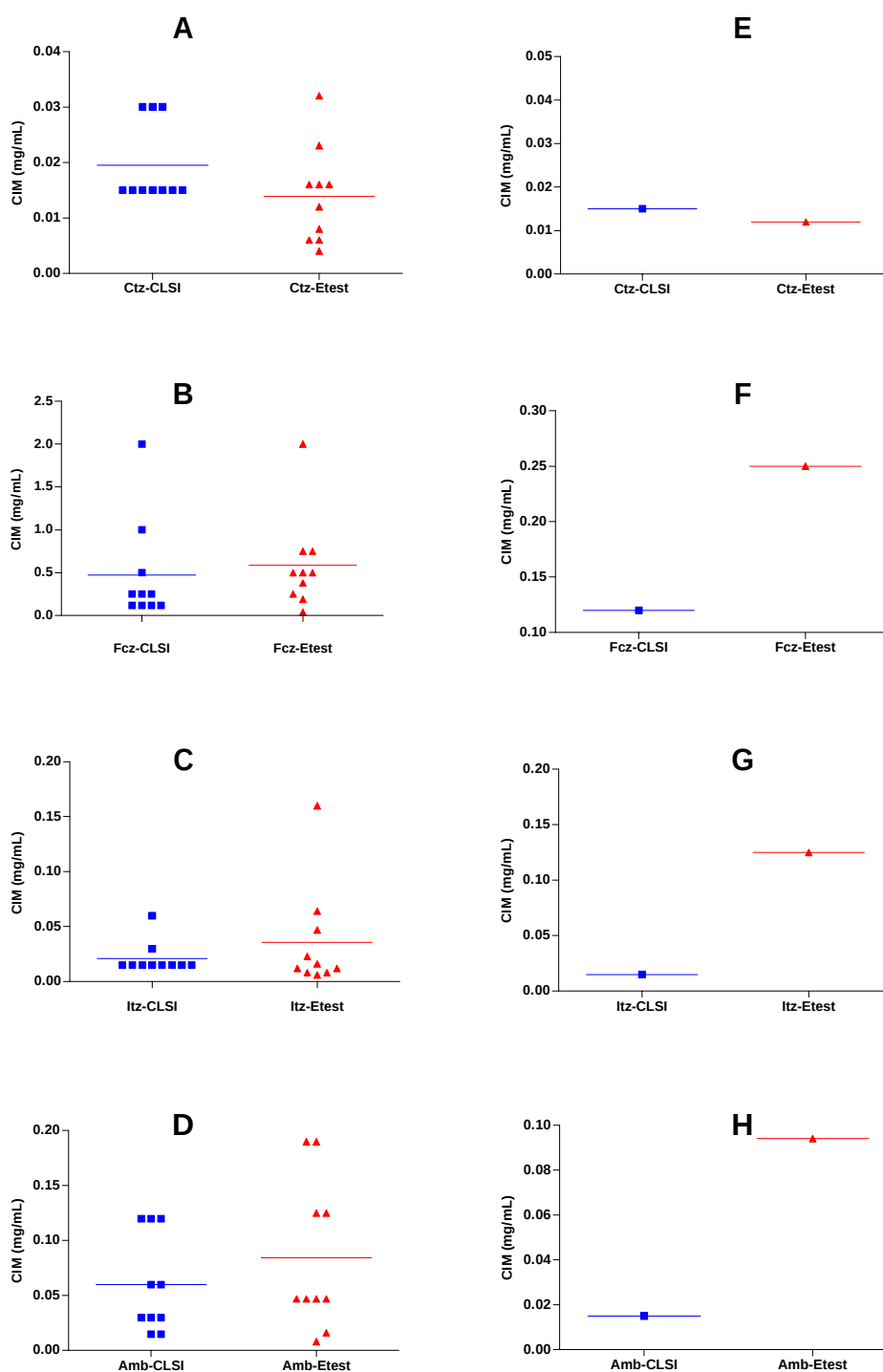


Figura 23 – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de quatro drogas antifúngicas (cetoconazol-Ctz, fluconazol-Fcz, itraconazol-Itz e anfotericina B-Amb) determinadas pelos métodos de susceptibilidade *in vitro* - CLSI e Etest de isolados de *Candida parapsilosis* obtidos de pacientes não gestantes, n=10 (A, B, C, D) e gestantes, n=01 (E, F, G, H).

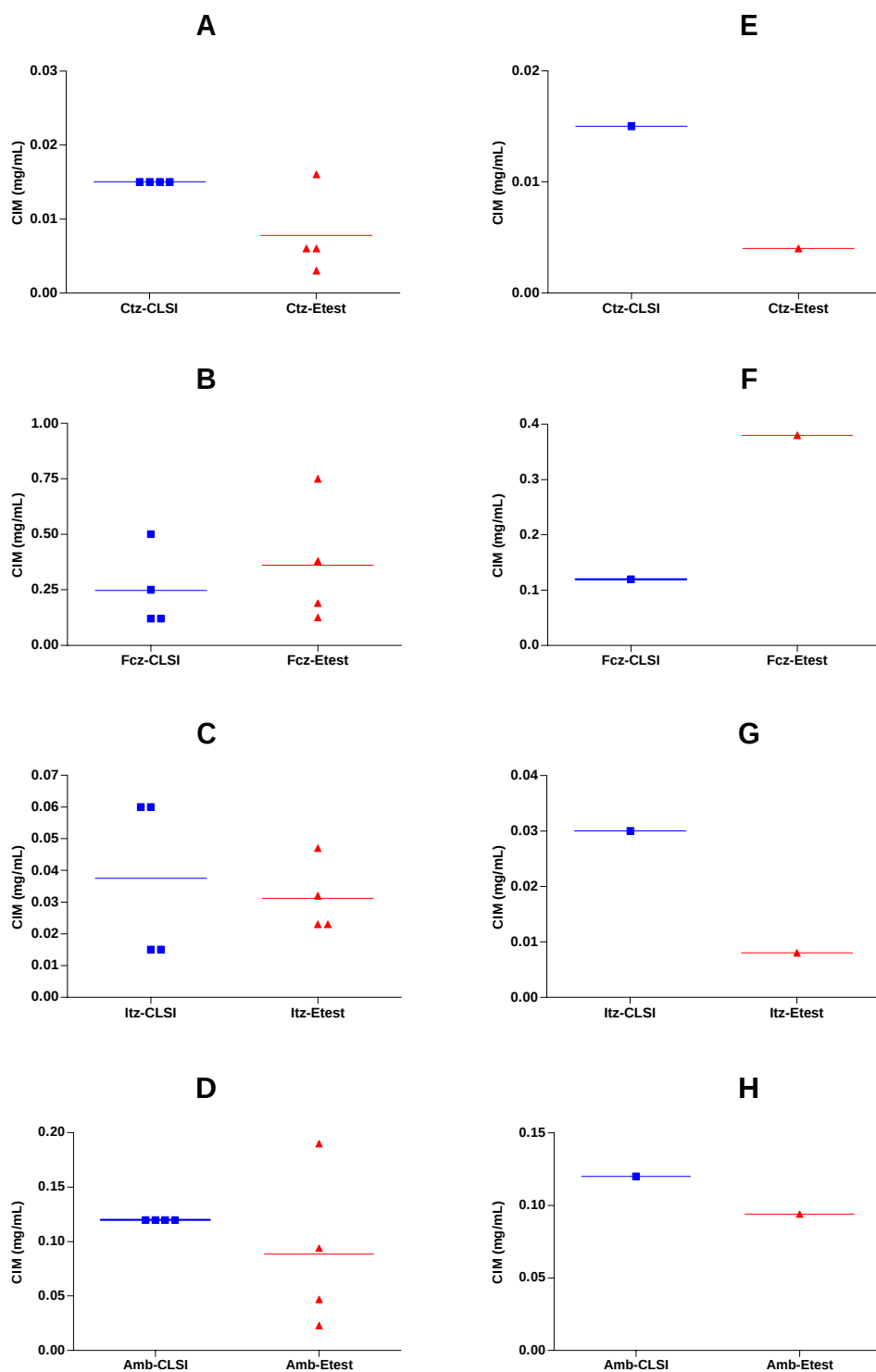
Candida tropicalis

Figura 24 – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de quatro drogas antifúngicas (cetoconazol-Ctz, fluconazol-Fcz, itraconazol-Itz e anfotericina B-Amb) determinadas pelos métodos de susceptibilidade *in vitro* - CLSI e Etest de isolados de *Candida tropicalis* obtidos de pacientes não gestantes, n=04 (A, B, C, D) e gestantes, n= 01 (E, F, G, H).

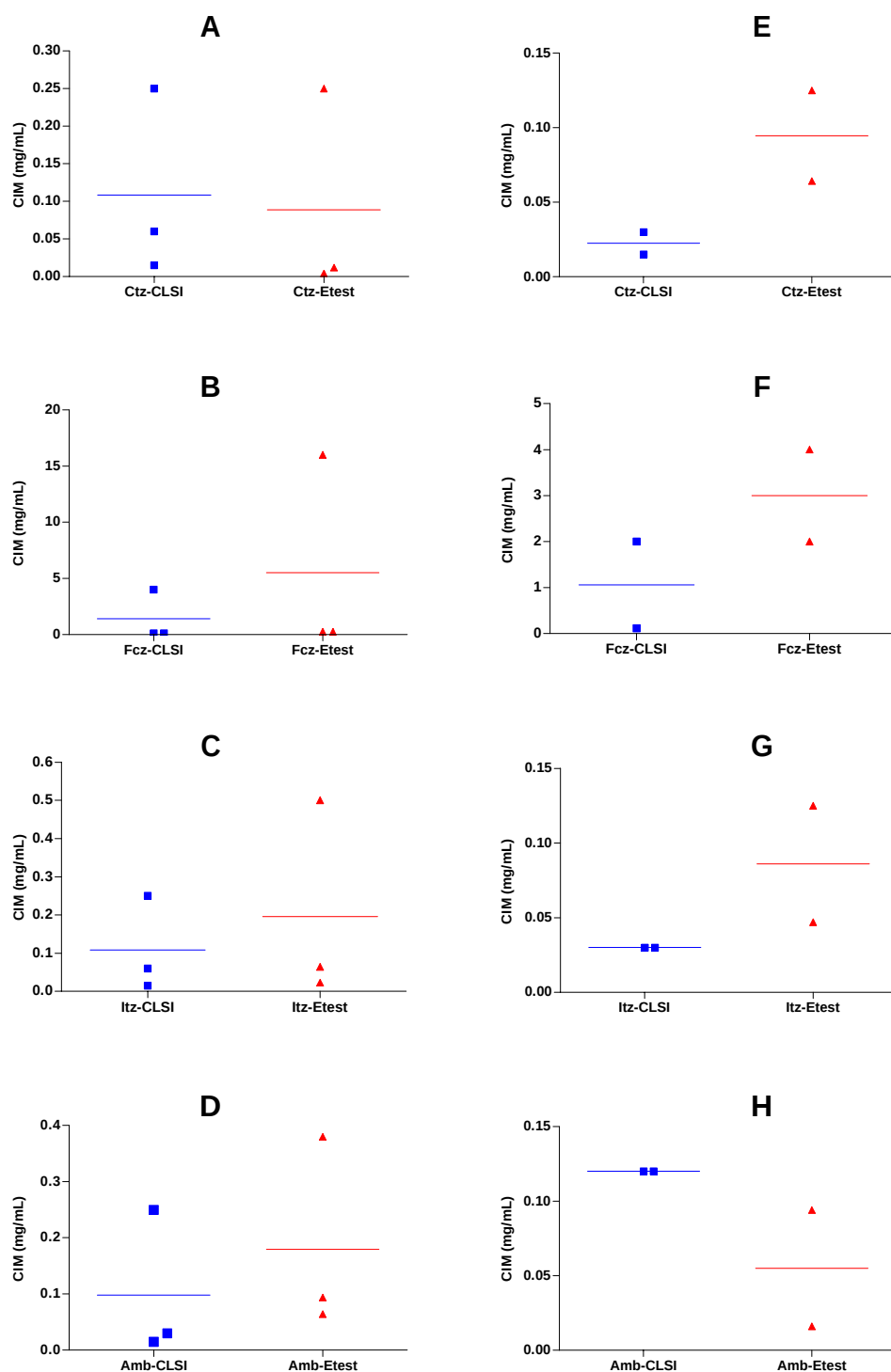
Candida glabrata

Figura 25 – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de quatro drogas antifúngicas (cetoconazol-Ctz, fluconazol-Fcz, itraconazol-Itz e anfotericina B-Amb) determinadas pelos métodos de susceptibilidade *in vitro* - CLSI e Etest de isolados de *Candida glabrata* obtidos de pacientes não gestantes, n=03 (A, B, C, D) e gestantes, n=02 (E, F, G, H).

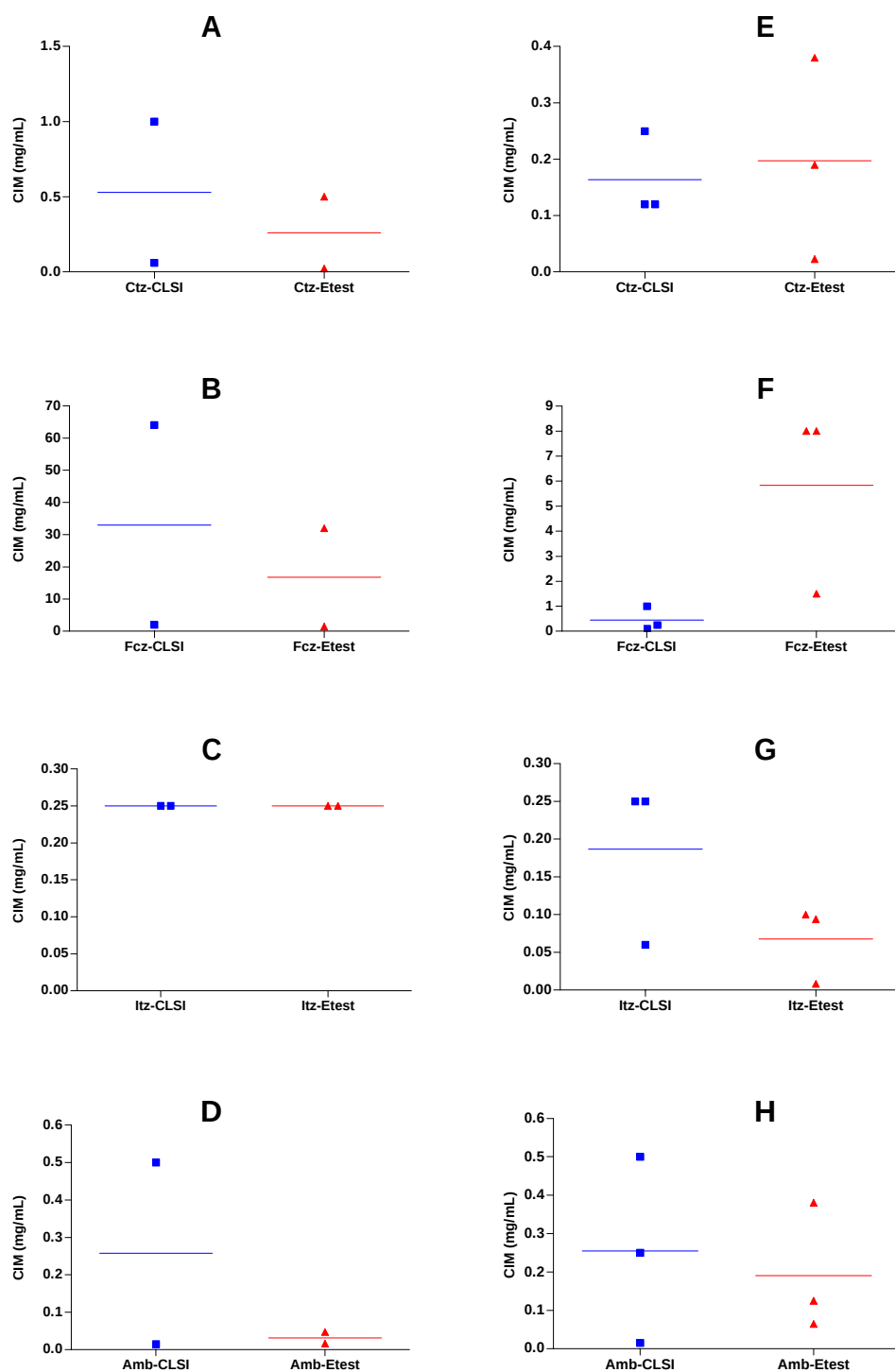
Candida krusei

Figura 26 – Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de quatro drogas antifúngicas (cetoconazol-Ctz, fluconazol-Fcz, itraconazol-Itz e anfotericina B-Amb) determinadas pelos métodos de susceptibilidade *in vitro* - CLSI e Etest de isolados de *Candida krusei* obtidos de pacientes não gestantes, n= 02 (A, B, C, D) e gestantes, n= 03 (E, F, G, H).

Tabela 4 - Variações das concentrações inibitórias mínimas (CIM), CIM₅₀ e CIM₉₀ de isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* em pacientes não gestantes, para quatro drogas antifúngicas, determinadas por duas metodologias.

Amostras e Drogas antifúngicas	CLSI			Etest		
	Faixa Intervalar (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)	Faixa Intervalar (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)
<i>C. albicans</i> (51)						
Cetoconazol	0,015 - 0,25	0,015	0,015	0,003 - 0,38	0,006	0,012
Fluconazol	0,12 - 1,0	0,25	0,50	0,094 - 1,5	0,38	1,0
Itraconazol	0,015 - 0,12	0,03	0,06	0,002 - 0,125	0,016	0,047
Anfotericina B	0,015 - 0,5	0,06	0,12	0,008 - 0,125	0,064	0,125
<i>C. parapsilosis</i> (10)						
Cetoconazol	0,015 - 0,03	0,015	0,03	0,004 - 0,032	0,012	0,023
Fluconazol	0,12 - 2,0	0,25	1,0	0,038 - 2,0	0,5	0,75
Itraconazol	0,015 - 0,06	0,015	0,03	0,006 - 0,16	0,012	0,064
Anfotericina B	0,015 - 0,12	0,03	0,12	0,008 - 0,19	0,047	0,19
<i>C. tropicalis</i> (4)						
Cetoconazol	0,015 - 0,015	0,015	-	0,003 - 0,016	0,006	-
Fluconazol	0,12 - 0,5	0,12	-	0,125 - 0,75	0,125	-
Itraconazol	0,015 - 0,06	0,015	-	0,023 - 0,047	0,023	-
Anfotericina B	0,12 - 0,12	0,12	-	0,023 - 0,19	0,047	-
<i>C. glabrata</i> (3)						
Cetoconazol	0,015 - 0,25	0,06	-	0,004 - 0,25	0,012	-
Fluconazol	0,12 - 4,0	0,12	-	0,25 - 16	0,25	-
Itraconazol	0,015 - 0,25	0,06	-	0,023 - 0,5	0,064	-
Anfotericina B	0,015 - 0,25	0,03	-	0,064 - 0,38	0,094	-
<i>C. krusei</i> (2)						
Cetoconazol	0,06 - 1,0	-	-	0,023 - 0,5	-	-
Fluconazol	2,0 - 64	-	-	1,5 - 32	-	-
Itraconazol	0,25 - 0,25	-	-	0,25 - 0,25	-	-
Anfotericina B	0,015 - 0,5	-	-	0,016 - 0,047	-	-

Tabela 5 - Variações das concentrações inibitórias mínimas (CIM), CIM₅₀ e CIM₉₀ de isolados de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* em pacientes gestantes, para quatro drogas antifúngicas, determinadas por duas metodologias.

Amostras e Drogas antifúngicas	CLSI			Etest		
	Faixa Intervalar (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)	Faixa Intervalar (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)
<i>C. albicans</i> (83)						
Cetoconazol	0,015 - 0,25	0,015	0,03	0,002 - 0,16	0,006	0,012
Fluconazol	0,12 - 1,0	0,25	0,25	0,094 - 2,0	0,38	1,0
Itraconazol	0,015 - 0,12	0,03	0,06	0,003 - 0,125	0,016	0,047
Anfotericina B	0,015 - 0,25	0,06	0,12	0,006 - 0,19	0,047	0,125
<i>C. krusei</i> (3)						
Cetoconazol	0,12 - 0,25	0,12	-	0,023 - 0,38	0,19	-
Fluconazol	0,12 - 1,0	0,25	-	1,5 - 8,0	8,0	-
Itraconazol	0,06 - 0,25	0,25	-	0,008 - 0,1	0,094	-
Anfotericina B	0,015 - 0,5	0,25	-	0,064 - 0,38	0,125	-
<i>C. glabrata</i> (2)						
Cetoconazol	0,015 - 0,03	-	-	0,064 - 0,125	-	-
Fluconazol	0,12 - 2,0	-	-	2,0 - 4,0	-	-
Itraconazol	0,03 - 0,03	-	-	0,047 - 0,125	-	-
Anfotericina B	0,12 - 0,12	-	-	0,016 - 0,094	-	-

5.4.3. Variação do perfil de susceptibilidade obtido pela metodologia de microdiluição segundo o documento M27A2 (CLSI,2005)

Os resultados dos perfis de susceptibilidade de pacientes não gestantes, obtidos neste estudo, para as quatro drogas antifúngicas, estão representados na tabela 6.

Todos os isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* de pacientes não gestantes apresentaram 100% de susceptibilidade ao cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B (Tabela 6).

Quanto aos isolados de *C. glabrata* de pacientes não gestantes, 100% apresentaram susceptibilidade ao cetoconazol, fluconazol e anfotericina B. Para o itraconazol dois isolados (66,7%) apresentaram susceptibilidade e um isolado (33,3%) foi susceptível dose-dependente (Tabela 6).

Os isolados de *C. krusei* de pacientes não gestantes apresentaram 100% de susceptibilidade ao cetoconazol e anfotericina B. Para o fluconazol um isolado (50%) apresentou

susceptibilidade e um isolado (50%) exibiu resistência. Para o itraconazol 100% dos isolados apresentaram susceptibilidade dose-dependente (Tabela 6).

Os resultados dos perfis de susceptibilidade de pacientes gestantes, obtidos neste estudo, para as quatro drogas antifúngicas, estão representados na tabela 7.

Todos os isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* de pacientes gestantes apresentaram 100% de susceptibilidade ao cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B (Tabela 7).

Quanto aos isolados de *C. krusei* de pacientes gestantes, 100% apresentaram susceptibilidade ao cetoconazol, fluconazol e anfotericina B. Para o itraconazol 33,3% apresentaram susceptibilidade e 66,7% foram susceptíveis dose-dependente (Tabela 7).

5.4.4. *Variação do perfil de susceptibilidade obtido pela metodologia comercial Etest*

Os resultados dos perfis de susceptibilidade de pacientes não gestantes, obtidos neste estudo, para as quatro drogas antifúngicas, estão representados na tabela 6.

Todos os isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* de pacientes não gestantes apresentaram 100% de susceptibilidade ao cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B (Tabela 6).

Os isolados de *C. glabrata* de pacientes não gestantes apresentaram 100% de susceptibilidade ao cetoconazol e anfotericina B. Para o fluconazol e itraconazol dois isolados (66,7%) apresentaram susceptibilidade e um isolado (33,3%) apresentou susceptibilidade dose-dependente (Tabela 6).

Os isolados de *C. krusei* de pacientes não gestantes apresentaram 100% de susceptibilidade ao cetoconazol e anfotericina B. Para o fluconazol um isolado (50%) apresentou susceptibilidade e um isolado (50%) susceptibilidade dose-dependente. Para o itraconazol 100% dos isolados apresentaram susceptibilidade dose-dependente (Tabela 6).

Os resultados dos perfis de susceptibilidade de pacientes gestantes, obtidos neste estudo, para as quatro drogas antifúngicas, estão representados na tabela 7.

Todos os isolados de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* de pacientes gestantes apresentaram 100% de susceptibilidade ao cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B (Tabela 7).

5.4.5. Grau de concordância entre as metodologias CLSI e Etest

Em análise conjunta das pacientes gestantes ou não os valores de CIM produzidos pelo CLSI e Etest apresentaram concordância excelente para o cetoconazol ($r = 0,706$; $p < 0,00001$) e baixa para o itraconazol e anfotericina B ($r = 0,319$; $p < 0,00001$ e $r = 0,322$; $p < 0,00001$, respectivamente). Para o fluconazol, não se observou concordância entre os valores de CIM no CLSI e Etest ($r = 0,042$; $p = 0,597$). No entanto, para todas as drogas antifúngicas, foi alta a concordância do perfil de susceptibilidade avaliado pela proporção de valores de CIM abaixo do ponto de corte. (Kappa = 1,0, para cetoconazol e anfotericina B e Kappa = 0,99 para fluconazol e itraconazol) (Tabela 6 e 7).

No grupo de pacientes não gestantes, foram observadas discrepâncias referentes aos isolados de *C. glabrata*. O isolado (395) apresentou susceptibilidade dose-dependente ao itraconazol na metodologia do CLSI e susceptibilidade (Etest); o isolado (205) apresentou susceptibilidade (CLSI) e susceptibilidade dose-dependente (Etest) para o fluconazol e itraconazol.

Quanto à *C. krusei* do mesmo grupo (não gestantes) houve uma discrepância: o isolado (389) apresentou susceptibilidade dose-dependente (Etest) e resistência (CLSI) referente ao fluconazol.

No grupo de pacientes gestantes foram observadas duas discrepâncias em relação aos isolados (59 e 369) de *C. krusei* frente ao itraconazol. Estes isolados apresentaram susceptibilidade (Etest) e susceptibilidade dose-dependente (CLSI).

Os resultados refletindo a comparação entre as metodologias avaliadas estão representados na tabela 8, para as pacientes não gestantes e tabela 9, para as pacientes gestantes, exibindo valores de média, mediana e moda das concentrações inibitórias mínimas para cada droga antifúngica.

Tabela 6 – Comparação dos perfis de susceptibilidade *in vitro* de isolados de leveduras do gênero *Candida* em pacientes não gestantes, utilizando duas metodologias (CLSI e Etest).

Amostras	Cetoconazol			Fluconazol			Itraconazol			Anfotericina B		
	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R
Metodologia	(a)			(b)			(c)			(d)		
Conc. droga µg/mL	< 4,0	-	≥ 4,0	≤ 8,0	16 - 32	≥ 64	≤ 0,125	0,25 - 0,5	≥ 1,0	≤ 1,0	-	> 1,0
<i>C. albicans</i> (51)												
CLSI	51 (100%)	-	0	51 (100%)	0	0	51 (100%)	0	0	51 (100%)	-	0
Etest	51 (100%)	-	0	51 (100%)	0	0	51 (100%)	0	0	51 (100%)	-	0
<i>C. parapsilosis</i> (10)												
CLSI	10 (100%)	-	0	10 (100%)	0	0	10 (100%)	0	0	10 (100%)	-	0
Etest	10 (100%)	-	0	10 (100%)	0	0	10 (100%)	0	0	10 (100%)	-	0
<i>C. tropicalis</i> (4)												
CLSI	4 (100%)	-	0	4 (100%)	0	0	4 (100%)	0	0	4 (100%)	-	0
Etest	4 (100%)	-	0	4 (100%)	0	0	4 (100%)	0	0	4 (100%)	-	0
<i>C. glabrata</i> (3)												
CLSI	3 (100%)	-	0	3 (100%)	0	0	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0	3 (100%)	-	0
Etest	3 (100%)	-	0	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0	3 (100%)	-	0
<i>C. krusei</i> (2)												
CLSI	2 (100%)	-	0	1 (50%)	0	1(50%)	0	2 (100%)	0	2 (100%)	-	0
Etest	2 (100%)	-	0	1 (50%)	1 (50%)	0	0	2 (100%)	0	2 (100%)	-	0

S – Susceptibilidade / SDD – Susceptibilidade Dose-Dependente / R – Resistência

(a) Pontos de susceptibilidade estabelecidos para leveduras do gênero *Candida* em µg/mL (Rex et al. 1997, Espinel-Ingroff et al. 1998)

(b) (c) e (d) Pontos de susceptibilidade estabelecidos para leveduras do gênero *Candida* em µg/mL, segundo CLSI (2005)

Tabela 7 – Comparação dos perfis de susceptibilidade *in vitro* de isolados de leveduras do gênero *Candida* em pacientes gestantes, utilizando duas metodologias (CLSI e Etest).

Amostras	Cetoconazol			Fluconazol			Itraconazol			Anfotericina B		
	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R
Metodologia	(a)			(b)			(c)			(d)		
Conc. droga µg/mL	< 4,0	-	≥ 4,0	≤ 8,0	16 - 32	≥ 64	≤ 0,125	0,25 - 0,5	≥ 1,0	≤ 1,0	-	> 1,0
<i>C.albicans</i> (83)												
CLSI	83 (100%)	-	0	83 (100%)	0	0	83 (100%)	0	0	83 (100%)	-	0
Etest	83 (100%)	-	0	83 (100%)	0	0	83 (100%)	0	0	83 (100%)	-	0
<i>C.krusei</i> (3)												
CLSI	3 (100%)	-	0	3 (100%)	0	0	1 (33,3%)	02 (66,7%)	0	3 (100%)	-	0
Etest	3 (100%)	-	0	3 (100%)	0	0	3 (100%)	0	0	3 (100%)	-	0
<i>C. glabrata</i> (2)												
CLSI	2 (100%)	-	0	2 (100%)	0	0	2 (100%)	0	0	2 (100%)	-	0
Etest	2 (100%)	-	0	2 (100%)	0	0	2 (100%)	0	0	2 (100%)	-	0
<i>C. parapsilosis</i> (1)												
CLSI	1 (100%)	-	0	1 (100%)	0	0	1 (100%)	0	0	1 (100%)	-	0
Etest	1 (100%)	-	0	1 (100%)	0	0	1 (100%)	0	0	1 (100%)	-	0
<i>C. tropicalis</i> (1)												
CLSI	1 (100%)	-	0	1 (100%)	0	0	1 (100%)	0	0	1 (100%)	-	0
Etest	1 (100%)	-	0	1 (100%)	0	0	1 (100%)	0	0	1 (100%)	-	0

S – Susceptibilidade / SDD – Susceptibilidade Dose-Dependente / R – Resistência

(a) Pontos de susceptibilidade estabelecidos para leveduras do gênero *Candida* (Rex et al. 1997, Espinel-Ingroff et al. 1998)

(b) (c) e (d) Pontos de susceptibilidade estabelecidos para leveduras do gênero *Candida* segundo CLSI (2005)

Tabela 8 – Média, mediana e moda das concentrações inibitórias mínimas, expressos em µg/mL para quatro drogas antifúngicas de isolados de leveduras do gênero *Candida* em pacientes não gestantes, para as duas metodologias utilizadas (CLSI e Etest).

Amostras (n)	Cetoconazol			Fluconazol			Itraconazol			Anfotericina B		
Metodologia	Média	Mediana	Moda	Média	Mediana	Moda	Média	Mediana	Moda	Média	Mediana	Moda
<i>C. albicans</i> (51)												
CLSI	0,025	0,015	0,015	0,245	0,25	0,12	0,029	0,03	0,03	0,097	0,06	0,015
Etest	0,015	0,006	0,006	0,458	0,3	0,25	0,021	0,016	0,012	0,067	0,064	0,047
<i>C. parapsilosis</i> (10)												
CLSI	0,018	0,015	0,015	0,473	0,25	0,12	0,021	0,015	0,015	0,06	0,045	0,12
Etest	0,014	0,014	0,016	0,586	0,5	0,5	0,036	0,014	0,012	0,084	0,047	0,047
<i>C. tropicalis</i> (4)												
CLSI	0,015	0,015	0,015	0,248	0,185	0,12	0,038	0,038	0,015	0,12	0,12	0,12
Etest	0,008	0,006	0,006	0,361	0,285	-	0,031	0,028	0,023	0,089	0,071	-
<i>C. glabrata</i> (3)												
CLSI	0,108	0,06	-	1,413	0,12	0,012	0,108	0,06	-	0,098	0,03	-
Etest	0,089	0,012	-	5,5	0,25	0,25	0,196	0,064	-	0,179	0,094	-
<i>C. krusei</i> (2)												
CLSI	0,53	0,53	-	33	33	-	0,25	0,25	0,25	0,258	0,258	-
Etest	0,262	0,262	-	16,75	16,75	-	0,25	0,25	-	0,032	0,032	-

6. DISCUSSÃO

A candidíase é apontada, entre as vulvovaginites, como a causa mais frequente em mulheres, especialmente as que se encontram em idade fértil. Este quadro afeta milhões de pacientes em todo o mundo, e estima-se que praticamente 75% das mulheres poderão apresentar pelo menos um episódio de vulvovaginite por leveduras do gênero *Candida* ao longo de suas vidas, sendo que destas 40 a 50% vivenciam novos surtos e 5% tornam-se recorrentes (Adad et al., 2001; Moreira & Paula, 2006). Além disso, não é incomum o isolamento destas leveduras a partir de secreções vaginais em mulheres assintomáticas. Estimativas refletem que 20 a 25% de mulheres em pré-menopausa assintomáticas apresentem cultivo positivo para leveduras do gênero *Candida* na vagina (Ziarrusta, 2002).

Na literatura, vários relatos apontam um aumento referente às espécies não-albicans e aparecimento de episódios de repetição, muitas vezes associados ao fracasso terapêutico.

No entanto, vale ressaltar ainda a escassez de dados no que tange a estudos realizados no Brasil em relação àqueles em outros países, especialmente europeus.

Por este motivo, torna-se necessário conhecer melhor, a partir de uma casuística maior, populações de leveduras do gênero *Candida*, associadas a quadros de vulvovaginites, no que tange à identificação das espécies. Consideramos relevante também estimar a prevalência, e determinar a susceptibilidade às drogas antifúngicas *in vitro*, incluindo as mais utilizadas na prática médica.

Em Mato Grosso, este estudo representa o marco inicial, e os resultados obtidos apontam perspectivas referentes ao conhecimento de espécies envolvidas nos quadros de vulvovaginites por leveduras do gênero *Candida*, em pacientes gestantes e não gestantes atendidas no ambulatório de ginecologia/obstetrícia do Hospital Geral Universitário de Cuiabá.

A partir de um total de 404 pacientes (203 não gestantes e 201 gestantes) foram isoladas 160 leveduras do gênero *Candida*, correspondendo a 70 (34,5%) as pacientes não gestantes e 90 (44,8%) as gestantes.

A técnica de CHROMagar foi utilizada para avaliar a pureza das colônias isoladas, inicialmente, a partir das secreções vaginais, seguindo a identificação de colônias puras. A espécie *C. albicans* foi mais prevalente correspondendo a 51 (72,9%) no grupo de pacientes não gestantes. Aleixo Neto et al (1999), avaliando apenas 72 mulheres não gestantes apresentando ou não queixas específicas relataram encontrar a presença de leveduras do gênero *Candida* em 18 (25%) casos. Destes, a espécie *C. albicans* foi a mais prevalente (77,8%) e consequentemente 22,2% foram caracterizadas como não-albicans.

Já em relação às espécies não albicans encontradas em nosso estudo, ainda considerando as pacientes não gestantes, foram identificadas 10 (14,3%) como *C. parapsilosis*, 4

(4,3%) como *C. tropicalis*, 3 (2,8%) como *C. glabrata* e 2 (2,8%) como *C. krusei*. Estes achados contrastam com os publicados por Aleixo Neto et al. (1999), apontando a *C. glabrata* como a mais prevalente (16,7%), seguida por *C. parapsilosis* (5,6%). Galle & Gianini (2004) avaliaram 250 mulheres, porém sem observância aos sintomas apresentados pelas mesmas. Deste total, foram colhidas secreções vaginais, e 69 (27,%) apresentaram culturas positivas para leveduras do gênero *Candida*. A espécie mais frequente foi *C. albicans* (74%), seguida por *C. glabrata* (14,5%), *C. tropicalis* 5 (7,2%) e por ultimo *C. parapsilosis* 3 (4,3%). Estes valores exibem concordância com os relatos de Aleixo Neto et al (1999), e discordância em relação aos nossos achados, onde *C. glabrata* sucede tanto *C. parapsilosis* como *C. tropicalis*.

Dados mais recentes, publicados por Ferraza et al (2005), obtidos a partir do estudo de 227 mulheres (sendo 130 procedentes de Santa Catarina e 97 do estado do Paraná), registraram o isolamento de leveduras do gênero *Candida* em cultura em relação as 130 pacientes catarinenses, em apenas 31 (23,8%) pacientes, correspondendo a 6 sintomáticas e 25 assintomáticas. Em 77,4% dos casos positivos foi isolada *C. albicans* (24/31), seguida de espécies não albicans, obedecendo a seguinte distribuição: *C. glabrata*, 4 (13%), *C. guilliermondii* 2 (6,4%) e apenas 1 (3,2%) *C. parapsilosis*. Já em relação ao outro grupo representado por 97 mulheres paranaenses, foram observadas culturas positivas para 24 pacientes (24,7%), das quais 15 foram assintomáticas e 9 sintomáticas. Em 50% dos casos positivos foram isoladas *C. albicans* (12/24). Em relação às espécies não-albicans, foi observada a distribuição seguinte: 20,8% para *C. guilliermondii* (5/24), 8,3% *Rhodotorula* sp (2/24), 8,3% *C. lusitaniae*, 4,2% *C. tropicalis* (1/24), 4,2% *Trichosporon asahii* (1/24) e 4,2% *C. glabrata* (1/24). Vale ressaltar que a população de estudo foi subdividida em dois grupos (pacientes sintomáticas e assintomáticas), exatamente como realizado em nosso trabalho, obedecendo ao critério estabelecido por Lopes Consolaro et al (2004).

Estes autores relatam estudo avaliando 161 pacientes, destacando positividade de culturas com isolamento de leveduras do gênero *Candida* em 35 pacientes (21,7%). A espécie *C. albicans* foi isolada em 60% (21/35) dos casos. O percentual referente às espécies não-albicans foi assim descrito: 27,5% (9/35) *C. glabrata*, 5,7% (2/35) *Sacharomyces cerevisiae* e 2,9% (1/35) *Trichosporon* sp. Segundo dados publicados por Lopes Consolaro et al (2004), a espécie *C. albicans* foi mais frequente entre as pacientes sintomáticas, enquanto que as não-albicans foram mais frequentes entre as assintomáticas. Os autores sugerem que proporcionalmente o isolamento de *C. albicans* aumenta de acordo com a severidade do quadro de vulvovaginite, enquanto que o oposto ocorre em se tratando das espécies não-albicans.

Corsello et al (2003) sugerem que a distribuição de espécies na vagina pode ser variável e consideram diferenças metodológicas, as responsáveis por tais discordâncias.

Quando analisamos os resultados encontrados em nosso estudo nas pacientes gestantes, observamos que de um total de 90 leveduras do gênero *Candida* isoladas, 83 (92,3%) foram identificadas como *C. albicans*, 3 (3,3%) como *C. krusei*, 2 (2,2%) como *C. glabrata*, 1 (1,1%) como *C. parapsilosis* e 1 (1,1%) como *C. tropicalis*.

Alguns trabalhos já foram realizados no sentido de estabelecer a prevalência e fatores de risco associados às infecções cérvico vaginais durante a gestação. Vale destacar a contribuição, em relação a este aspecto, publicada por Simões et al (1996), os quais realizaram um estudo tipo corte transversal de 328 pacientes gestantes acompanhadas no ambulatório de pré-natal do departamento de Tocoginecologia da FCM/UNICAMP, no período compreendido entre outubro de 1991 a fevereiro de 1993. No entanto, o diagnóstico de candidíase realizado neste trabalho, baseou-se apenas nos achados de bacterioscopia da secreção vaginal, sem realização de cultura e, por conseguinte, identificação de espécies. A prevalência total de infecção foi de (40,6%), sendo: candidíase vaginal (19,3%), vaginose bacteriana (9,5%), alteração da microbiota vaginal (6,7%), cervicite por *Chlamydia trachomatis* (2,1%) e infecção pelo Papiloma Vírus Humano (0,9%).

Consideramos muito importante a realização da cultura para fungos em se tratando de secreções vaginais, pois a partir da levedura isolada torna-se possível a identificação da espécie e, posteriormente a realização dos testes de susceptibilidade *in vitro* às drogas antifúngicas. Além disso, a detecção de candidíase vulvovaginal seria otimizada, reunindo os métodos de bacterioscopia e cultura refletindo maior sensibilidade para estimar a prevalência.

Bauters et al (2002), avaliaram 612 pacientes, apresentando ou não queixas de vaginite. As mulheres foram subdivididas em dois grupos, de acordo com o critério pré ou pós menopausa. No primeiro grupo, foram incluídas as pacientes que usavam contraceptivos orais (n=111), gestantes (n=103), pacientes que utilizavam dispositivo intra-uterino (n=57), e pacientes que apresentavam ciclo regular, e não realizavam tratamento hormonal (n=114). O segundo grupo incluiu pacientes em pós-menopausa, as quais estavam recebendo terapia hormonal de reposição (n=108) e um grupo controle sem uso de terapia hormonal (n=119).

Uma das técnicas metodológicas utilizadas por estes autores, difere daquela que empregamos em nosso estudo, pois as espécies de leveduras do gênero *Candida* foram identificadas a partir da realização de kits comerciais fundamentados na assimilação de açúcares (API 20 C AUX; biomériuex Vitek). Duas provas foram executadas por Bauters et al (2002), de

maneira idêntica à realizada em nosso estudo (prova do tubo germinativo, características micromorfológicas avaliadas em ágar-fubá).

Considerando as pacientes gestantes (n=103), foi observado um total de 33 (32%) casos positivos no que se refere ao isolamento de leveduras do gênero *Candida*, superando os cinco outros grupos: uso de contraceptivos orais, com 16 (14,4%) casos positivos; uso de dispositivo intra-uterino 8 (14%), mulheres com ciclo regular 22 (19,3%); mulheres realizando reposição hormonal 29 (26,9%), e controle 15 (12,6%). Ainda no grupo de gestantes, foi observado que a taxa de colonização aumentou em relação à duração da gestação de 14,3% (n=21) no primeiro trimestre para 38,3% (n=50) no terceiro trimestre (p=0,05).

Há relatos publicados por Mendes et al (2002) no que tange à prevalência e distribuição de espécies de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV positivas gestantes. Os autores estudaram 205 gestantes, não necessariamente exibindo sinais e sintomas de vaginite, porém, concomitância entre infecção pelo vírus HIV e gestação. Além do exame direto, pelo método da potassa (KOH – 10%), foram realizadas culturas em Sabouraud dextrose ágar. Como em nosso estudo, o meio de CHROMagar foi utilizado para conferir a pureza das colônias. 164 gestantes com infecção pelo HIV, foram identificadas com candidíase vulvovaginal através do exame direto, destas 90 (54,9%) apresentaram positividade em cultura. Das culturas positivas, a espécie *C. albicans* representou 83,5%, seguida por *C. glabrata* (10,6%), *C. krusei* (3,5%) e por último *C. tropicalis* (2,4%). Nossos achados concordam em relação à maior prevalência de *C. albicans*, porém diferem em número no que se refere às espécies não *albicans*. Diferenças quanto à distribuição das espécies de leveduras do gênero *Candida*, podem estar relacionadas às diferenças quanto a colonização em gestantes HIV soro positivas, todavia não foi observada por Mendes et al (2002) correlação direta entre o estágio da infecção pelo HIV (CD4 < 200 células / mm³) e culturas positivas.

No entanto, dados obtidos a partir de mulheres não gestantes infectadas pelo HIV, em relação àqueles obtidos a partir de gestante HIV soro positivas indicam que a colonização vaginal e vaginites sintomáticas refletem alterações na imunidade sistêmica. Estudos realizados inferem sobre o papel do sistema imune no processo facilitador da colonização por leveduras do gênero *Candida*, e subsequente, vaginite em mulheres HIV negativas não é capazes de explicar a predisposição à infecção. Desta forma, o efeito específico do sistema imune em predispor a infecção por leveduras do gênero *Candida*, durante a gestação, permanece não muito bem esclarecido.

Mais recentemente, Namkinga et al (2005), realizaram a identificação de espécies de leveduras do gênero *Candida* em mulheres gestantes procedentes da Tanzânia. Eles avaliaram

mulheres de 13 a 45 anos de idade, em um período compreendido entre março de 1998 a dezembro de 2000. Foram identificados 272 isolados, utilizando o sistema API Candida, apontando a seguinte distribuição: *Candida albicans* 180 (66,2%), *Candida tropicalis* 13 (4,7%), *Candida glabrata* 20 (7,35%), *Candida famata* 6 (2,2%), *Candida parapsilosis* 6 (2,2%) e *Candida lusitanae* 1 (0,37%). A identificação pelo sistema API Candida não conseguiu especificar 43 isolados. O sistema API 20 C AUX foi utilizado para identificar 29 isolados exibindo os resultados seguintes: 11/29 (37,9%) *C. albicans*, 1/29 (3,4%) *C. tropicalis*, 4/29 (13,8%) *C. glabrata*, 1/29 (3,4%) *C. lusitanae*, 1/29 (3,4%) *C. colliculosa* / *C. magnoliae*, 5/29 (17,2%) *C. albicans* / *C. tropicalis*, 2/29 (6,8%) *C. norvegensis* / *C. parapsilosis* e 2/29 (6,8%) *C. krusei* / *C. inconspicua*. Em concordância com os dados obtidos em nosso estudo, a espécie mais prevalente no grupo de gestantes avaliados por Namkinga et al (2005), foi *C. albicans* (66,2%), porém um considerável percentual (33,7%) foi atribuído às espécies não-albicans, discordando do baixo valor encontrado em nosso trabalho (7,7%).

Fevi Waboso & Amadi (2001) avaliaram 1005 mulheres gestantes relatando prevalência de 42,9% em relação à candidíase vaginal. As mulheres foram consideradas assintomáticas, e o método de detecção de leveduras do gênero *Candida* foi a microscopia a partir da secreção vaginal. Já Ashraf et al (2001), realizaram estudo, objetivando determinar a correlação entre sintomas de vaginite com candidíase e prevalência de *Candida albicans* em gestantes. De um total de 262 mulheres, a partir do isolamento de leveduras em cultura, em 74 casos, foi observada positividade para *C. albicans*.

Em relação às espécies não-albicans, Wenjin & Yifu (2006), avaliando uma população de 628 gestantes, detectaram um total de 50 isolados de *Candida glabrata*. Desta forma, a prevalência de *C. glabrata* durante a gestação foi igual a 7,96% (50/628). Estes autores utilizaram a técnica de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) com o objetivo de comparar genótipos de *C. glabrata* a partir de mulheres com ou sem sintomas. A partir dos resultados obtidos, eles concluem que os isolados de *C. glabrata* (pacientes assintomáticas), obtidos naquelas incluídas no primeiro trimestre, apresentam maior similaridade genotípica. Os resultados mostram ainda que, os genótipos apresentam similaridades, porém não são idênticos.

Na Jamaica, Kamara et al (2000) avaliaram 269 mulheres gestantes, reportando uma prevalência de 30,7% para candidíase, valor superado apenas por vaginose bacteriana (44,1%).

Aboyeji & Nwabuisi (2004) estudaram um grupo de mulheres (n= 230), na Nigéria no período compreendido entre janeiro a dezembro do ano de 2000, com o objetivo de determinar a prevalência de agentes etiológicos comuns, associados à doença sexualmente transmissível. Em 114 mulheres, vários agentes/causas foram detectados, incluindo *Candida* spp

(37,8%), *Trichomonas vaginalis* (4,7%), *Gardnerella vaginalis* (3,9%), sífilis (1,7%) e *Neisseria gonorrhea* (1,3%).

De forma geral, os trabalhos na literatura mostram proximidade aos valores encontrados em nosso estudo (detecção de 44,8% de leveduras do gênero *Candida* em pacientes gestantes, n=90), oscilando entre 28 a 66 %, variando com a população analisada (n), e com os percentuais encontrados para as espécies não-albicans quando a identificação foi realizada.

A prevalência de *C. albicans* em relação às outras espécies é descrita em vários relatos (Namkinga et al, 2005, Us & Cengiz, 2006, Garcia Heredia et al, 2006).

Recentemente, Garcia Heredia et al (2006) avaliaram 493 pacientes em Buenos Aires, no período compreendido entre dezembro de 1998 e fevereiro de 2000, e encontraram uma prevalência total de *Candida* spp igual a 28%. A distribuição entre as espécies foi: *C. albicans* (90,4%), *C. glabrata* (6,3%), *C. parapsilosis* (1,1%), *C. kefyr* (1,1%), e espécies não identificadas (1,1%).

O percentual encontrado para a espécie *C. albicans* (90,4%) no trabalho publicado por Garcia Heredia et al (2006), foi próximo ao encontrado em nosso estudo (92,3%) em pacientes gestantes.

Entretanto, os dados obtidos por Us & Cengiz (2006) estudando uma população de 218 mulheres gestantes, apresentando sinais e sintomas de candidíase vulvovaginal, apontaram o percentual de 53,2% para a espécie *C. albicans*, refletindo valor bastante inferior ao nosso achado. Estes autores encontraram a seguinte distribuição para as espécies não-albicans: *C. glabrata* (28,5%), *C. tropicalis* (11,6%) e (6,4%) *C. krusei*, correspondendo a sequência e percentuais diferentes dos obtidos em nosso trabalho.

Nos últimos anos têm sido observadas mudanças epidemiológicas atribuídas em muitos casos às práticas terapêuticas empregadas. Neste contexto, vem sendo destacado o aparecimento de cepas que tem desenvolvido resistência secundária aos antifúngicos e a substituição de algumas espécies susceptíveis por outras resistentes (Cuenca-Estrella & Rodriguez Tudella, 2002).

Esforços também têm sido realizados no sentido de padronizar técnicas para detecção de resistências *in vitro*, as quais possam exibir certa correlação com a evolução clínica dos pacientes. Atualmente, o CLSI recomenda a utilização dos documentos aprovados para realização dos testes de susceptibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas com leveduras (documento M27 A2, 2005), e com fungos micelianos (documento M 38 A).

Segundo Espinel-Ingroff (1992), os testes de susceptibilidade com agentes antifúngicos, em geral e especialmente, com os azólicos para as leveduras são largamente influenciados pela composição do meio, tempo de incubação e tamanho do inóculo.

É consenso na literatura que os métodos de referência aprovados pelo CLSI apresentam dificuldades técnicas quanto a sua realização em laboratórios de rotina, devidos a peculiaridades metodológicas. Entretanto, métodos comercialmente disponíveis tais como o Etest, dentre outros, têm exibido boa correlação com aqueles considerados referência (Ballesté et al, 2006).

Vários trabalhos publicados têm empregado testes de susceptibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas e leveduras do gênero *Candida* isoladas de quadros de vulvovaginite primários ou recidivantes. Assim sendo, Czaika et al (2000) obtiveram 55 isolados a partir de 40 pacientes, apresentando candidíase recidivante crônica. A espécie *C. glabrata* foi a mais prevalente, e os valores médios de CIM foram iguais a 32 µg/mL para o fluconazol, 1 µg/mL para o itraconazol, 1 µg/mL para o cetoconazol, 0,5 µg/mL para a anfotericina B, 0,03 µg/mL para o voriconazol, 128 µg/mL para a terbinafina, 4 µg/mL para a ciclopiroxolamina, 0,03 µg/mL para a 5-fluorocitosina. De acordo com os valores obtidos, os autores inferiram que a terapia preconizada com baixas doses de fluconazol é sempre ineficaz na candidíase vaginal recorrente, e induz resistência secundária. Por outro lado, em relação às outras drogas avaliadas, foi observada elevada susceptibilidade, especialmente para o voriconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina considerando a espécie *C. glabrata*. Em nosso estudo, foram identificados nas pacientes não gestantes, três isolados como *C. glabrata*, e nas gestantes apenas dois. O perfil de susceptibilidade verificado em nosso trabalho para as drogas avaliadas (cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B) revela susceptibilidade dos isolados às drogas testadas obtido a partir da utilização de metodologia de referência (microdiluição em placa – CLSI). Ainda, em relação à espécie *C. glabrata*, a partir do emprego do Etest, observou-se da mesma forma, elevada susceptibilidade *in vitro* às drogas testadas. Para os isolados, obtidos a partir de pacientes gestantes, foi observada também elevada susceptibilidade *in vitro* pelas duas metodologias empregadas (CLSI e Etest).

Andreu et al (2001) determinaram a prevalência de espécies em 68 isolados de leveduras do gênero *Candida* e as concentrações inibitórias mínimas empregando a nistatina, uma das drogas mais empregadas no tratamento da candidíase vulvovaginal. A partir dos dados obtidos, eles inferiram que os valores baixos de CIM refletem que o fracasso terapêutico pode não ser inerente a emergência de cepas resistentes. *Candida albicans* representou 75% do total das espécies identificadas, seguida de *C. parapsilosis*, *C. krusei*, e *C. glabrata*. Consideramos

um restrito número de isolados avaliados por Andreu et al (2001), para que tal inferência possa ser apontada, além de considerarmos importantes as questões levantadas por Cuenca-Estrella & Rodriguez-Tudella (2002) no que se refere aos pontos de corte estabelecidos. Apenas para algumas situações clínicas, através de estudos randomizados (Clancy & Nguyen, 1999; Rex et al, 1998) foi possível o estabelecimento de pontos de corte, os quais podem predizer uma boa correlação entre susceptibilidade *in vitro* e resposta terapêutica.

Ainda Candido et al (1999), utilizando a metodologia comercialmente disponível (Etest), avaliaram a prevalência e distribuição de espécies de leveduras do gênero *Candida* nos sítios anatômicos vagina e ânus, a partir de 80 pacientes adultas na faixa etária entre 18 a 59 anos. Os autores obtiveram um percentual relativamente baixo (21,2%) no que se refere à recuperação das leveduras a partir das 80 pacientes avaliadas. Eles detectaram resistência *in vitro* para o cetoconazol e itraconazol, porém susceptibilidade ao fluconazol. Com relação ao cetoconazol para a espécie *C. albicans* foi observado que 79% dos isolados foram susceptíveis, diferindo dos nossos resultados que revelaram 100% de susceptibilidade para os 51 isolados de *C. albicans* do grupo de não gestantes testados pelas metodologias do Etest e CLSI. Em relação às espécies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, Candido et al (1999), mostraram valores de CIM refletindo maior susceptibilidade em relação àquela detectada para *C. albicans*. Para estas espécies, nas pacientes não gestantes, nossos resultados sugerem 100% de susceptibilidade para 10 isolados de *C. parapsilosis*, quatro de *C. tropicalis* e dois de *C. krusei*. Já para o fluconazol, segundo dados publicados por Candido et al (1999), a espécie *C. krusei* apresentou valores de CIM compreendidos entre 32 a 48 µg/mL, valores considerados altos, porém não significando resistência *in vitro* ($\geq 64\mu\text{g/mL}$), em contraste com nossos achados, mostrando que dos dois isolados avaliados, um apresentou-se resistente com o emprego da metodologia do CLSI, e o outro mostrou-se susceptível dose-dependente pela metodologia do Etest, sem apresentar correlação entre ambas as metodologias.

Bauters et al (2002) determinaram a prevalência da colonização vaginal por leveduras do gênero *Candida* utilizando como método de confirmação para identificação dos isolados a prova do tubo germinativo, micromorfologia em ágar-fubá acrescido de Tween 80, e testes de assimilação de açúcares (API20 C AUX, biomérieux Vitek). De um total de 612 pacientes, leveduras foram recuperadas a partir de 123 swabs correspondendo a 20,1%. O total de pacientes foi subdividido em dois grupos, correspondendo 65 àquelas sintomáticas, das quais 60% (39/65) apresentaram exames diretos (método do KOH) positivos, e 40% (26/65) exibiram resultados negativos. Leveduras foram recuperadas em 89,7% (35/39) naquelas mulheres que apresentaram sintomas de vulvovaginite. Das 547 pacientes assintomáticas, foi demonstrada a

colonização em 81 pacientes. A espécie *C. albicans* foi a mais isolada (68,3%), seguida de *C. glabrata* (16,3%), *C. parapsilosis* (8,9%), *C. humicola* (1,6%), *C. krusei* (0,8%) e *C. lusitaniae* (0,8%). Outros isolados incluíram espécies do gênero *Rhodotorula* (2,4%) e *S. cerevisiae* (0,8%). *C. albicans* foi predominante em mulheres em pré-menopausa (65,9%) e pós-menopausa (73,2%) seguida por *C. glabrata* (18,3% e 12,2% respectivamente) e *C. parapsilosis* (8,5% e 9,8% respectivamente). Os resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro* também realizados por Bauters et al (2002), pela metodologia do NCCLS mostraram que 72,4% dos isolados foram susceptíveis (n=89), embora susceptibilidade dose-dependente tenha sido observada para 6,5% dos isolados (n=6) e resistência em 21,1% dos isolados (n=26) respectivamente.

Em nosso estudo, as pacientes não foram subdivididas em grupos, obedecendo a fases do ciclo hormonal (pré-menopausa, pós-menopausa) ou ainda àquelas realizando reposição hormonal, sendo portanto não recomendada a comparação em relação à distribuição de espécies encontrada por Bauters et al (2002), com aquela encontrada em nosso estudo.

Entretanto, com relação à susceptibilidade ao fluconazol, para as pacientes gestantes, não detectamos resistência através das duas metodologias utilizadas (CLSI e Etest) considerando os 90 isolados avaliados. Já para as pacientes não gestantes (n=70), como anteriormente mencionado, apenas dois isolados de *C. krusei* não se mostraram susceptíveis, sendo que um exibiu valor de CIM compatível com resistência pela metodologia do CLSI e o outro se mostrou susceptível-dose-dependente, quando utilizamos a metodologia comercial (Etest). Bauters et al (2002) relataram que foram reavaliados 18 dos 19 isolados considerados resistentes pela metodologia do NCCLS, pela metodologia do EUCAST e do Etest. Destes, oito isolados foram susceptíveis considerando o método EUCAST e dois deles foram susceptíveis no método do Etest; entretanto 11 isolados não foram reavaliados, pois foram perdidos.

De forma geral, em nosso estudo foi notável a concordância em relação à susceptibilidade, susceptibilidade-dose-dependência e resistência, quando comparamos as duas metodologias, ressaltando a importância da leitura do teste, devido ao crescimento residual das colônias quando empregamos a metodologia do Etest. Por outro lado, os valores obtidos pelo método do CLSI, obtidos em leitor de ELISA, são importantes no que se refere à eliminação da subjetividade imposta pela leitura visual dos testes.

Pádua et al (2003) avaliaram 412 mulheres com o objetivo de determinar a colonização vaginal por leveduras e a susceptibilidade *in vitro* ao fluconazol, nistatina e anfotericina B.

A frequência de colonização detectada por estes autores foi igual a 20,15%, sendo possível investigar a susceptibilidade *in vitro* em 83 isolados de leveduras. Das 83 pacientes

colonizadas por leveduras na mucosa vaginal, 84% delas tiveram culturas positivas para *C. albicans*, valor próximo ao encontrado em nosso estudo, para o grupo de não gestantes (86,3%) e gestantes (85,5%) quando consideramos mulheres sintomáticas.

Em relação à susceptibilidade *in vitro*, nossos achados também são próximos quando comparamos os valores encontrados para o fluconazol por Pádua et al (2003), apontando apenas um isolado como resistente (1,5%) dos 69 isolados identificados como *C. albicans*. De dois isolados identificados como *Torulopsis* sp, apenas 1 (50%) foi considerado susceptível dose-dependente e finalmente de dois isolados identificados como *C. parapsilosis*, apenas 1 (50%) foi considerado resistente. Para a anfotericina B, dos 69 isolados de *C. albicans*, apenas 1 (1,5%) foi considerado resistente por Pádua et al (2003). Vale ressaltar que não detectamos resistência *in vitro* para a anfotericina B, para nenhuma das espécies avaliadas em nosso trabalho, considerando as duas metodologias empregadas (CLSI e Etest).

Apesar de a nistatina ser bastante utilizada no Brasil para o tratamento de candidíase vulvovaginal, não realizamos testes *in vitro* com este antifúngico em nosso estudo, porém Pádua et al (2003), detectaram 29% de amostras susceptíveis-dose-dependentes, sugerindo limitações ao emprego da droga para o seu emprego em vulvovaginites por leveduras do gênero *Candida*.

O estudo multicêntrico de Sobel et al (2003) avaliou 556 mulheres apresentando candidíase vulvovaginal. De 393 isolados de *C. albicans*, 377 (96%) foram bastante susceptíveis ao fluconazol, dados próximos aos obtidos em nosso trabalho, evidenciando (100%) de susceptibilidade para os isolados de *C. albicans* nas pacientes não gestantes e gestantes. Entretanto, Sobel et al (2003) detectaram em 14 (3,6%) isolados de *C. albicans* valores de CIM iguais ou superiores a 64 µg/mL revelando resistência.

Vale a pena ressaltar que estes autores realizaram os testes de susceptibilidade após o décimo quarto dia do seguimento terapêutico com fluconazol. Desta forma, 73 isolados foram obtidos após término do tratamento, a partir de pacientes que apresentaram fracasso terapêutico e presença de achados micológicos. Esta análise revelou apenas 4 (5,5%) isolados resistentes e um mostrou-se susceptível dose-dependente. Os 68 restantes permaneceram susceptíveis. Ainda, estes autores obtiveram isolados de *C. albicans* a partir de 101 pacientes no trigésimo quinto dia pós-seguimento terapêutico, sendo que algumas pacientes haviam se tornado sintomáticas, porém, a maioria mostrava-se assintomática. Dentre os 101 isolados, três exibiram resistência ao fluconazol. Não foram detectados isolados susceptíveis dose-dependentes. Considerando os 98 isolados, foram observados valores de CIM menores que 1µg/mL em 96 deles, indicando que as recidivas clínicas e micológicas ocorrem em pacientes infectadas com isolados altamente susceptíveis ao fluconazol. Com relação aos isolados de *C. glabrata*, de um total de 44, 2 (4,5%)

foram resistentes ao fluconazol ($\text{CIM} \geq 64\mu\text{g/mL}$), segundo Sobel et al (2003). Para nenhum dos isolados foram encontrados valores de CIM entre 16 a $32\mu\text{g/mL}$, e para 42 (95%) de 44 foram encontrados valores $\leq 8\mu\text{g/mL}$ e portanto considerados susceptíveis. Em nosso estudo, detectamos susceptibilidade para o fluconazol, utilizando ambas as metodologias para os dois isolados de *C. glabrata* de pacientes gestantes. No entanto, para as não gestantes, de três isolados (*C. glabrata*) avaliados, um apenas mostrou-se susceptível dose-dependente ao fluconazol, quando empregada à metodologia do Etest.

Na literatura, encontramos trabalhos avaliando melhor a susceptibilidade de isolados sanguíneos de leveduras do gênero *Candida*, porém informações similares em relação a estes microrganismos em casos de vaginite sintomática são ainda escassas.

Houang et al (1990), realizaram a mensuração dos níveis de fluconazol em secreções vaginais de pacientes que receberam dose única deste antifúngico igual a 150mg/mL . O pico de concentração de fluconazol nas secreções raramente excedeu $2,0\mu\text{g/mL}$. Desta forma, no trabalho publicado por Sobel et al (2003), os autores correlacionaram a resposta terapêutica ao fluconazol utilizando valores de $\text{CIM} \leq 1\mu\text{g/mL}$ como susceptíveis.

De acordo com Sobel et al (2003), não deve ser recomendada à realização dos testes de susceptibilidade *in vitro* para todas as pacientes com vaginites severas ou recorrentes por leveduras do gênero *Candida*. Este procedimento estaria justificado apenas em situações de falha terapêutica para episódios individualizados. Vale ressaltar, que os mesmos autores sugerem que quadros de vaginites por leveduras do gênero *Candida*, atribuídos a isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol permanecem incomuns.

Há dúvidas e lacunas ainda quanto ao entendimento de questões tais como: porque mulheres infectadas com isolados bastantes susceptíveis *in vitro* ocasionalmente não respondem clinicamente e, muitas melhoram clinicamente, mas permanecem colonizadas com isolados de *C. albicans* recuperados pós-terapêutica com fluconazol. O mecanismo de ação fungistático dos azólicos pode permear estas considerações. Além disso, leveduras que exibem valores altos de CIM tendem a persistir na mucosa vaginal.

Dados mais recentes obtidos por Ritcher et al (2005) revelam um total de 593 leveduras isoladas a partir de 564 secreções vaginais, com a distribuição seguinte: *C. albicans* (420), *C. glabrata* (112), *C. parapsilosis* (30), *C. krusei* (12), *Sacharomyces cerevisiae* (9), *C. tropicalis* (8), *C. lusitaniae* (1) e um isolado de *Trichosporon*. De 429 mulheres que apresentaram culturas positivas, 84 (19%) tiveram múltiplas culturas positivas (233 isolados) durante o período do estudo. As espécies não albicans foram as mais comumente isoladas a partir

das pacientes que apresentaram múltiplas culturas positivas, e a espécie predominante foi *C. glabrata*.

Quanto à susceptibilidade *in vitro*, referente aos 593 isolados, foi detectada resistência ao fluconazol em apenas 3,7% dos isolados e 3,0% a 5-flucitosina. Já em relação ao itraconazol, resistência foi observada para 16,2% dos isolados. Resistência ao fluconazol foi observada somente entre isolados de *C. glabrata* (15,2%) e *C. krusei* (41,7%). A metodologia empregada foi aquela recomendada pelo NCCLS.

Neste estudo, a espécie mais comumente associada à vulvovaginite por leveduras foi *C. albicans* (76%), seguida por *C. glabrata* (16%). Elevado percentual de espécies não albicans foi encontrado (24%), porém semelhante com aquele registrado em nosso trabalho para as pacientes não gestantes (27,1%).

Vale ressaltar aspectos relativos à imunopatogênese da candidíase vulvovaginal, destacando a possível perturbação na imunidade local da mucosa vaginal, como causa associada a esta infecção fúngica em caráter recorrente.

Tseng et al (2005) recuperaram 102 isolados de leveduras do gênero *Candida* a partir de 182 espécimens clínicos (secreções vaginais). Mais uma vez, a espécie *C. albicans* foi a mais prevalente: 68 (67,3%), seguida de *C. glabrata* 25 (24,7%) dentre as não albicans. Para a susceptibilidade *in vitro*, foi utilizada a metodologia do Etest testando o fluconazol e anfotericina B. Para o fluconazol, foi obtido um percentual igual a 25,7% de isolados resistentes, 10,9% foram considerados susceptíveis dose-dependentes e 63,4% foram susceptíveis. Em relação à *C. albicans*, de um total de 68 isolados 10 (14,7%) foram resistentes ao fluconazol e 3 (4,4%) susceptíveis dose-dependentes. As espécies não albicans foram susceptíveis ao fluconazol em 51,5% e resistentes em 48,5%. Este valor é mais elevado, e considerado discrepante a aqueles encontrados em nosso estudo, revelando ausência de resistência, tanto nas pacientes gestantes, como nas não gestantes, quando empregamos a mesma metodologia. Com relação à anfotericina B, 100% dos isolados foram susceptíveis, exatamente como observado em nosso estudo. Recomendações realizadas por Tseng et al (2005) diferem daquelas propostas por Sobel et al (2003) quanto à realização dos testes de susceptibilidade *in vitro* para pacientes com candidíase recorrente, pois os últimos só sugerem a realização dos mesmos em casos individualizados e não como rotina neste grupo.

De forma geral, consideramos a necessidade da realização de um maior número de estudos epidemiológicos, avaliando não apenas a distribuição das espécies de leveduras do gênero *Candida*, a partir de quadros de vulvovaginites, porém buscando a recuperação dos isolados naquelas pacientes pós-seguimento terapêutico, especialmente com fluconazol.

As variações hormonais podem refletir diferenças quanto à distribuição de espécies.

Considerando os testes de susceptibilidade *in vitro*, o paralelismo evidenciado em nosso estudo entre a metodologia preconizada pelo CLSI e a comercial empregada (Etest), sugere a aplicação dos testes comerciais no laboratório clínico.

Para entender melhor a aquisição de resistência ao fluconazol ou a outro azólico, torna-se necessária à realização de estudos com maior número de dias (seguimento pós-terapêutico). Além disso, o estabelecimento da correlação *in vitro* e resposta clínica não pode ser feito sem buscar associação a parâmetros farmacocinéticos.

Para a leitura dos testes de susceptibilidade, empregando o Etest, recomenda-se cuidado no que refere ao aparecimento do crescimento residual (efeito trailing), levando a leituras muitas vezes incorretas, refletindo modificações no perfil de susceptibilidade detectado *in vitro*.

Já para a identificação de leveduras, a utilização do CHROMagar revela importância para avaliar a pureza das colônias, bem como para identificá-las de forma presuntiva.

A realização de estudos multicêntricos em nosso país poderá permitir o estudo de um número maior de isolados, objetivando conhecer melhor a susceptibilidade dos isolados de leveduras do gênero *Candida* no trato genital feminino, aos derivados azólicos e outras drogas antifúngicas. Para tanto, se torna essencial a realização das provas de susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro*, seguindo as recomendações do CLSI, bem como realizar identificações de microrganismos seguindo metodologia convencional, com a opção de compará-las a outras comercialmente disponíveis, desde que apresentem alto grau de concordância com as de referência.

7. CONCLUSÕES

1. Foram obtidos 160 isolados de leveduras, sendo 70 referentes a pacientes não gestantes e 90 a pacientes gestantes.
2. O meio CHROMagar apresentou boa concordância com a metodologia clássica adotada para identificação das espécies de leveduras.
3. A prevalência total de candidíase vulvovaginal foi igual a 39,6% considerando 404 amostras de secreções vaginais obtidas.
4. A espécie *C. albicans* (72,9%) foi a mais prevalente em pacientes não gestantes, seguida por *C. parapsilosis* (14,3%), *C. tropicalis* (5,7%), *C. glabrata* (4,3%) e *C. krusei* (2,8%).
5. Já em relação às gestantes, foi observada a seguinte distribuição: *C. albicans* (92,3%), seguida por *C. krusei* (3,3%), *C. glabrata* (2,2%), *C. tropicalis* (1,1%) e *C. parapsilosis* (1,1%).
6. As quatro drogas testadas (cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B) apresentaram excelente atividade *in vitro* frente às amostras avaliadas, através das duas metodologias empregadas (CLSI – microdiluição e Etest).
7. Em relação aos valores de CIM, discretas variações foram detectadas no que se refere aos valores referenciados na literatura. Maiores discrepâncias foram observadas em relação à susceptibilidade ao fluconazol, quando quase 100% dos isolados avaliados em nosso estudo, mostraram-se susceptíveis em ambas as metodologias empregadas, em contrapartida a valores elevados citados em alguns trabalhos.
8. As duas metodologias empregadas (CLSI e Etest) exibiram alto grau de concordância, apresentando pequenas variações apenas para isolados de *C. glabrata* e *C. krusei* em pacientes não gestantes e *C. krusei* em gestantes.
9. Considerando a metodologia exequível, na rotina laboratorial, sugerimos o Etest, por apresentar resultados similares à metodologia de referência e praticidade para realização, embora o custo seja elevado. Por outro lado, o CLSI apresenta vantagem no que se refere à leitura dos testes em aparelho de ELISA, alternativa mais confiável em relação à subjetividade imposta pela leitura visual.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB Biodisk. Etest Technical guide 4b: Antifungal susceptibility testing of yeast. Piscataway, New Jersey. AB Biodisk. 1994.

Aboyebi AP, Nwabiusi C. Prevalence of sexually transmitted diseases among pregnant women in Ilorin, Nigeria. *Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2004; **23**: 637-9.

Adad SJ, Lima RV, Sawan ZTE, Silva MLG, Souza MAH, Saldanha JC, et al. Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp and *Gardnerella vaginalis* in cervical – vaginal smears in four different decades. *São Paulo Med. J.* 2001; 119: 200-5.

Aleixo Neto A, Hamdan JS, Souza RC. Prevalência de *Candida* na Flora Vaginal de Mulheres Atendidas num Serviço de Planejamento Familiar. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 1999; **21**: 441-5.

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. *Introductory Mycology*. United States of América: John Wiley & Sons; 1996.

Andreu CMF, Medina YE, González TC, Llanes DM, Sensibilidad in vitro a la nistatina de aislamientos vaginalis de *Candida* spp. *Rev. Cubana Med Trop.* 2001; **53**: 194-8.

Ashraf M, Igbal R, Shabbir I. Colonization of *candida albicans* in pregnant women. *Pakistan J Med Res.* 2001; **40**: 24-6.

Auler ME, Paula CR, Matsumoto FE, Kurata PT, Gandra RF, Rodrigues FFO, et al. Contribuição do biofilme na candidíase vulvovaginal recorrente. *Congresso Brasileiro de Micologia*; 2001; Águas de Lindóia. São Paulo: 2001a. p. 109.

Ballesté R, Arteta Z, Barloco A, Mier C, Fernández N, Mousqués N, et al. Evaluación del desempeño diagnóstico del medio de difusión em agar Etest para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos. *Rev. Med. Urug.* 2006; **22**: 128-35.

Barrett-Bee K, Newbould L, Pinder P. Biochemical changes associated with the antifungal action of the triazole ICI 153.066 on *Candida albicans* and *Trychophyton quinckeanum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991; **79**:127-32.

Bates S. Vaginal discharge. Curr. Obstet. Gynaecol. 2003; **13**: 218-23.

Bauters TGM, Dhont MA, Temmerman MIL, Nelis HJ. Prevalence of vulvovaginal candidiases and susceptibility to fluconazole in women. Am J Obstet Gynecol. 2002; **187**: 569-74.

Biasoli MS, Tosello ME, Bottai H, Cuesta C, Magaró HM. Efecto de la temperatura y el pH em la adherencia de *Candida albicans in vitro*. Rev. Iberoam Micol. 1999; **16**: 46-9.

Bidart H T. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifungica. Rev. Chil. Infectol. 2004; **21**: 13-9.

Bossche HV, Marichal P. Azole antifungals: mode of action. In: Yamaguchi H, Kobayashi GS, Takahashi H, editores. Recent Progress in Antifungal Chemotherapy. New York: Marcel Dekker, INC; 1992. p. 25-40.

Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. Antimicrob. Agents Chemother. 1990; **34**: 183-8.

Campbell MC, Stewart JL. Identification of individual fungal isolates. In: The Medical Mycology Handbook. New York: John Wiley & Sons; 1980. p. 210-348.

Candido RC, Toloí MRT, Franceschini SA, Garcia FR, Minto ECM. In vitro activity of antimycotic agents determined by E-test method against vaginal *Candida* species. Mycopathologia. 1999; **144**: 15-20.

Carrillo Muñoz AJ, Quindós G, Cárdenes GD, Vargas RA, Arévalo P, Brió S, et al. Evaluación del medio Chromalbicans Agar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. Rev. Iberoam Micol. 2001; **18**: 501-8.

Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2002; **51**: 1-77.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghaunoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol. 2001; **183**: 5385-94.

Christiansen KJ, Bernard EM, Gold JW, Armstrong D. Distribution and activity of amphotericin B in humans. J Infect. Dis. 1985; **152**: 1037-43.

Clancy CJ, Nguyen MH. Correlation between in vitro susceptibility determined by E test and response to therapy with amphotericin B: results from a multicenter prospective study of candidemia. Antimicrob Agents Chemother. 1999; **43**: 1289-90.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard (27-A2). 2^a ed. West Valley Road, Wayne, Pennsylvania; 2005.

Colombo AL, Barchiesi F, Mcgough DA, Rinaldi MG. Comparison of E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. 1995; **33**: 535-40.

Conti S, Fanti F, Bertolotti D, Dieci E, Arseni S, Salati A, et al. Personalized antifungal susceptibility testing. J. Antimicrob. Chemother. 1999; **43**: 333-8.

Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. Appl Envir Microbiol. 2002; **68**: 3622-7.

Corsello S, Spinillo A, Osnengo G, Penna C, Guaschino S, Beltrame A, et al. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003; **110**: 66-72.

Costa M, Passos SS, Miranda ATB, Araújo RSC, Silva MRR, Paula CR. Correlation of “in vitro” itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis. Mycopathologia. 2001; **157**: 43-7.

Cuenca-Estrela M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Mellado E, Warnock DW, et al. Comparative Evaluation on NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures

for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; **46**: 3644-7.

Cuenca-Estrela M, Rodriguez-Tudella JL. Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? Rev Iberoam Micol. 2002; **19**: 133-8.

Czaika V, Tietz HJ, Schmabreck A, Sterry W, Schultze W. Antifungal susceptibility testing in chronically recurrent vaginal candidosis as basis for effective therapy. Mycoses. 2000; **43**: 45-50.

Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Hanzen KC, Martinez-Suares JV, Scalise G. Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. Med. Mycol. 1998; **36**: 68-78.

Espinel-Ingroff A, Kerkerling TM, Fromtling RA, Bartizal K, Galgiani JN, Villareal K, et al. A collaborative of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. J. Clin. Microbiol. 1992; **30**: 3138-45.

Espinel-Ingroff A, Pfaller MA. Antifungal agents and susceptibility testing. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM PRESS; 1995. p.1405-14.

Ferracin I, Oliveira RMW. Corrimento Vaginal: Causa, Diagnóstico e Tratamento Farmacológico. Infarma. 2005; **17**: 82-6.

Ferrari TCA, Hamdan JS. Drogas antifúngicas. In: Rocha MOC, Pedroso ERP, Fonseca JGM, Silva AO, editores. Terapêutica Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p. 251-66.

Ferrazza MSHS, Maluf MLF, Lopes Consolaro ME, Shinobu CS, Svidzinski TIE, Batista MR. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 2005; **27**: 58-63.

Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. Int. J. Gynecol. Obstet. 2000; **71**: 21-7.

Fevi-Walboso PA, Amadi AN. The Prevalence and Pattern of Vaginal Candidiasis in Pregnancy in Alba. Jnl of Medica Investigation and Practice. 2001; **2**: 25-7.

Fidel PL. Distinct Protective Host Defenses Against Oral and Vaginal Candidiasis. Med. Mycol. 2002; **40**: 359-75.

Fidel PL, Sobel JD. Protective immunity in experimental *Candida* vaginitis. Rev Immunol. 1998; **149**: 361-73.

Filippin FB, Souza LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. Rev. Bras. Cienc. Farm. 2006; **42**: 167-94.

Fotedar R, Al-Hedaithy SSA. Identification chlamydospore-negative *Candida albicans* using CHROMagar Candida medium. Mycoses. 2002; **46**: 96-103.

Franzot SP, Hamdan JS. Effects of three azole derivatives on the lipids of different strains of *Cryptococcus neoformans*. Mycoses. 1995; **38**: 183-9.

Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bartizal KF, Bartlett MS. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeast. Antimicrob Agents Chemother. 1993; **37**: 39-45.

Galgiani JN, Stevens DA. Antimicrobial Susceptibility Testing of yeast: a Turbidimetric Technique Independent of Inoculum Size. Antimicrob Agents Chemother. 1976; **10**: 721-6.

Galle LC, Gianinni MJSM. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2004; **40**: 229-36.

Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. Rev. Infect. Dis. 1990; **12**: 308-29.

Garcia Heredia M, Garcia SD, Copolillo EF, Cora Eliseth M, Barata AD, Vay CA, et al. Prevalence of vaginal candidiasis in pregnant women. Identification of yeasts and susceptibility to antifungal agents. Rev Argent Microbiol. 2006; **38**: 9-12.

Gupta AK, Kohli, Sauder DN, Shear NH. Antifungal agents: an overview. J. Am. Acad. Dermatol. 1994a; **30**(Pt 1): 677-98.

Gupta AK, Kohli, Sauder DN, Shear NH. Antifungal agents: an overview. J. Am. Acad. Dermatol. 1994b; **30**(Pt 2): 911-33.

Hamdan JS, Hahn RC. Antifungal drugs for systemic: an overview of mechanism of action and resistance. Curr Med Chem - Anti-Infective Agents. 2006; **5**: 403-12.

Halbe HW. Tratado de ginecologia. 3ª ed. São Paulo: Roca; 2000.

Houang ET, Chappatte O, Byrne D, Macrae PV, Thorpe JE. Fluconazole levels in plasma and vaginal secretions of patients after a 150-milligram single oral dose and rate of eradication of infection in vaginal candidíases. Antimicrob. Agents Chemother. 1990; **34**: 909-10.

Hurley R. Recurrent *Candida* infection. Clin. Obstet Gynecol. 1981; **8**: 209-13.

Jovanovic R, Congema E, Nguyen HT. Antifungal Agents vs Boric Acid for Treating Chronic Mycotic Vulvovaginitis. J. Repro. Med. 1991; **36**: 593-7.

Kamara P, Hylon-Kong T, Brathwaite A, Del Rosario GR, Kristenses S, Patrick N, et al. Vaginal infections in pregnant women in Jamaica: prevalence and risk factors. Int J STD AIDS. 2000; **11**(8): 516-20.

Kent HT, Epidemiology of vaginitis. Am J Obstet Gynecol. 1991; **165**: 1168-75.

Kerridge D. Mode of action clinically important antifungal drugs. Adv. Microbial Physiol. 1986; **27**: 1-72.

Kokjohn K, Bradley M, Griffiths B, Ghannoum M. Evaluation of *in vitro* activity of ciclopirox olamine, butenafine HCl and econazole against dermatophytes and bacteria. International Journal of Dermatology. 2003; **42**: 11-7.

Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM. Micologia. In: Diagnóstico Microbiológico. 2ª ed. São Paulo: Médica Panamericana; 1989. p. 537-99.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico. 5ª ed. São Paulo: Médica e Científica; 2001a. p. 1053-4.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico. 5ª ed. São Paulo: Médica e Científica; 2001b. p. 1052.

Kurtzman CP, Fell JW. The Yeast: A taxonomic Study. 4ª ed. New York: Elsevier; 1998.

Kwong-Chung KJ, Bennet JE. Candidiasis In: Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992. p.280-336.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Leveduroses profundas com especial referência às infecções por *Candida*. In Micologia Médica. São Paulo: Servier; 1991. p. 216-25.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Mello NT. Tratado de Micologia Médica Lacaz. São Paulo: Savier; 2002a.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Mello NT. Mecanismo de ação dos derivados azólicos e da terbinafina. In: Tratado de Micologia Médica. 9ª ed. São Paulo: Sarvier; 2002b. p. 1011-14.

Lanchares JL, Hernández ML. Recurrent vaginal candidiasis: changes in etiopathogenical patterns. Int. J. Gynecol. Obstet. 2000; **71**: 29-35.

Langlet J, Bergers J, Caillet J, Demaret JP. Theoretical study of the complexation of amphotericin B with sterols. Biochim. Biophys. Acta.1994; **1191**: 79-93.

Lopes Consolaro ME, Albertoni TA, Yoshida CS, Mazucheli J, Peralta RM, Svidzinski TIE. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. Rev. Iberoam Micol. 2004; **21**: 202-5.

Lorens RT, Parks LW. Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrob. Agents Chemother. 1990; **34**: 1660-5.

Lumbreras C, Lizasoain M, Aguado JM. Antifúngicos de uso sistêmico. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2003; **21**: 366-80.

Lyman CA, Walsh TJ. Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. Drugs. 1992; **44**: 9-35.

Macsween KE, Ridgway GL. The laboratory investigation of vaginal discharge. J. Clin. Pathol. 1998; **51**: 564-7.

Marrie TJ, Costerton JW. A scanning and transmission electron microscopic study of the surfaces of intrauterine contraceptive devices. Am J Obstet Gynecol. 1983; **15**: 384-94

Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. J. Bras. Pneumol. 2006; **32**: 449-60.

Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudella JL. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in filamentous fungi. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002; **20**: 523-9.

Mendes-Giannini MJS, Melhem MSC. Infecções fúngicas. In: Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p.226, 246-50.

Mendes RE, Mazzarolo MFG, Almeida LP, Archimedes D, Lindsey PC, Castelo A, et al. Prevalence, specie distribution and antifungal susceptibility prolife among *Candida* spp. isolates from human immunodeficiency virus (HIV – 1) seropositive and pregnant women. ASM General Meeting. 2002; **1**: 19-23.

Mendling W, Andrade P, Gutschmidt J, Gantenberg R, Presber W, Schonian G. Strain specificity of yeast isolated from different localtions of women suffering from vaginal candidoses, and their partners. Mycoses. 2000; **43**: 387-92.

Meyer SA, Ahearn DG. *Candida* Berkout In: The Yeasts – A taxonomic study, 3^a ed., Kreger van Rij, N. J. W. Amsterdam: Elsevier; 1984. p.585-844.

Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T, et al. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. J Clin Microbiol. 1994; **32**: 1115-8.

Moreira D, Paula CR. Vulvovaginal Candidiasis. Int J Gynaecol and Obstet. 2006; **92**: 266-7.

Murray JS. Standardization of antifungal susceptibility testing. Resident e Staff Physician; 1991. p. 26-9.

Namkinga LA, Matee MIN, Kivaisi K, Kullava A, Mneney EE. Identification of Candida strains isolated from Tanzanian pregnant women with vaginal candidiasis. East African Medical Journal. 2005; **82** (5): 226-34.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Standard M27-A. Pennsylvania;1997.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Standard M27-A2. 2ª ed. Wayne, Pennsylvania; 2002.

Negróni R, Arechavala AI. Itraconazole: pharmacokinetics and indications. Arch. Med. Res. 1993; **24**: 387-93.

Odds FC. *Candida* and Candidosis. 2ª ed. London: Bailliere Tindall; 1988a.

Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. J Clin Microbiol. 1994; **32**: 1923-9.

Pádua RAF, Guihlermetti E, Svidzinski ETI. *In vitro* activity of antifungal agents on yeasts isolates from vaginal secretion. Acta Scientiarum. Health Sciences. 2003; **25**: 51-4.

Parewijck W, Claeys G, Thiery HVK. Candidiasis in women fitted an intrauterine contraceptive device. Br J Obstet Gynecol. 1988; **95**: 408-10.

Pathak A, Pien FD, Carvalho L. Amphotericin B use in a community hospital, with special emphasis on side effects. Clin. Infect. Dis. 1998; **26**: 334-8.

Perea S, Patterson TF. The roler of antifungal susceptibility testing in the management of patients with invasive mycoses. Rev. Iberoam. Micol. 1999; **16**: 180-6.

Peria MMF, Prevalência de fenótipos de resistência e espécies emergentes de leveduras associadas a quadros de vulvovaginites. [dissertação]. São Paulo: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública; Infecções Fúngicas; Diagnóstico Micológico; 2003.

Pray WS. Treatment of Vaginal Fungal Infections. U. S. Pharmacist. 2001; **26**: 9.

Pye GW, Marriot MS. Inhibition of terol C14 demethylation by imidazole-containing antifungals. Sabouraudia. 1982; **20**: 325-9.

Quindós G, Alonso-Vargas R, Helou S, Arechavala A, Mazuelos EG, Negroni R. Evaluación de um nuevo médio de cultivo cromógeno (Candida ID) para el aislamiento e identificación presuntiva de Candida albicans y otras levaduras de interes médico. Rev. Iberoam Micol. 2001; **18**: 23-8.

Reed BD. Risk factors for *Candida* vulvovaginitis. Obstet Gynecol Surv. 1992; **47**: 551-60.

Rex JH, Nelson PW, Paetznij VL, Lozano-Chiu M, Espinel-Ingroff A, Anaissie EJ. Optimizing the correlation between results of testing in vitro for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. Antimicrob Agents Chemother. 1998; **42**: 129-34.

Rex JH, Pfaller NA, Galgiani JN, Bartlett SM, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Clin. Infect. Dis. 1997; **24**: 235-347.

Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of *Candida* Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. J Clin Microbiol. 2005; **43**: 2155-62.

Rippon JW. Candidiasis. In: Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1988. p.536-81.

Rippon JW. Candidiasis and the pathogenic yeast. In: Medical Mycology. The pathogenic fungi and pathogenic actinomycetes. 3^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1988a. p. 532-81.

Rodriguez-Tudella JL, Rodero L, Cuenca-Estrella M, Cordoba S. Curso Ibero-Americano “Antifúngicos: Abordagem terapêutica e laboratorial”. 4^a ed. São Paulo; 2003. p. 218.

Rose AH, Harrison JS. The Yeasts. London: Academic Press; 1989. p.261-87.

Saag MS, Dismukes WE. Azoles antifungal agents: emphasis on new triazoles. Antimicrob. Agents Chemother. 1988; **32**: 1-8.

Sanchez ML, Jones RN. E-test, an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiology application. Antimicrob. News. 1992; **8**: 1-7.

Sanglard D, Ischer F, Monod M, Biller J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CRD2, a new multidrug ABC transporter gene. Microbiology. 1997; **143**: 405-16.

Segal E, Baum GL. Pathogenic yeasts and Yeast infections. Florida: CRC Press; 1994. p. 227.

Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. Clin. Microbiol. Rev. 1999; **12**: 40-79.

Shimokawa O, Nakayama H. Increased sensitivity of *Candida albicans* cells accumulating 14 α -methylated sterols to active oxygen: possible relevance to “in vivo” efficacies of azoles antifungal agents. Antimicrob. Agents Chemother. 1992; **36**:1626-9.

Shimp LA. Vaginal and vulvovaginal disorders. In: Beraid M, et al. Handbook of nonprescription drugs, 13^a ed. Washington: American Pharmaceutical Association; 2002. p. 129-47.

Simões JA, Giraldo PC, Ribeiro Filho AD, Faundes A. Prevalência e fatores de risco associados à infecções cérvico-vaginais durante a gestação. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 1996; **18** (6): 459-67.

Sobel JD. Candidal vulvovaginitis. Clin Obstet Gynecol. 1993; **36**: 153-12

Sobel JD. Candida vulvovaginitis. Sem. Dermatol. 1996; **15**: 17-28.

Sobel JD. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am. J. Obstet. Gynecol. 1985; **152**: 924-35.

Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. Am. J. Obstet. Gynecol. 1998a; **178**: 203-11.

Sobel JD, Kapernick PS, Zervos M, et al. Treatment of complicated Candida vaginitis: comparison of single and sequential doses of fluconazole. Am. J. Obstet. Gynaecol. 2001; **185**: 363-9.

Sobel JD, Muller G, Cormick Mc. Experimental chronic vaginal candidiasis in rats. Sabouraudia. 1998b; **5**: 199-206.

Sobel JD. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. Clin Infect Dis. 1992; **14**: 148-53.

Sobel JD. Vaginitis. New Engl. J. Med. 1997; **337**: 1896-903.

Sobel JD, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, Nyirjesy P, et al. Fluconazole Susceptibility of Vaginal Isolates Obtained from Women with Complicated *Candida* Vaginitis: Clinical Implications. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; **47**: 34-8.

Sokol-Anderson ML, Brajtburg J, Medoff G. Amphotericin B – induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. J. Infect. Dis. 1986; **154**: 76-83.

Soper DE. Infecções geniturinárias e doenças sexualmente transmitidas. In: Berek JS, Adashi EY, Hillard PA. Tratado de Ginecologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.

Sullivan DJ, Bennett DE, Henmen M, Harwood D, Flint S, Mulcahy F, et al. Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *Candida albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency vírus-positive and AIDS patients. J. Clin. Microbiol. 1993; **34**: 1739-44.

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp nov: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology. 1995; **141**: 1507-21.

Tseng YH, Lee WT, Kuo TC. *In-vitro* Susceptibility of Fluconazole and Amphotericin B against *Candida* Isolates from Women with Vaginal Candidiasis in Taiwan. Journal of Food Drug Analysis. 2005; **13**: 12-6.

Us E, Cengiz AS. Prevalence and phenotypic evaluation of *Candida dubliniensis* in pregnant women with vulvovaginal candidosis in a university hospital in Ankara. Mycoses. 2006; **50**: 13-20.

Val ICC, Almeida Filho GL. Abordagem Atual da Candidíase Vulvovaginal. DST – J. Bras. Doenças Sex. Transm. 2001; **13**: 3-5.

Vandenbossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, De Baere T, Verschraegen G. Susceptibility testing of fluconazol by NCCLS broth macrodilution method, E-Test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. J. Clin. Microbiol. 2002; **40**: 918-31.

Van Den Anker JN, Van Popele NML, Sauer PJJ. Antifungal agents in neonatal systemic candidiasis. Antimicrob. Agents Chemother. 1995; **39**: 1391-7.

Van Der Walt JP, Yarrow D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast. In.: Kreger-van NJW. editores. The Yeast. Amsterdam: Elsevier Publishers. B. V; 1984. p. 45-104.

Veronesi R, Focaccia R. Tratado de infectologia. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 1600-6.

Warnock DW. Amphotericin B: na introduction. J. Antimicrob. Chemother. 1991; **28**: 27-38.

Warren NG, Hazen KC. Candida, Cryptococcus and other yeasts of medical importance In: Murray PR, et al. editores. Manual of clinical microbiology. 7^a ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 1184-99.

Watson PF, Rose ME, Ellis SW, England H, Kelly SL. Defective sterol C5-6 desaturation and azole resistance: a new hypothesis for the mode of action of azole antifungals, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989; **164**: 1170-5.

Weissenbacher S, Witkin SS, Tolbert V, Giraldo P, Linhares I, Haas A, et al. Value of *Candida* polymerase chain reaction and vaginal cytokine analysis for the differential diagnosis of women with recurrent vulvovaginitis. Infect Dis Obstet Gynecol. 2000; **8**: 244-7.

Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin. Microbiol. Rev. 1995; **8**: 240-59.

Wenjin QI, Yifu Shi. Epidemiological study on vaginal *Candida glabrata* isolated from pregnant women. Scandinavian Journall of Infections Diseases. 2006; **38**: 49-54.

Ziarrusta GB. Vulvovaginitis candidiásica. Rer. Iberoam Micol. 2002; **19**: 22-4.

9. ANEXOS

Ficha de Anamnese

Projeto: “Candidíase vulvovaginal em pacientes atendidas no ambulatório de ginecologia/obstetrícia do Hospital Geral Universitário de Cuiabá/MT - prevalência, identificação específica e susceptibilidade aos antifúngicos através de duas metodologias distintas.”

Nº prontuário:

Data:

Nome da paciente:

Idade:

Estado civil:

Gestante: () sim () não

DUM:

I.G.:

Paciente: () assintomática com clínica sugerindo candidíase
() sintomática com clínica sugerindo candidíase
() sintomática sem clínica sugerindo candidíase
() assintomática sem clínica sugerindo candidíase (porém com citologia positiva para leveduras)

Sinais e sintomas:

Prurido () sim () não

Hiperemia () sim () não

Ardor () sim () não

Dor na relação () sim () não

Odor () sim () não

Corrimento () sim () não

Característica do corrimento: () branco leitoso () branco talhado () amarelo () cinza
() bolhoso () não definido

Fatores predisponentes:

Uso de contraceptivos orais () sim () não qual:

Diabetes () sim () não

Uso de antibióticos () sim () não

Uso de drogas imunossupressoras () sim () não

Imunossupressão () sim qual:

() não

Caso recidivante () sim () não

Tratamento () sim qual:

() oral () tópico () não

Exame à fresco: () positivo p/ leveduras () negativo () não realizado

Observações:

Resultado cultura: () positivo Identificação específica:
() negativo

Susceptibilidade antifúngicos:

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO APÓS INFORMAÇÃO:

Projeto: Candidíase vulvovaginal em pacientes atendidas no ambulatório de ginecologia/obstetrícia do Hospital Geral Universitário de Cuiabá-MT - prevalência, identificação específica e susceptibilidade aos antifúngicos através de duas metodologias distintas.

Pesquisadores e instituições envolvidas:

Dra. Rosane Christine Hahn - UFMT.
Luciana Basili Dias – UFMT
Dr. José Meirelles Filho – UNIC
Larissa Rosa Silvério da Silva – UNIC
Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem - IAL

Esta pesquisa será realizada para determinar laboratorialmente, a partir de secreções vaginais, o nome das espécies de leveduras do gênero *Candida* possivelmente associadas a quadros clínicos de candidíase vulvovaginal. Posteriormente envolverá a determinação da susceptibilidade “in vitro” à drogas antifúngicas e sua possível correlação com resposta terapêutica. Todas as informações colhidas, e também as fotografias serão confidenciais, ficando sob o poder dos pesquisadores, os quais garantirão o sigilo dos nomes das pessoas envolvidas. Você não terá nenhum risco de vida e nem risco de seqüelas. Por fim, sua participação neste estudo é voluntária.

Eu....., entendi o que foi explicado sobre o estudo e concordo com minha participação.

**Assinatura do participante
(ou do responsável, se
menor):**.....

**Assinatura do pesquisador
principal:**.....

Data:dede 200.....

Tabela A5 – Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para as amostras de *C. albicans* em pacientes não gestantes, por duas metodologias, utilizando quatro drogas antifúngicas.

Amostras	Cetoconazol		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest
6	0,015	0,004	0,25	0,38	0,03	0,008	0,015	0,064
27	0,015	0,016	0,12	0,5	0,06	0,012	0,12	0,064
36	0,25	0,012	0,12	0,75	0,015	0,016	0,015	0,008
44	0,12	0,008	0,12	0,5	0,03	0,016	0,015	0,008
54	0,06	0,006	0,5	0,5	0,06	0,023	0,06	0,047
58	0,12	0,006	0,12	0,5	0,03	0,016	0,015	0,125
64	0,015	0,004	0,5	0,25	0,06	0,012	0,03	0,023
67	0,015	0,003	0,25	0,125	0,03	0,012	0,015	0,125
68	0,015	0,003	0,25	0,25	0,03	0,004	0,015	0,094
73	0,015	0,006	0,25	0,19	0,03	0,016	0,06	0,064
77	0,03	0,008	0,25	0,19	0,03	0,023	0,06	0,047
81	0,015	0,003	0,25	0,25	0,06	0,006	0,06	0,047
89	0,015	0,004	0,25	0,25	0,03	0,023	0,06	0,064
104	0,015	0,004	0,12	0,25	0,03	0,008	0,06	0,047
106	0,015	0,004	0,5	0,5	0,06	0,012	0,06	0,047
107	0,015	0,003	0,12	0,25	0,015	0,006	0,12	0,125
128	0,015	0,004	0,12	0,25	0,015	0,047	0,015	0,047
142	0,015	0,008	0,25	0,25	0,03	0,032	0,06	0,047
143	0,015	0,012	0,25	1,0	0,03	0,047	0,015	0,047
147	0,015	0,06	0,25	0,75	0,015	0,012	0,03	0,047
152	0,015	0,006	0,25	0,5	0,015	0,012	0,03	0,047
176	0,015	0,006	0,12	0,5	0,03	0,012	0,06	0,032
177	0,015	0,002	0,12	0,125	0,03	0,002	0,015	0,016
179	0,015	0,006	0,12	0,5	0,015	0,008	0,015	0,125
184	0,015	0,008	0,12	0,125	0,015	0,012	0,015	0,064
185	0,015	0,004	0,12	0,5	0,015	0,016	0,015	0,047
186	0,015	0,012	0,5	1,5	0,015	0,032	0,015	0,094
209	0,015	0,006	0,12	0,75	0,015	0,008	0,015	0,094
211	0,015	0,006	0,25	0,5	0,03	0,012	0,015	0,064
219	0,015	0,008	0,12	1,5	0,03	0,032	0,12	0,094
231	0,015	0,006	0,12	0,5	0,015	0,012	0,015	0,094
232	0,015	0,004	0,12	0,3	0,015	0,012	0,12	0,032
235	0,015	0,006	0,12	0,25	0,03	0,003	0,015	0,032
238	0,015	0,006	0,12	1,0	0,03	0,023	0,06	0,047
241	0,015	0,006	0,12	1,0	0,015	0,023	0,12	0,125
251	0,015	0,004	0,12	0,19	0,015	0,002	0,015	0,012
256	0,015	0,012	0,12	1,0	0,03	0,016	0,06	0,094

Continuação Tabela A5.

281	0,015	0,016	0,5	1,0	0,03	0,094	0,06	0,047
306	0,015	0,004	0,25	0,5	0,03	0,008	0,12	0,125
312	0,015	0,012	0,25	0,25	0,03	0,023	0,12	0,016
320	0,015	0,012	0,5	0,75	0,06	0,047	0,5	0,064
326	0,015	0,012	0,25	0,5	0,03	0,125	0,06	0,047
327	0,015	0,003	0,25	0,125	0,015	0,016	0,12	0,125
337	0,015	0,016	0,25	0,25	0,03	0,032	0,06	0,094
365	0,015	0,006	0,25	0,25	0,03	0,064	0,12	0,125
379	0,015	0,006	0,5	0,25	0,06	0,016	0,5	0,094
380	0,015	0,006	0,12	0,125	0,03	0,016	0,5	0,064
385	0,015	0,004	0,5	0,25	0,03	0,012	0,06	0,064
392	0,015	0,004	1,0	0,094	0,03	0,016	0,5	0,094
397	0,015	0,38	0,12	0,125	0,015	0,016	0,5	0,047
403	0,015	0,006	0,25	0,25	0,12	0,016	0,12	0,094

Tabela A6 – Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para as amostras de *C. parapsilosis* em pacientes não gestantes, por duas metodologias, utilizando quatro drogas antifúngicas.

Amostras	Cetoconazol		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest
8	0,03	0,016	2,0	0,75	0,06	0,006	0,015	0,016
71	0,015	0,006	0,25	0,38	0,015	0,012	0,12	0,125
96	0,015	0,023	1,0	0,25	0,03	0,047	0,06	0,19
194	0,015	0,012	0,12	0,5	0,015	0,008	0,03	0,047
204	0,03	0,016	0,25	0,5	0,015	0,012	0,03	0,008
213	0,015	0,006	0,12	0,038	0,015	0,008	0,015	0,047
216	0,015	0,032	0,12	0,75	0,015	0,064	0,03	0,125
239	0,03	0,016	0,5	0,19	0,015	0,16	0,12	0,047
259	0,015	0,008	0,12	0,5	0,015	0,016	0,12	0,047
377	0,015	0,004	0,25	2,0	0,015	0,023	0,06	0,19

Tabela A7 – Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para as amostras de *C. tropicalis* em pacientes não gestantes, por duas metodologias, utilizando quatro drogas antifúngicas.

Amostras	Cetoconazol		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest
258	0,015	0,016	0,12	0,75	0,015	0,023	0,12	0,047
346	0,015	0,003	0,12	0,19	0,015	0,047	0,12	0,094
352	0,015	0,006	0,25	0,125	0,06	0,023	0,12	0,023
353	0,015	0,006	0,5	0,38	0,06	0,032	0,12	0,19

Tabela A8 – Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para as amostras de *C. glabrata* em pacientes não gestantes, por duas metodologias, utilizando quatro drogas antifúngicas.

Amostras	Cetoconazol		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest
74	0,015	0,012	0,12	0,25	0,015	0,064	0,03	0,064
205	0,25	0,25	0,12	16	0,06	0,5	0,015	0,094
395	0,06	0,004	4,0	0,25	0,25	0,023	0,25	0,38

Tabela A9 – Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para as amostras de *C. krusei* em pacientes não gestantes, por duas metodologias, utilizando quatro drogas antifúngicas.

Amostras	Cetoconazol		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest
41	0,06	0,023	2,0	1,5	0,25	0,25	0,015	0,016
389	1,0	0,5	64	32	0,25	0,25	0,5	0,047

Tabela A10 – Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para as amostras de *C. albicans* em pacientes gestantes, por duas metodologias, utilizando quatro drogas antifúngicas.

Amostras	Cetoconazol		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest
3	0,015	0,012	0,5	1,5	0,06	0,016	0,015	0,032
4	0,015	0,008	0,12	0,38	0,03	0,016	0,015	0,094
9	0,015	0,008	0,25	0,19	0,06	0,016	0,015	0,064
11	0,015	0,008	0,25	0,19	0,12	0,032	0,12	0,094
24	0,015	0,006	0,12	0,19	0,06	0,047	0,12	0,064
28	0,015	0,004	0,25	0,5	0,015	0,008	0,06	0,047
31	0,015	0,004	0,12	0,38	0,03	0,023	0,015	0,012
32	0,015	0,006	0,12	0,25	0,03	0,016	0,12	0,047
33	0,015	0,023	0,25	1,5	0,03	0,125	0,06	0,016
42	0,06	0,006	0,12	0,75	0,015	0,047	0,015	0,047
46	0,015	0,006	0,12	0,75	0,03	0,023	0,015	0,016
47	0,03	0,004	0,25	0,5	0,06	0,012	0,015	0,064
48	0,06	0,006	0,25	0,5	0,12	0,032	0,12	0,125
55	0,06	0,004	0,12	0,19	0,03	0,008	0,015	0,064
56	0,06	0,003	0,12	0,19	0,015	0,004	0,015	0,012
63	0,015	0,006	0,25	0,75	0,06	0,012	0,015	0,023
66	0,015	0,004	0,12	0,19	0,015	0,012	0,015	0,047
79	0,015	0,006	0,12	0,25	0,03	0,006	0,12	0,094
80	0,015	0,006	0,25	0,25	0,03	0,012	0,12	0,047
85	0,015	0,004	0,25	0,25	0,03	0,012	0,06	0,047
86	0,015	0,006	0,25	0,25	0,03	0,012	0,06	0,125
88	0,015	0,004	0,25	0,19	0,03	0,016	0,06	0,064
98	0,015	0,006	0,12	0,125	0,015	0,012	0,06	0,064
99	0,015	0,006	0,25	0,38	0,03	0,012	0,12	0,125
105	0,03	0,004	0,25	0,125	0,015	0,012	0,12	0,125
119	0,015	0,004	0,12	0,25	0,03	0,012	0,12	0,047
123	0,015	0,004	0,25	0,125	0,06	0,008	0,03	0,008
125	0,015	0,003	1,0	0,125	0,06	0,008	0,06	0,032
131	0,015	0,004	0,25	0,75	0,03	0,008	0,06	0,064
138	0,015	0,006	0,12	0,5	0,015	0,012	0,06	0,064
146	0,015	0,06	0,25	1,0	0,015	0,012	0,015	0,032
149	0,015	0,008	0,12	0,75	0,015	0,012	0,015	0,047
157	0,015	0,008	0,12	1,0	0,015	0,012	0,015	0,125
158	0,015	0,008	0,12	1,0	0,03	0,12	0,12	0,047
160	0,015	0,008	0,12	1,0	0,03	0,032	0,12	0,125
166	0,015	0,002	0,12	0,25	0,03	0,008	0,06	0,012
167	0,015	0,004	1,0	0,094	0,03	0,006	0,06	0,032
175	0,015	0,006	0,12	0,5	0,015	0,008	0,12	0,032
182	0,015	0,006	0,12	0,5	0,03	0,016	0,015	0,047
191	0,015	0,008	0,12	0,5	0,015	0,012	0,03	0,047
196	0,015	0,008	0,25	0,75	0,015	0,012	0,03	0,064
197	0,03	0,06	0,25	0,75	0,03	0,012	0,03	0,125
199	0,015	0,008	0,25	1,0	0,015	0,012	0,03	0,094
210	0,015	0,006	0,12	0,5	0,03	0,012	0,015	0,032
212	0,015	0,012	0,12	1,0	0,03	0,016	0,015	0,094
214	0,015	0,006	0,12	0,5	0,03	0,016	0,12	0,047
225	0,015	0,012	0,12	0,75	0,03	0,023	0,12	0,047

Continuação Tabela A10

229	0,015	0,012	0,12	1,0	0,03	0,023	0,015	0,094
242	0,015	0,006	0,12	0,5	0,015	0,023	0,12	0,064
245	0,03	0,008	0,12	0,75	0,03	0,023	0,12	0,047
250	0,015	0,012	0,12	1,0	0,03	0,016	0,12	0,047
253	0,015	0,006	0,12	1,0	0,015	0,016	0,06	0,012
254	0,015	0,006	0,12	1,0	0,015	0,016	0,06	0,094
262	0,015	0,006	0,12	1,5	0,015	0,047	0,06	0,064
263	0,015	0,004	0,12	0,25	0,015	0,012	0,12	0,19
267	0,015	0,003	0,12	0,125	0,015	0,004	0,015	0,016
268	0,25	0,006	0,12	0,5	0,03	0,012	0,06	0,023
276	0,015	0,008	0,12	2,0	0,03	0,047	0,12	0,094
278	0,015	0,006	0,12	0,75	0,03	0,008	0,03	0,023
279	0,015	0,006	0,12	0,75	0,03	0,023	0,06	0,032
283	0,12	0,125	0,5	0,125	0,12	0,003	0,25	0,016
290	0,015	0,008	0,25	0,38	0,03	0,032	0,06	0,047
291	0,015	0,016	0,25	0,38	0,03	0,064	0,06	0,064
292	0,015	0,006	0,25	0,38	0,03	0,012	0,12	0,125
302	0,015	0,008	0,25	0,5	0,03	0,016	0,06	0,125
303	0,015	0,004	0,25	0,5	0,015	0,012	0,06	0,094
309	0,015	0,006	0,25	0,38	0,03	0,032	0,12	0,064
317	0,015	0,006	0,12	0,125	0,015	0,006	0,03	0,006
318	0,015	0,006	0,5	0,38	0,015	0,008	0,06	0,006
322	0,015	0,012	0,25	0,5	0,015	0,032	0,12	0,016
325	0,015	0,012	0,25	1,0	0,03	0,016	0,06	0,047
332	0,015	0,008	0,25	0,094	0,015	0,012	0,03	0,008
333	0,015	0,006	0,25	0,25	0,03	0,023	0,12	0,094
334	0,06	0,008	0,25	0,25	0,015	0,023	0,06	0,125
339	0,015	0,006	0,25	0,25	0,015	0,032	0,12	0,125
354	0,015	0,16	0,25	0,5	0,03	0,125	0,06	0,064
355	0,015	0,008	0,25	0,38	0,03	0,032	0,12	0,19
358	0,03	0,008	0,25	0,38	0,015	0,032	0,06	0,094
368	0,015	0,012	0,25	0,19	0,03	0,125	0,12	0,047
373	0,015	0,004	0,5	0,25	0,03	0,012	0,12	0,064
384	0,015	0,012	0,25	0,19	0,015	0,012	0,12	0,094
388	0,03	0,006	1,0	0,25	0,03	0,047	0,06	0,125
404	0,015	0,004	0,12	0,25	0,03	0,016	0,25	0,047

Tabela A11 – Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para as amostras de *C. krusei* em pacientes gestantes, por duas metodologias, utilizando quatro drogas antifúngicas.

Amostras	Cetoconazol		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest
59	0,12	0,023	0,12	1,5	0,25	0,008	0,015	0,064
252	0,12	0,19	1,0	8,0	0,06	0,094	0,25	0,125
369	0,25	0,38	0,25	8,0	0,25	0,1	0,5	0,38

Tabela A12 – Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para as amostras de *C. glabrata* em pacientes gestantes, por duas metodologias, utilizando quatro drogas antifúngicas.

Amostras	Cetoconazol		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest
277	0,03	0,125	0,12	4,0	0,03	0,047	0,12	0,016
286	0,015	0,064	2,0	2,0	0,03	0,125	0,12	0,094

Tabela A13 – Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para as amostras de *C. parapsilosis* em pacientes gestantes, por duas metodologias, utilizando quatro drogas antifúngicas

Amostras	Cetoconazol		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest
187	0,015	0,012	0,12	0,25	0,015	0,125	0,015	0,094

Tabela A14 – Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para as amostras de *C. tropicalis* em pacientes gestantes, por duas metodologias, utilizando quatro drogas antifúngicas.

Amostras	Cetoconazol		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest	CLSI	Etest
78	0,015	0,004	0,12	0,38	0,03	0,008	0,12	0,094