

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Programa de Pós-Graduação em Saúde  
Doutorado em Saúde

**Márcio Tavares Rodrigues**

**Associação de cultura e diversidade genética de *Candida* com características clínicas e epidemiológicas de pacientes com diagnóstico de candidíase vulvovaginal**

Juiz de Fora  
2014

**MÁRCIO TAVARES RODRIGUES**

**Associação de cultura e diversidade genética de *Candida* com características clínicas e epidemiológicas de pacientes com diagnóstico de candidíase vulvovaginal**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde – Área de concentração em Saúde Brasileira, do Programa de Pós Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Saúde.

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva**

Juiz de Fora  
2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rodrigues, Márcio Tavares.

Associação de cultura e diversidade genética de *Candida* com características clínicas e epidemiológicas de pacientes com diagnóstico de candidíase vulvovaginal / Márcio Tavares

Rodrigues. -- 2014.

98 p. : il.

Orientador: Cláudio Galuppo Diniz

Coorientadora: Vânia Lúcia da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2014.

1. Candidíase vulvovaginal. 2. *Candida*. 3. Diagnóstico clínico. 4. Diagnóstico microbiológico. I. Diniz, Cláudio Galuppo, orient. II. da Silva, Vânia Lúcia, coorient. III. Título.

**Márcio Tavares Rodrigues**

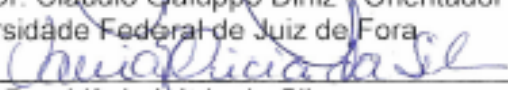
**Associação de cultura e diversidade genética de *Candida* com características clínicas e epidemiológicas de pacientes com diagnóstico de candidíase vulvovaginal**

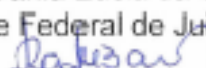
Tese de Doutorado apresentado ao Curso de Doutorado em Saúde – Área de concentração em Saúde Brasileira, do Programa de Pós Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Saúde.


Aprovada em: 11/02/2014

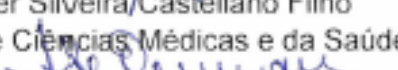
BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Claudio Galuppo Diniz, Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva  
Universidade Federal de Juiz de Fora

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Rosângela Abreu Monteiro de Barros  
Universidade Federal de Juiz de Fora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Didier Silveira/Castellano Filho  
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alim Alves Demian

À Tia Alina (*in memorian*), que sempre me incentivou a fazer o Doutorado, mas que sempre me considerou um Doutor.

Às grandes mulheres da minha vida: minha mãe Austália, minha esposa Márcia e minhas filhas Luana e Juana.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela constante proteção e, em especial, pela força imprescindível para realizar este trabalho.

À **Márcia, Luana, Juana** e todos os meus **familiares**, minha base de sustentação, que me incentivaram nesta empreitada e souberam entender minha ausência em alguns encontros de família. Agradeço as minhas três mulheres pela compreensão, companhia e solidariedade nos feriados e férias em que não pude viajar.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. **Cláudio Galuppo Diniz**, pela coragem de me convidar a fazer o Doutorado, pela amizade, pela oportunidade de convivência, pela orientação desta tese, pela disponibilidade, pela ajuda em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho, pelos ensinamentos e por ter dado um novo rumo à minha vida, permitindo coroar minha carreira docente com esta titulação.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Vânia Lúcia da Silva**, por fazer parte do meu grupo de amigos e colega de trabalho, pela sua constante postura ética e pelos socorros prestados nas mais variadas situações deste doutoramento.

A todas as **pacientes** que se dispuseram participar desta pesquisa, sem as quais este trabalho não seria realizado.

À minha ex-aluna e minha primeira bolsista de iniciação científica Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Juliana Barroso Zimmermann**, pela ajuda na elaboração do questionário usado neste projeto e pela parceria com a realização do diagnóstico clínico e coleta de material das pacientes.

Ao meu ex-aluno Prof. Dr. **Didier Silveira Castellano Filho**, pela sugestão do tema a ser estudado e também pela ajuda na elaboração do questionário usado neste projeto e pela parceria com a realização do diagnóstico clínico e coleta de material das pacientes.

A todas as alunas de iniciação científica que participaram deste projeto, **Letícia Zambelli Simões, Marcela Laureano Rocha, Cristiane de Oliveira Mota, Mariana Carolina Tocantins Alvim, Natália Nogueira de Souza e Ana Carolina**

**Gonçalves**, além do “agregado” **Daniel de Oliveira Araújo**, pela oportunidade de orientação e grande ajuda dada nas diversas fases do estudo. Vocês foram fundamentais e viabilizaram a realização deste trabalho.

À minha amiga e orientadora de Mestrado Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Maria Aparecida Resende**, pelas sugestões na elaboração e desenvolvimento do projeto e pelas amostras de referência.

À minha ex-aluna Dr<sup>a</sup> **Aline Siqueira Ferreira**, pela disponibilidade e ajuda na análise estatística dos resultados.

À Dra. **Alessandra Barbosa Ferreira Machado**, por todo apoio na realização e interpretação da genotipagem das amostras estudadas.

Ao Dr. **Juarez Campolina Machado**, pela ajuda na confecção dos dendogramas.

À minha “velha amiga” e colega micologista Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Rosângela Abreu Monteiro de Barros**, pela solidariedade, companheirismo e doação, que foram importantes nesta caminhada.

Aos ex-funcionários do Laboratório de Microbiologia (ICB/UFJF) **Maria Angélica Esteves Pires** e **Sidney Leandro de Souza**, pelo apoio na implantação das técnicas usadas nesta pesquisa e pelo acolhimento aos meus alunos de iniciação científica.

Aos amigos mestrandos e doutorandos que encontrei durante as disciplinas da pós-graduação **Thiago César Nascimento**, **Maria Lúcia Morsef Bousada**, **Gizele Duarte Garcia**, **Cláudia Oliveira Fontes**, **Michele Cristina Ribeiro de Freitas**, pelo companheirismo, cumplicidade e natural corporativismo.

Aos colegas do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia (ICB/UFJF) pelo incentivo para a concretização deste curso e, em especial, às Professoras Dr<sup>a</sup> **Maria Luzia da Rosa e Silva** e Dr<sup>a</sup> **Betânia Paiva Drumond** por compartilhar sentimentos e amenizar minha ansiedade.

A todos os **funcionários, alunos de pós-graduação e de iniciação científica** do Laboratório de Microbiologia (ICB/UFJF), pela convivência e eventuais ajudas durante os experimentos.

A todos os **professores e alunos** que participaram dos Seminários de Pesquisa em Microbiologia (ICB/UFJF), pelas oportunidades de aprendizado.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Dionéia César Evangelista** pelas sugestões na elaboração do projeto e empréstimo de equipamento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (**FAPEMIG**), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pelo apoio financeiro ao projeto.

À Pró-reitoria de Pesquisa da UFJF (**PROPESQ**) pelas bolsas de iniciação científica (BIC e Apoio à Consolidação de Grupos de Pesquisa) e programa PROVOQUE.

À Pró-reitoria de Recursos Humanos da UFJF (**PRORH**) pela bolsa do Programa PROQUALI.

A todos os amigos que torceram por mim.



“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.”

Amyr Klink

## RESUMO

Candidíase vulvovaginal (CVV) é um dos diagnósticos mais frequentes na prática ginecológica e sua incidência tem aumentado drasticamente. Portanto, estudos regionais prospectivos tornam-se necessários para conhecimento da epidemiologia da doença. Tem sido reconhecida a emergência de outras espécies de leveduras, além de *Candida albicans*, como agentes etiológicos em infecções mono ou polimicrobianas, com reflexo direto na terapia antifúngica, frequentemente empírica. O objetivo deste estudo foi investigar a etiologia, o perfil epidemiológico de pacientes com candidíase vulvovaginal e possíveis fatores predisponentes, além da diversidade genética das leveduras. Secreção vaginal das pacientes foi semeada em Agar Sabouraud e amostras de leveduras foram isoladas e identificadas por PCR. Dados demográficos, clínicos e fatores predisponentes foram obtidos por meio de questionário. Genotipagem das leveduras foi realizada pela técnica de RAPD e matriz de similaridade foi construída para avaliação da diversidade de *C. albicans* e sua relação com os dados clínicos e epidemiológicos. Para análise estatística foram utilizados os testes *t*-Student, Fischer e qui-quadrado, com auxílio do *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), com nível de significância de 5%. Foram avaliadas 69 pacientes, entre 15 e 52 anos, predominando mulheres brancas (79,7%), com escolaridade de nível superior completo (58%), casadas (56,5%) e com vida sexual ativa (97,1%). Dentre elas, 34,8% eram gestantes, 7,2% diabéticas, 1,4% soropositivas para HIV e 36,2% usavam anticoncepcional oral. Antibioticoterapia recente foi citada por 13% das pacientes, uso de antifúngico por 5,8% e de antitricomonas por 1,4%. Uso de corticosteróides foi relatado por 2,9% das participantes e de anti-neoplásicos por 1,4%. Fluxo vaginal e prurido foram as principais queixas apresentadas, respectivamente, por 97,1% e 73,9% das pacientes, seguido de ardência (63,8%) e hiperemia (63,8%). Quando presente, o fluxo foi majoritariamente branco (88,1%) ou grumoso (86,6%). O diagnóstico foi confirmado pela cultura em 55 (79,7%) pacientes, sendo quatro casos de infecção mista. A espécie prevalente foi *C. albicans*, seguida por um caso de *C. glabrata*, que foi encontrada em mais duas pacientes em associação com *C. albicans*. Nas outras duas infecções polimicrobianas, *C. lusitaniae* foi isolada com *C. albicans*. A análise dos dados gerados pela genotipagem das leveduras permitiu discriminar linhagens de *C. albicans* na população amostrada. Foi possível evidenciar sete tipos eletroforéticos (TE) classificados como grupos I a VII, sendo os grupos I, II, III, IV, V e VI compostos por linhagens de levedura que apresentaram 100% de similaridade genética. No grupo VII foram incluídas linhagens de levedura altamente polimórficas que apresentaram no máximo 80% de semelhança. Embora nenhuma relação tenha sido estabelecida entre TE e dados clínicos e epidemiológicos, percebeu-se que os tipos I e IV são os mais prevalentes na população amostrada. Embora a positividade da cultura tenha sido alta e os dados clínicos de CVV sejam característicos, a sintomatologia não é patognomônica. *C. albicans* é a espécie prevalente, mas deve-se atentar para a ocorrência de outras espécies na etiologia de CVV, como a emergência de *C. lusitaniae*. Sugere-se realização do diagnóstico microbiológico com identificação da espécie envolvida e detecção de infecção mista antes da terapia antimicrobiana.

**Palavras-chave:** Candidíase vulvovaginal. *Candida*. Diagnóstico clínico. Diagnóstico microbiológico

## ABSTRACT

The vulvovaginal candidiasis (VVC) is one of the most frequent diagnosed disease in gynecological practice and its incidence has increased drastically. Therefore, regional prospective studies become necessary to better address epidemiological issues. It has been recognized the emergence of other yeast species, besides *Candida albicans*, as VVC in mono or polymicrobial infections, with direct reflex in antifungal therapy, often empirical. This study was focused on the etiology investigation, the epidemiological profile of patients with vulvovaginal candidiasis (VVC) and predisposing factors, addition to the genetic diversity of yeasts. Vaginal secretions were streaked in Sabouraud agar and yeast samples were isolated and identified by PCR. Demographic and clinical data were obtained by questionnaire. For statistical analysis the Student t test, chi-square and Fischer, were applied as needed using the software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) with a significance level of 5 %. Yeast genotyping was performed by the RAPD approach, and a similarity matrix was obtained to evaluate *C. albicans* diversity and their relationships with clinical and epidemiological data. Sixty nine patients were evaluated between 15 and 52 years, predominantly white (79.7 %), with higher education (58 %), married (56.5 %) and sexually active (97.1 %). Among them, 34.8 % were pregnant, 7.2% diabetic, 1.4 % seropositive for HIV and 36.2 % using oral contraceptives. Recent antibiotic therapy was mentioned by 13 % of patients, and antifungal or anti-trichomonas therapy were mentioned by 5.8% and 1.4 % of the patients. Corticosteroid use was reported by 2.9 % and antineoplastic by 1.4 %. Vaginal discharge and itching were the main complaints (97.1 % and 73.9 %), followed by burning (63.8 %) and erythema (63.8 %). When present, the vaginal flow was predominantly white (88.1 %) or lumpy (86.6 %). The diagnosis was confirmed by culture in 55 (79.7 %) patients, with mixed infections in four patients. The most prevalent species was *C. albicans*, followed by *C. glabrata* (one monoinfection and two mixed infections with *C. albicans*). *C. lusitaniae* and *C. albicans* were also identified in mixed infections (two patients). The analysis of data generated by yeasts genotyping allowed discriminating different *C. albicans* strains in the sampled population. It was identified seven electrophoretic types (ET) classified within groups I to VII. The groups I, II, III, IV, V and VI included yeast strains with of 100% genetic similarity. In group VII were included the yeast strains highly polymorphic that present less than 80% of similarity. Despite the high culture positivity and clinical data being characteristic of VVC, the symptoms are not pathognomonic. *C. albicans* is the most prevalent species, but other species are also involved in the VVC etiology, as the emergence of *C. lusitaniae*. It is suggested the diagnosis and identification of microbial species involved including detection of mixed infections before antimicrobial chemotherapy.

**Key words:** Vulvovaginal candidiasis. *Candida*. Clinical diagnosis. Microbiological diagnosis

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Desenho experimental e etapas de desenvolvimento da pesquisa.. 35
- Figura 2.** Estratégia do PCR Multiplex para as espécies de *Candida*. Organização dos genes ribossômicos fúngicos alvos, com os oligoiniciadores universais e espécie-específicos indicados. As setas indicam a direção das amplificações do PCR. ITS: RNA não funcional entre RNAr funcionais..... 38
- Figura 3.** Eletroforegramas representativos da identificação molecular de leveduras isoladas de secreção vaginal das pacientes avaliadas com diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal. (A) Padronização da técnica pela utilização de amostras de referência. MM= Marcador molecular, 1kb ladder. Canaleta 1 – *Candida glabrata* ATCC 90030 (929/839 pb); canaleta 2 – *C. parapsilosis* ATCC 20019 (570/370 pb); canaleta 3 – *C. albicans* ATCC 18804 (583/446 pb); canaleta 4 – *C. tropicalis* ATCC 750 (583/507 pb); canaleta 5 – *C. krusei* ATCC 20298 (590/169 pb); canaleta 6 – controle negativo. (B) Representativo da identificação de leveduras isoladas da secreção vaginal. MM=Marcador molecular, 1kb ladder. Canaleta 1 – Controle negativo; canaleta 2 - *C. glabrata*; canaletas de 3 a 10 - *C. albicans*..... 40
- Figura 4.** Identificação das amostras de *Candida* isoladas de secreção vaginal das pacientes avaliadas com diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal quando as culturas microbiológicas para isolamento de leveduras foram positivas..... 50
- Figura 5.** Eletroforegrama representativo da genotipagem das linhagens de *C. albicans* por RAPD, usando-se o oligonucleotídeo iniciador OPA 03. MM = Marcador molecular 100 bp ladder. Canaletas de 01 a 11: padrão de bandeamento das amostras clínicas isoladas de pacientes com diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal.... 51
- Figura 6.** Dendograma de similaridade UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*) de resultante da comparação dos perfis eletroforéticos obtidos pela genotipagem das amostras de *C. albicans* isoladas de

pacientes com diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal,  
utilizando o coeficiente de Jaccard com *bootstrap* de 1000  
réplicas..... 52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Oligoiniciadores usados para identificação de espécies clinicamente relevantes de <i>Candida</i> , tamanhos dos fragmentos esperados visualizados em eletroforese de gel de agarose e condições de amplificação.....	39
<b>Tabela 2.</b>	Características sócio-demográficas do grupo de pacientes avaliadas.....	44
<b>Tabela 3.</b>	Características clínicas associadas a fatores de risco para candidíase vulvovaginal no grupo de pacientes avaliadas.....	46
<b>Tabela 4.</b>	Manifestações clínicas relacionadas ao diagnóstico de candidíase vulvovaginal no grupo de pacientes avaliadas.....	48
<b>Tabela 5.</b>	Frequência de ocorrência dos diferentes tipos eletroforéticos de <i>Candida albicans</i> observados entre as pacientes com cultura positiva.....	53
<b>Tabela 6.</b>	Distribuição de tipos eletroforéticos de <i>Candida albicans</i> observados entre as pacientes com cultura positiva e pelo menos duas amostras isoladas.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AIDS** – Acquired Immunodeficiency Syndrome

**AP-PCR** - Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction

**ATCC** - American Type Culture Collection

**CVV** – Candidíase Vulvovaginal

**DIU** – Dispositivo Intra-uterino

**DST** – Doença Sexualmente Transmissível

**HPV** – Human Papiloma Virus

**ICB/UFMG** – Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais

**ITS** - Internal Transcribed Spacer

**LMAM/ICB/UFJF** – Laboratório de Micologia Ambiental e Médica/Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Juiz de Fora

**PCR** – Polymerase Chain Reaction

**RAPD** - Random Amplified Polymorphic DNA

**SPSS** - Statistical Package for the Social Sciences

**UPGMA** - Unweighted Pair Group Method

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
	2.1 Vulvovaginites.....	18
	2.2 Candidíase Vulvovaginal.....	20
	2.3 Epidemiologia de CVV.....	21
	2.4 Etiologia de CVV.....	22
	2.5 Etiopatogenia de CVV.....	23
	2.6 Fatores Predisponentes de CVV.....	24
	2.7 Aspectos clínicos de CVV.....	25
	2.8 Diagnóstico de CVV.....	26
	2.8.1 Novas ferramentas e abordagens para estudo de <i>Candida</i> .....	28
	2.9 Tratamento de CVV.....	30
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
	3.1 Objetivo Geral.....	33
	3.2 Objetivos Específicos.....	33
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
	4.1 Desenho experimental e espécimes clínicos.....	34
	4.2 Isolamento de leveduras a partir dos espécimes clínicos.....	36
	4.3 Extração de DNA das leveduras isoladas.....	36
	4.4 Identificação molecular das leveduras.....	37
	4.5 Genotipagem das leveduras.....	41
	4.6 Análises estatísticas.....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
	5.1 Associação entre cultura de secreção vaginal, características sócio-demográficas, situações clínicas associadas a fatores de risco e sinais e sintomas.....	43
	5.2 Identificação das leveduras isoladas nas culturas positivas.....	49
	5.3 Associação entre a diversidade genética das leveduras isoladas e o grupo de pacientes.....	50
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>



<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>
	<b>APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>74</b>
	<b>APÊNDICE B - Formulário de coleta de dados das pacientes com CVV.....</b>	<b>76</b>
	<b>APÊNDICE C - Tipos eletroforéticos de <i>C. albicas</i> e características sócio-demográficas, clínicas associadas a fatores de risco e ao diagnóstico de candidíase vulvovaginal no grupo de pacientes avaliadas.....</b>	<b>77</b>
	<b>APÊNDICE D - Artigo publicado - Período de 2009 a 2013.....</b>	<b>80</b>
	<b>APÊNDICE E - Artigo publicado – Período de 2009 a 2013.....</b>	<b>88</b>
	<b>ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética.....</b>	<b>97</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As vulvovaginites infecciosas são as principais queixas que levam milhões de mulheres de todo o mundo aos consultórios ginecológicos e incluem a vaginose bacteriana, a candidíase vulvovaginal e a tricomoníase vaginal. Caracterizam-se por uma tríade de sintomas como dor, prurido e ardor, geralmente acompanhados de corrimento vaginal. Entretanto, uma boa parcela das mulheres sintomáticas permanece sem diagnóstico após avaliação clínica, o que reforça a necessidade de comprovação laboratorial da etiologia nas infecções vaginais.

A candidíase vulvovaginal é, em algumas regiões, a principal causa de vaginite, sendo na maioria das vezes desencadeada por espécies de *Candida* presentes na microbiota genital. *C. albicans* é o agente infeccioso de maior prevalência, mas outras espécies como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* têm sido cada vez mais registradas. Há relatos também de participação de duas ou mais espécies simultaneamente na etiologia da candidíase vulvovaginal.

A doença acomete principalmente as mulheres após a puberdade e está geralmente associada a situações de debilidade do hospedeiro ou a outros fatores predisponentes. Caracteriza-se clinicamente por intenso prurido, ardência vulvar e presença de corrimento vaginal branco e grumoso. Entretanto, não existem manifestações clínicas patognomônicas de candidíase vulvovaginal, sendo *C. albicans* mais associada com os sintomas do que as espécies de *C. não-albicans*, tornando-se importante identificar o agente etiológico.

O tratamento da candidíase vulvovaginal normalmente é empírico, sendo os derivados azólicos e os poliênicos as drogas mais utilizadas. No entanto, alguns estudos apontam resistência de espécies de *Candida* frente a estes antifúngicos, principalmente entre as espécies de *C. não-albicans*. O perfil de susceptibilidade às drogas apresentado pelas espécies de *Candida* é bastante variável, tornando-se fundamental a identificação da levedura antes de iniciar a terapêutica.

A metodologia convencional de identificação de espécies de *Candida*, que se baseia em aspectos fenotípicos, inclui o isolamento do fungo em meio de cultura e análises de suas características morfológicas e metabólicas. Estas provas requerem pessoal técnico habilitado e são geralmente laboriosas e demoradas. A utilização de meios de cultura cromogênicos possibilita a identificação presuntiva de *Candida spp.*

de forma mais rápida e permite o diagnóstico de infecção mista, porém, detecta um número limitado de espécies. Os testes de susceptibilidade aos antifúngicos não são rotineiramente realizados, tendo em vista o seu custo elevado e a demora na divulgação dos resultados.

Atualmente, o desenvolvimento de metodologias moleculares permite realizar de forma mais rápida e segura os processos de identificação das espécies fúngicas. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método específico, sensível, rápido e seguro para identificar as espécies de *Candida*, permite a detecção de mais de uma espécie numa amostra simultaneamente, sendo mais sensível do que a cultura na detecção do fungo na vagina. A técnica de DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD), uma variação do protocolo da técnica de PCR, tem sido usada na identificação de leveduras do gênero *Candida* e permite avaliar polimorfismos intra e interespecies. É uma poderosa ferramenta para identificação taxonômica, em surtos de infecção hospitalar e em diversos estudos epidemiológicos, sendo útil, por exemplo, nas investigações sobre candidíase vulvovaginal recorrente.

Assim, considerando-se a importância da CVV e sua etiologia polimicrobiana, e a ausência de manifestações clínicas patognomônicas de candidíase vulvovaginal, estudos direcionados ao estabelecimento de correlações entre cultura fúngica e características sociodemográficas e clínicas das pacientes, podem contribuir com informações científicas que sustentem e auxiliem o diagnóstico da doença. Além disso, o reconhecimento da diversidade genética das leveduras associadas à doença e suas características biológicas podem servir de base para predição do prognóstico da doença associada a uma terapia antimicrobiana empírica mais eficiente, frente à notável resistência microbiana às drogas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Vulvovaginites

O fluxo vaginal fisiológico normal compreende secreção vaginal, células esfoliativas e muco cervical. A frequência do fluxo vaginal varia com idade, ciclo menstrual, gravidez e uso de contraceptivos orais. O ambiente vaginal em indivíduos saudáveis caracteriza-se por uma inter-relação dinâmica entre o *Lactobacillus acidophilus* e outros membros da microbiota, estrógeno, glicogênio, pH vaginal e produtos de metabolismo de micro-organismos residentes e de patógenos. O *L. acidophilus* produz peróxido de hidrogênio, que é tóxico para alguns micro-organismos, e sua atividade fermentativa contribui para manutenção do pH vaginal entre 3,8 e 4,2 (EGAN; LIPSKY, 2000), o que favorece a ocorrência de leveduras (RODRIGUES; SIMÕES; DINIZ, 2009). *Candida* é uma levedura que faz parte da microbiota humana, especialmente da pele e de mucosas, e a colonização do trato genital feminino é de aproximadamente 20% em mulheres saudáveis, sendo maior ainda durante a gravidez (ARECHAVALA et. al., 2007).

As vulvovaginites infecciosas se desenvolvem quando a microbiota vaginal foi alterada pela introdução de um patógeno ou quando ocorrem mudanças no ambiente vaginal que favorecem a proliferação microbiana (GROSS et. al., 2007). Representam a principal queixa nas consultas ginecológicas e referem-se a uma variedade de desordens inflamatórias do trato genital inferior, que podem ser secundárias à infecção, irritação, alergia ou doença sistêmica (ANGOTTI; LAMBERT; SOPER, 2007). Em mais de 90% dos casos de vulvovaginites a etiologia é infecciosa e incluem vaginose bacteriana, candidíase e tricomoníase (AKINBIYI; WATSON; FEYI-WABOSO, 2008; ANGOTTI; LAMBERT; SOPER, 2007; CHONG et. al., 2007; EGAN; LIPSKY, 2000). É a infecção mais comum do aparelho genital feminino, caracterizada por uma tríade de sintomas como dor vulvovaginal, prurido e ardor (CAMARGO et al., 2008). A exata prevalência e causa de vulvovaginite são incertas devido às condições de diagnóstico e tratamento, além do fato dela ser assintomática na maioria das vezes e de ter mais de uma causa (RODRIGUES; SIMÕES; DINIZ, 2009).

Nos Estados Unidos e em outros países, a vaginose bacteriana é geralmente a causa mais comum de vulvovaginite, acometendo 40 a 50% dos casos em mulheres na idade fértil. Tem sido encontrada em 15 a 19% das pacientes de ambulatórios de ginecologia, em 10 a 30% de mulheres grávidas e em 20 a 40% das pacientes em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis (AKINBIYI; WATSON; FEYI-WABOSO, 2008). Na Europa e em outros países, a candidíase é a causa mais comum de vulvovaginite e estima-se em todo o mundo que 75% das mulheres apresentam, durante a sua vida, pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal (DALAZEN et al., 2011; ARECHAVALA et al., 2007; CHONG et al., 2007; CHONG et al., 2003; REED et al., 2003). Além disso, 40 a 50% destas mulheres vivenciam novos surtos (DALAZEN et al., 2011) e aproximadamente 5% das mulheres têm episódios de recorrência (WEISSENBACHER et al., 2009; CHONG et al., 2007; EGAN; LIPSKY, 2000;), podendo este índice chegar a 40% (REED et al., 2003). A tricomoníase, causada pelo *Trichomonas vaginalis*, é a terceira causa mais comum de vulvovaginite, afetando 180 milhões de mulheres em todo o mundo, representando de 10 a 25% das infecções vaginais. É uma doença sexualmente transmissível (DST), cuja incidência vem diminuindo na maior parte dos países industrializados (EGAN; LIPSKY, 2000; KLUFIO et al., 1995).

Estima-se que anualmente 6 a 10 milhões de mulheres nos Estados Unidos procuram serviço médico com sintomas de vulvovaginite, cujo padrão de diagnóstico clínico inclui a história e exame físico da paciente, determinação do pH vaginal, teste da amina e exame microscópico do fluido vaginal. Entretanto, aproximadamente 30% das mulheres sintomáticas permanecem sem diagnóstico após avaliação clínica (LOWE; NEAL; RYAN-WENGER, 2009). Alguns autores indicam que o diagnóstico de infecções vaginais não deve se basear apenas nos dados clínicos e que exames microbiológicos devem ser incorporados, quando possível, como complementares ao diagnóstico das vulvovaginites (BUYUKBAYRAK et al., 2010; LOWE; NEAL; RYAN-WENGER, 2009; AKINBIYI; WATSON; FEYI-WABOSO, 2008; KARACA et al., 2005;).

Portanto, o diagnóstico etiológico das vulvovaginites é bastante complexo, variando-se a principal causa da doença de acordo com a região, além dos casos em que o agente causador não é identificado. Estudo realizado na Índia (BANKAR et al., 2012) mostrou essa situação em 43% das mulheres analisadas, taxa superior a de pacientes com candidíase vaginal (30,66%), com vaginose bacteriana (16,66%),

com tricomoníase vaginal (7,30%) e dos casos de associação de *T. vaginalis* e *Candida* (2,0%) encontrados.

## 2.2 Candidíase Vulvovaginal

A candidíase vulvovaginal (CVV) é um dos diagnósticos mais freqüentes na prática ginecológica e sua incidência tem aumentado drasticamente (HOLANDA et al., 2007; CARNEIRO et al., 2006). Atualmente, a CVV é considerada um importante problema de saúde pública mundial por acometer milhões de mulheres anualmente, gerando um intenso desconforto, o que produz uma interferência nas relações afetivas e sexuais, além de comprometer a produtividade da mulher e gerar gastos com o tratamento, que, às vezes, inclui também o do seu parceiro (HOLANDA et al., 2007).

A CVV é uma infecção na mucosa vaginal causada por fungos leveduriformes, considerados saprófitas e oportunistas, que quando em condições favoráveis proliferam-se desencadeando processos infecciosos (CORRÊA et al., 2009). Os fungos do gênero *Candida* são considerados patógenos oportunistas, que dependem de fatores próprios de virulência e fatores predisponentes do hospedeiro para causar infecção. Estes fungos fazem parte da microbiota anfiótica do intestino e da vagina, permanecem neste habitat como colonizadores e, no desequilíbrio homeostático do hospedeiro, se multiplicam excessivamente, expressam os fatores de virulência, invadem a mucosa e causam a infecção (CAMARGO et al., 2008).

O gênero *Candida* está classificado no Domínio Eukarya, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae e inclui várias espécies. Apresentam célula do tipo eucariota, reproduzem-se assexuadamente por brotamento ou gemulação, dando origem aos esporos blastoconídios, e fazem ciclo sexual incompleto. São unicelulares e pleomórficos assumindo forma ovóide ou esférica. Além de colonizarem o homem e outros animais, são encontrados em diversos ambientes, obtendo carbono e nitrogênio por meio de degradação de proteínas e carboidratos. Desenvolvem-se melhor em pH ácido e são Gram-positivo (SIDRIM & ROCHA, 2004; LACAZ et al., 2002). Apresenta-se na forma vegetativa – hifas e pseudo-hifas, que são filamentos que

aderem ao epitélio vaginal –, e na forma reprodutiva – os esporos –, ambos com capacidade de desencadear processos patológicos (BASTOS et al., 2003).

A principal fonte de leveduras é o trato gastrointestinal, que através de transmissão endógena, são auto-veiculadas para a vagina. Essas leveduras penetram na mucosa vaginal podendo desencadear distúrbios imediatos ou constituir reservatório para reinfecções futuras (ÁLVARES; SUIDZINSKI; COMALAVO, 2007). Embora não seja considerada uma doença sexualmente transmissível (DST), sugere-se a transmissão sexual de CVV, pois as mulheres com vida sexual ativa têm uma probabilidade maior de apresentarem a doença e alguns de seus parceiros apresentam balanite fúngica (RAD et al., 2011; AMOURI et al., 2010; ZIMMERMMANN et al., 2009; MALAZY et al., 2007; BASTOS et al., 2003).

### **2.3 Epidemiologia de CVV**

No Brasil, os dados epidemiológicos sobre as reais taxas de ocorrência e prevalência da doença são escassos (PEREIRA et al., 2012; ROSA; RUMEL, 2004.). *Candida albicans* é o agente infeccioso em 80 a 90% das pacientes e aproximadamente 5% das mulheres tem episódios de recorrência (WEISSENBACHER et al., 2009; ÁLVARES; SUIDZINSKI; COMALAVO, 2007; CHONG et al., 2007; EGAN; LIPSKY, 2000). De acordo com Reed e colaboradores (2003), o índice de recorrência da candidíase vulvovaginal pode chegar a 40%.

A CVV afeta principalmente mulheres em idade fértil, sendo as pacientes da faixa etária de 20 a 40 anos as mais acometidas pela doença (PEREIRA et al., 2012; RAD et al., 2011; AMOURI et al., 2010; BUYUKBAYRAK et al., 2010; AHMAD; KHAN, 2009; ANDRIOLI et al., 2009; COORÊA et al., 2009; LOWE; NEAL; RYAN-WENGER, 2009; ZIMMERMMANN et al., 2009).

A correlação de CVV com a cor da pele das pacientes é controversa, sendo, às vezes, encontrado um predomínio da doença entre as mulheres pardas (BASTOS et al., 2003), ou caucasianas (REED et al., 2003) ou de cor preta (LOWE; NEAL; RYAN-WENGER, 2009). Também é controversa a relação entre escolaridade e a ocorrência de CVV. Em um estudo (AHMAD; KHAN, 2009), não foi observada diferença estatística significativa entre letradas (20%) e iletradas (20,7%), enquanto em outro (MALAZY et al., 2007) a doença foi diagnosticada principalmente em pacientes iletradas ou com educação primária incompleta. Já Lowe, Neal e Ryan-

Wenger (2009) apontaram um predomínio da doença entre as pacientes que possuíam o ensino médio. Entretanto, em outras situações (REED et al., 2003; XUEQIANG et al., 2007) foi encontrada uma frequência maior de CVV entre as mulheres com maior número de anos de educação formal.

Poucos são os levantamentos de CVV em que se avalia o estado civil das pacientes. Alguns autores (CORRÊA et al., 2009; REED et al., 2003,) indicaram um predomínio de CVV entre as mulheres casadas (56,5%), enquanto Bastos e colaboradores (2003) observaram o predomínio entre as solteiras. Entretanto, Lowe, Neal e Ryan-Wenger (2009) encontraram praticamente a mesma proporção da doença entre as solteiras (39,6%) e as casadas (39,8%). Investigação sobre vulvovaginites em mulheres casadas realizada numa área rural da China evidenciou que ter parceiro sexual extraconjugal representou um fator de risco para CVV (XUEQIANG et al., 2007).

## 2.4 Etiologia de CVV

A prevalência de *Candida albicans* na etiologia da CVV é relatada de forma abundante na literatura, embora a ocorrência de outras espécies, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* tem sido cada vez mais frequente (BANKAR et al., 2012; RAD et al., 2012; ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010; AMOURI et al., 2010; AHMAD; KHAN, 2009; ANDRIOLI et al., 2009; CORRÊA et al. 2009; ESMAEILZADEH et al., 2009). Além disso, outras espécies têm sido apontadas como emergentes em vários estudos, como é caso da *C. krusei* (ESMAEILZADEH et al., 2009; ARECHAVALA et al., 2007; OZCAN et al., 2006; RICHTER et al., 2005; CHONG et al., 2003), *C. kefyr* (GARCÍA HEREDIA et al, 2006; RIVERO; CENTENO; DIAZ, 2003) e *C. lusitaniae* (FERRAZA et al., 2005; NAMKINGA et al., 2005; RICHTER et al., 2005; CHONG et al., 2003;).

A participação de mais de uma espécie de *Candida* na etiologia de CVV é relatada por diversos autores (RAD et al., 2011; ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010; AMOURI et al., 2010; ESMAEILZADEH et al., 2009; ARECHAVALA et al., 2007; BOATTO et al., 2007; HOLANDA et al., 2007; RICHTER et al., 2005; RIBEIRO et al., 2000). Além de *Candida*, outras leveduras têm sido isoladas de pacientes com manifestações clínicas de vulvovaginites, destacando-se os gêneros *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces* (ÁLVARES; SUIDZINSKI; COMALAVO, 2007). A



espécie *Trichosporon asahii* foi isolada de uma paciente com vaginite micótica (ARECHAVALA et al., 2007). Andrioli e colaboradores (2009) e Ferrazza e colaboradores (2005) observaram em paciente com suspeita de CVV infecção mista por *Trichosporon sp.* e *Rhodotorula sp.*, sendo também registrada, em outro estudo, associação de *Trichosporon sp.* e *Saccharomyces cerevisiae* (RICHTER et al., 2005). A análise dos resultados de colpocitologia oncológica numa clínica de DST apontou associação entre candidíase e vaginose bacteriana, entre candidíase e tricomoníase, entre candidíase e processo inflamatório bacteriano e entre candidíase e alterações sugestivas de HPV, demonstrando que 26,5% das portadoras de CVV apresentaram associações de *Candida sp.* com outros micro-organismos (BASTOS et al., 2003).

## 2.5 Etiopatogenia de CVV

A CVV é uma das formas mais comuns de infecção oportunista e a transformação da condição assintomática para a sintomática indica uma transição da forma saprófita de *Candida albicans* para a forma patogênica. Entretanto, os fatores responsáveis por essa transformação e os mecanismos que resultam no efeito patogênico de *C. albicans* são pouco conhecidos (RODRIGUES; SIMÕES; DINIZ, 2009).

A patogenicidade de *Candida spp.* depende de alguns fatores de virulência, dentre os quais destacam-se a capacidade de crescer a 37<sup>0</sup> C, a formação de hifas e pseudo-hifas, a produção de fosfolipases e proteinases e as mananas que promovem a depressão da imunidade (CAMARGO et al., 2008). Outros fatores como atividade hemolítica e resistência ao peróxido de hidrogênio são ainda pouco estudados, principalmente de isolados vaginais. Por outro lado, a defesa vaginal contra infecções é determinada por alguns fatores, como o equilíbrio microbiológico, a integridade da mucosa, a presença das imunoglobulinas A e G, dos polimorfonucleares e monócitos (RODRIGUES; SIMÕES; DINIZ, 2009). Carvalho e colaboradores (2003) encontraram uma resposta acentuada de anticorpos anti-*C. albicans* no lavado vaginal de mulheres sintomáticas, comprovando o importante papel destes anticorpos (IgA, IgG1 e IgG4) na resposta imune local na presença do fungo.

A resposta imune celular é um dos principais mecanismos de proteção da mucosa vaginal mediante desenvolvimento de resposta imune local. As células de defesa controlam o crescimento fúngico por meio da ativação de mecanismos de fagocitose, que é eficaz na eliminação do fungo. Havendo falha da imunidade celular, com a exposição da mucosa vaginal aos antígenos, pode ocorrer o desenvolvimento de infecções vaginais. A instalação das vulvovaginites e a sua recorrência devem-se provavelmente às alterações da imunidade local, demonstrando a importância da resposta imune na manutenção do equilíbrio vaginal (GIRALDO et al., 2006).

Na patogenia da candidíase, o processo de adesão do fungo à superfície epitelial é fundamental e se dá pela união do conídio a um receptor de membrana. Uma vez aderidos, os conídios são incapazes de penetrar no epitélio vaginal, sendo necessária a sua germinação, desenvolvendo as pseudo-hifas (HOLANDA, 2007). A associação de sintomas clínicos com a produção de tubo germinativo pela levedura tem sido demonstrada, e o achado de filamentos acompanhando os blastoconídios no exame microscópico direto é um índice da capacidade invasiva de *C. albicans* (RODRIGUES; SIMÕES; DINIZ, 2009). Segundo Ribeiro e colaboradores (2000), as pacientes assintomáticas apresentam um pequeno número de leveduras, principalmente na forma de blastoconídios, enquanto as sintomáticas apresentam pseudo-hifas e micélio.

## **2.6 Fatores Predisponentes de CVV**

De maneira geral acredita-se que a CVV é associada a situações de debilidade do hospedeiro, como neoplasias e imunodeficiências, e diversos autores apontam como fatores predisponentes o uso de antibióticos, de imunossupressores, de antineoplásicos, estrogenterapia, pequenos traumas ocasionados durante o ato sexual, o uso de roupas de fibras sintéticas e muito justas, e dieta alimentar muito ácida (PEREIRA et al., 2012; RAD et al., 2011; ÁLVARES; SUIDZINSKI; COMALAVO, 2007; HOLANDA et al., 2007; ROSA; RUMEL, 2004; SUÁREZ; LANCHÁ, 2004), além de alergias (rinite e asma brônquica) e uso de dispositivo intrauterino (HOLANDA et al., 2007; SUÁREZ; LANCHÁ, 2004). Especula-se que hábitos de higiene anal inadequados possam ser possíveis fatores predisponentes da contaminação vaginal, e os resíduos de fezes na roupa íntima poderiam ser a

origem das leveduras no desenvolvimento da candidíase vulvovaginal (HOLANDA et al., 2007; ROSA; RUMEL, 2004).

Qualquer alteração dos níveis de glicose, especialmente em situações de hiperglicemia, e qualquer estado em que se produz elevação do glicogênio vaginal pode desencadear CVV, incluindo, assim, diabetes entre os fatores de risco para a doença. O excesso de glicogênio aumenta o substrato nutritivo dos fungos, promovendo incremento na sua capacidade de adesão (ÁLVARES; SUIDZINSKI; COMALAVO, 2007).

A presença de ciclos menstruais regulares tem sido identificada como fator relevante de risco para a CVV, com maior incidência de casos a partir do pico de estradiol. A gravidez, o uso de contraceptivos orais de altas doses e a terapia de reposição hormonal, por serem situações de hiperestrogenismo, determinam altos níveis de glicogênio, favorecendo o desenvolvimento da infecção (HOLANDA et al., 2007; SUÁREZ; LANCHÁ, 2004,). A CVV ocorre em cerca de 30% das gestantes, principalmente no terceiro trimestre. Embora a prevalência seja elevada, a doença não está relacionada a complicações perinatais relevantes (CORRÊA et al., 2009; BASTOS et al., 2003).

## **2.7 Aspectos clínicos de CVV**

Clinicamente a CVV caracteriza-se por prurido, ardor, dispareunia e corrimento vaginal branco, espesso, inodoro e em grumos, semelhante à nata de leite. Com freqüência, a vulva e vagina encontram-se edemaciadas e hiperemiadas, acompanhadas geralmente de ardor ao urinar e sensação de queimadura. As lesões podem estender-se pelo períneo, região perianal e inguinal e, em casos típicos, nas paredes vaginais e no colo do útero aparecem pequenos pontos branco-amarelados. Dentre os dados clínicos das pacientes com CVV, destacam-se o prurido, corrimento, eritema e edema (BOATTO et al., 2007; HOLANDA et al., 2007) e se intensificam no período pré-menstrual, quando a acidez aumenta (ÁLVARES; SUIDZINSKI; COMALAVO, 2007). De acordo com Boatto e colaboradores (2007), o prurido e o corrimento foram os dados clínicos mais relevantes, seguidos de eritema e edema. Os autores observaram também que em 52% das pacientes avaliadas obteve-se o isolamento de *Candida* e que não houve correlação entre as leveduras isoladas e os sintomas apresentados. Holanda e colaboradores (2007) observaram

em pacientes portadoras de *C. albicans* que as queixas de prurido, leucorréia e eritema estão presentes em, respectivamente, 82%, 94% e 62% dos casos, queixas estas que não foram encontradas em pacientes portadoras de outras espécies de *Candida*. Clinicamente, a CVV por *C. albicans* é indistinguível daquela por espécies não-*albicans*, causando sintomatologia muito semelhante. Todavia, tem sido relatado que *C. albicans* está mais associada com os sintomas do que as amostras não-*albicans*, as quais são mais resistentes às terapias habituais (RODRIGUES; SIMÕES; DINIZ, 2009).

De maneira geral, a queixa de prurido tem sido apontada como a mais importante em pacientes com CVV, o que permite uma diferenciação com as vaginites de outras etiologias, nas quais a mesma é menos freqüente. Segundo alguns autores, a literatura refere que as espécies de *Candida* não-*albicans* apresentam importante associação com ausência de sintomas, algo em torno de 44% dos casos (HOLANDA et al., 2007). De acordo com os dados obtidos por Suárez e Lancha (2004), prurido e ardor foram apontados como sintomas estatisticamente significativos.

A freqüência de sintomas como prurido, irritação, leucorréia e dispareunia é desconhecida e inespecífica, e, por isso, o autodiagnóstico e o diagnóstico por médicos sem confirmação laboratorial são inseguros. O manejo da CVV permanece empírico, baseado no consenso de que a vulvovaginite não acarreta risco de vida e que o tratamento empírico não é prejudicial (ROSA; RUMEL, 2004). Não existem manifestações clínicas patognomônicas de candidíase vulvovaginal, tornando-se importante identificar o agente etiológico para o diagnóstico diferencial de outras vaginites infecciosas (AHMAD & KHAN, 2009; ANDRIOLI et al., 2009; ROSA; RUMEL, 2004;) . Além disso, tem sido observado um aumento na resistência aos derivados azólicos, principalmente entre as espécies de *C. não-albicans* isoladas de pacientes com CVV, sendo este um importante fator para o desenvolvimento dos casos de recorrência (BANKAR et al., 2012; RAD et al., 2012; GROSS et al., 2007; FERRAZZA et al., 2005).

## **2.8 Diagnóstico de CVV**

O padrão de diagnóstico clínico de CVV inclui a história e exame físico da paciente, determinação do pH vaginal, teste da amina para exclusão da vaginose

bacteriana e exame microscópico do fluido vaginal. Entretanto, aproximadamente 30% das mulheres sintomáticas permanecem sem diagnóstico após avaliação clínica (LOWE; NEAL; RYAN-WENGER, 2009). Recomenda-se que o diagnóstico de infecções vaginais não deva se basear apenas nos dados clínicos e que exames microbiológicos como cultura e teste de susceptibilidade a drogas devem ser incorporados, quando possível, como complementares ao diagnóstico das vulvovaginites (BUYUKBAYRAK et al., 2010; AKINBIYI; WATSON; FEYI-WABOSO, 2007; KARACA et al., 2005; LINHARES et al., 2001;). Karaca e colaboradores (2005), ao compararem a acurácia do diagnóstico clínico com os resultados microbiológicos nas infecções vaginais, verificaram que 43,2% deles foram confirmados pelos exames laboratoriais, sugerindo, assim, que o diagnóstico clínico é insuficiente e que deve ser confirmado com testes microbiológicos.

Os métodos diagnósticos mais utilizados para a CVV são o exame direto a fresco com salina ou com KOH (20 a 40%), ou corado (Papanicolaou, Gram, Giemsa ou Azul de Cresil), do conteúdo vaginal (CARNEIRO et al., 2006). De acordo com Bankar e colaboradores (2012) a técnica com KOH é mais sensível que a salina na observação de leveduras ou de hifas e que a eficácia da preparação com potassa é a mesma da coloração de Gram na detecção de *Candida*. Entretanto, estes mesmos autores observaram que a eficiência máxima na confirmação de todos os casos de CVV foi obtida com a cultura da levedura em Agar Sabouraud. A identificação da espécie envolvida não tem sido empregada na prática diária e, segundo alguns autores, é indicada nos casos em que a sintomatologia é muito sugestiva e todos os exames anteriores apresentaram-se negativos, ou na recorrência, para identificar a espécie responsável pelo processo (CARNEIRO et al., 2006).

Ultimamente, tem crescido o interesse na utilização da citologia de Papanicolaou no diagnóstico de algumas infecções cérvico-vaginais associadas a patógenos de transmissão sexual, por se tratar de técnica sensível, barata e altamente reprodutível. No caso de CVV, ela permite a observação de leveduras e de pseudo-hifas, e também de alterações celulares que indicam inflamação e/ou infecção. Sugere-se que a citologia possa ser considerada um método morfológico com eficiência muito semelhante à técnica de coloração de Gram para detectar fungos vaginais, tornando-a perfeitamente aplicável na rotina laboratorial para este diagnóstico (CARNEIRO et al., 2006). Como as técnicas microbiológicas e moleculares são dispendiosas, e o exame de Papanicolau, preventivo de câncer

ginecológico, é rotineiramente realizado, utiliza-se a citologia como um bom método para o diagnóstico etiológico das vulvovaginites, em especial para CVV (PEREIRA et al., 2012; MARTINS et al., 2007; BASTOS et al., 2003).

O método convencional de identificação de espécies de *Candida* é baseado no isolamento do fungo em meios de cultura, como o agar Sabouraud, e análise da macro e micromorfologia colonial e do perfil bioquímico, por meio de testes de assimilação e fermentação de açúcares (RAD et al., 2012; ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010; BOATTO et al., 2007). Os procedimentos laboratoriais para identificação fúngica, embora simples, requerem pessoal técnico habilitado e as espécies do gênero *Candida*, geralmente, crescem bem em meios de composição relativamente simples, desenvolvendo colônias com um aspecto característico. Na sua maioria, produzem colônias glabras, de coloração branca ou bege, úmida e cremosa ou, às vezes, rugosa e seca, com odor característico. Ao microscópio óptico, observam-se células globosas, ovaladas ou alongadas, medindo, em média, de 3 por 7µm a 3 por 14µm, algumas apresentando brotamentos e pseudo-hifas (SIDRIM; ROCHA, 2004; LACAZ et al., 2002). Na década de 1990 surgiram os meios de cultura cromogênicos, que possuem alta sensibilidade e especificidade na diferenciação de algumas espécies de *Candida* e têm sido muito utilizados na identificação presuntiva, tornando o diagnóstico mais rápido e possibilitando a detecção de infecções mistas (RAD et al., 2011; BOATTO et al., 2007).

#### 2.8.1 – Novas ferramentas e abordagens para estudo de *Candida*

Metodologias moleculares estão sendo desenvolvidas com o objetivo de acelerar e de realizar de forma mais segura os processos de identificação das espécies fúngicas, devido à imprecisão e demora dos testes fenotípicos tradicionais. As técnicas de PCR e o nested-PCR identificam as espécies de *Candida sp* por meio da amplificação de regiões específicas (ITS1 e ITS2) dos fungos patogênicos. Pela técnica de PCR, os oligoiniciadores identificam espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* (ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010). De acordo com Oliveira e colaboradores (2006), a técnica de semi-nested PCR pode ser utilizada diretamente em amostras clínicas, tornando mais rápido o processo de identificação das espécies de levedura, mas tem uma limitação, pois permite a identificação de somente quatro espécies de

*Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilopsis*). O Multiplex PCR tem se mostrado um método rápido e confiável para identificar as espécies de *Candida*, permitindo a detecção de mais de uma espécie numa amostra simultaneamente (RAD et al., 2012) e mais sensível do que a cultura na detecção do fungo na vagina (WEISSENBACHER et al., 2009). Apesar de serem técnicas sensíveis, o custo é elevado, limitando o seu uso na rotina laboratorial (ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010).

Os métodos tradicionais de identificação das espécies de *Candida* são geralmente baseados em características fenotípicas e, além de demorados, podem conduzir a resultados inconsistentes devido à expressão variável de tais características (ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010). Entretanto, a identificação rápida e confiável das espécies do gênero *Candida* é importante para que sejam tomadas decisões terapêuticas adequadas (VALÉRIO, WEIKERT-OLIVEIRA; RESENDE, 2006), uma vez que o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos tem sido altamente variável entre as diferentes espécies (DALAZEN et al., 2011).

Em outra abordagem, para estudo de diversidade ecológica e clonalidade na investigação de surtos e epidemias, ferramentas moleculares têm sido apontadas como de grande utilidade. Além da técnica de RAPD, são também utilizadas a PCR-RFLP (PCR associada ao polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição), a PFGE (eletroforese de campo pulsado) e a AP-PCR. Para o estudo de diversidade de *Candida*, a técnica de RAPD é reconhecida pela capacidade de discriminação de variabilidade genômica dentro do gênero *Candida*, tendo a vantagem de ser o processo menos árduo entre os diferentes métodos de tipagem, necessitar de pequenas quantidades de DNA e ser de fácil padronização entre os laboratórios, além de ser técnica rápida, econômica e com alta reprodutibilidade. (PINTO et al., 2004). Contudo, nesta metodologia, alguns fatores podem influenciar o sucesso da reação e a sua reprodutibilidade, como por exemplo, a temperatura de pareamento dos oligoiniciadores, a duração entre os intervalos de desnaturação, pareamento e extensão das cadeias de DNA, a concentração e a qualidade do DNA, a concentração de íons Mg, a sequência e a concentração do iniciador e número de ciclos do PCR (WELSH et al., 1990; WILLIAMS et al., 1990).

A literatura tem registrado alguns estudos de genotipagem de *Candida* isoladas de espécimes clínicos ou de outros materiais biológicos. Estes estudos são particularmente importantes em CVV para avaliação da clonalidade entre linhagens

recuperadas de episódios recorrentes, que podem estar associados ao fenômeno da resistência microbiana às drogas. Portanto, estudos moleculares são importantes para sustentar a epidemiologia da circulação de linhagens características entre populações susceptíveis (BARROS et al., 2008; CHONG et. al., 2007; DURÁN et. al., 2007; SILVA et. al., 2007; VALÉRIO et al., 2006; WENJIN; YIFU, 2006; LIAN et. al., 2004; PINTO et al., 2004; CHONG et. al., 2003; NAGLIK et. al., 2003; DANIELS et. al., 2001; WILLINGER et. al., 1994).

## 2.9 Tratamento de CVV

O tratamento da CVV normalmente é empírico, sendo os derivados azólicos e os poliênicos as drogas mais utilizadas (GROSS et al., 2007; RICHTER et al., 2005; RIBEIRO et al., 2000). Dentre eles destacam-se os imidazólicos como o miconazol, clotrimazol e cetoconazol e os triazólicos, como fluconazol e itraconazol, além dos agentes poliênicos como a nistatina e a anfotericina B (DALAZEN et al., 2011; FERRAZZA et al., 2005; GALLE; GIANINNI, 2004).

No entanto, alguns estudos apontam resistência de espécies de *Candida* frente a alguns derivados azólicos e poliênicos. Atualmente, verifica-se que o amplo emprego destes no tratamento de infecções fúngicas favoreceu a seleção de linhagens com reduzida susceptibilidade, ou até mesmo a manifestação do fenótipo resistente. Por sua vez, o perfil de susceptibilidade de espécies de *Candida* aos antifúngicos não é o mesmo nas diferentes populações ou comunidades, o que torna fundamental a identificação do agente etiológico causador da candidíase antes de iniciar a terapêutica empírica (DALAZEN et al., 2011; GROSS et al., 2007; FERRAZZA et al., 2005; RICHTER et al., 2005; GALLE & GIANINNI, 2004; RIBEIRO et al., 2001;). A maioria das mulheres com CVV não responde à terapia inicial e os casos de recidivas são frequentes, colocando em dúvida a eficácia desses tratamentos (FERRAZZA et al., 2005).

O amplo emprego de antifúngicos azólicos, como profilaxia para pacientes imunocomprometidos, tem favorecido a resistência aos antifúngicos, principalmente por espécies de *C. não- albicans* (DALAZEN et al., 2011). Observa-se que a recorrência e resistência da CVV acontecem, principalmente, nas pacientes que apresentam um aumento discreto na prevalência de *C. glabrata*, uma vez que esta espécie, ao contrário da *C. albicans* que é sensível ao fluconazol, cetoconazol,



itraconazol e nistatina, demonstra resistência aos fármacos imidazólicos mais comumente utilizados na terapêutica. (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; GARCIA HEREDIA et al., 2006). Assim, se for constatada falha no tratamento e também a presença de infecções crônicas e recidivantes, deve-se suspeitar da presença da *C. glabrata* (GARCIA HEREDIA et al., 2006). Porém, a dificuldade neste tratamento não está somente relacionada à susceptibilidade das leveduras aos antifúngicos, já que há uma tendência das espécies *C. não-albicans* dependerem de maiores concentrações de antifúngicos para serem inibidas (RODRIGUES; SIMÕES; DINIZ, 2009; FERRAZZA et al., 2005).

Os testes de susceptibilidade podem proporcionar a seleção do agente antifúngico mais adequado para o tratamento de candidíase, principalmente nos casos mais graves, permitindo desta forma conhecer e monitorar a resistência desses fármacos na população atendida. No entanto, a utilização de testes de susceptibilidade a antifúngicos na rotina não é muito comum e clinicamente é limitado, devido ao seu alto custo e por ser uma técnica trabalhosa, levando à demora na liberação dos resultados (DALAZEN et al., 2011; FERRAZZA et al., 2005).

Considerando que a variação das espécies de acordo com a localização geográfica deve ser levada em conta entre os fatores epidemiológicos de CVV (ANDRIOLI et al, 2009; HOLANDA et al., 2007; FERRAZA et al., 2005), e que os dados epidemiológicos sobre a doença no Brasil são escassos (PEREIRA et al., 2012; ROSA; RUMEL, 2004), pesquisas regionais são necessárias para a determinação do envolvimento de diferentes espécies de *Candida* na etiologia da CVV, ajudando no tratamento e manejo clínico dessa patologia (RODRIGUES; SIMÕES; DINIZ, 2009).

De acordo com a literatura disponível, existe uma carência de conhecimento científico regional sobre a ocorrência de CVV, embora alguns estudos realizados em Juiz de Fora tenham sido apresentados em eventos científicos na década de 90 (PAVIATO et al., 1995; RODRIGUES et al., 1995; ZIMMERMANN et al., 1995).

A proposta ora apresentada poderá suscitar discussões, sobretudo relacionadas ao tratamento empírico, atualmente, considerando-se limitações na disponibilidade de diagnóstico ou mesmo terapia antimicrobiana. Frente ao exposto, considerando que a CVV representa um importante problema de saúde pública mundial e com o intuito de contribuir para um maior conhecimento sobre a

epidemiologia da CVV, é proposto o presente trabalho, a ser desenvolvido com pacientes na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais.

Este estudo está inserido na linha de pesquisa “Caracterização fisiológica, molecular e epidemiológica de bactérias e fungos clinicamente relevantes isolados de seres humanos e outros animais”, em desenvolvimento no Núcleo de Pesquisas em Doenças Infecto-parasitárias do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, e pretende contribuir com dados epidemiológicos sobre doenças fúngicas de origem cérvico-vaginais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar possíveis associações entre cultura de secreção vaginal, características sociodemográficas, manifestações clínicas e diversidade genética de leveduras recuperadas de pacientes com diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Isolar amostras de leveduras de secreção vaginal de pacientes com diagnóstico clínico de CVV, atendidas na rede particular e/ou conveniada em Juiz de Fora, Minas Gerais;
- Realizar inquérito sociodemográfico e clínico nas pacientes participantes do estudo;
- Identificar, por metodologia molecular, as leveduras isoladas a partir da secreção vaginal das pacientes;
- Investigar possíveis correlações entre cultura positiva, características sociodemográficas e situações clínicas associadas a fatores de risco e sinais e sintomas;
- Genotipar as amostras de *Candida* e correlacionar os genótipos encontrados com a origem das leveduras e características sócio-demográficas e clínicas nas pacientes.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Desenho experimental e espécimes clínicos

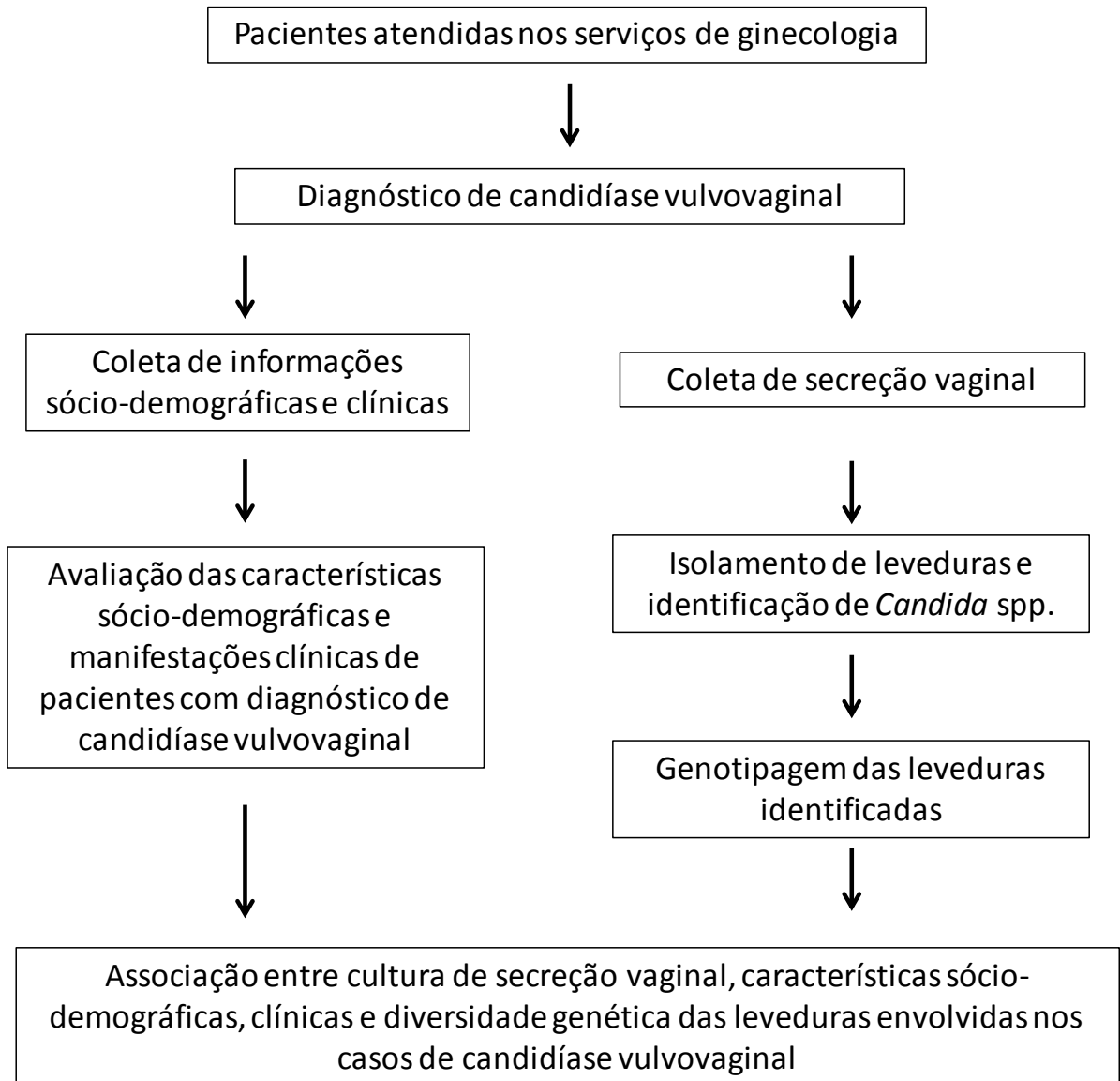
Trata-se de um estudo descritivo, observacional, transversal, realizado com amostras de conveniência. A população amostrada foi composta por 69 pacientes com diagnóstico clínico de CVV recrutadas entre dezembro de 2009 e dezembro de 2011, em dois consultórios da rede particular e/ou conveniada e em um ambulatório de hospital da rede pública (Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus) em Juiz de Fora, Minas Gerais, durante consulta ginecológica.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, parecer nº 031/2009 (ANEXO A) e todas as pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A). Foram considerados critérios de exclusão: pacientes com diagnóstico clínico de vaginoses bacterianas ou por protozoários.

Um formulário foi preenchido para cada paciente pelo profissional atendente, contendo informações como idade, cor da pele, nível de escolaridade, estado civil, atividade sexual, presença de fatores de risco ou predisponentes para CVV e sinais e sintomas associados (APÊNDICE B).

Amostras de secreção vaginal foram coletadas durante o exame clínico das pacientes, com zaragatoas flexíveis esterilizadas (Alamar Tecnocientífica Ltda., Diadema, Brasil), e imediatamente imersas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) em tubos de ensaio lacrados com rolhas de algodão hidrofóbico. O material foi enviado no mesmo dia ao Laboratório de Micologia Ambiental e Médica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (LMAM/ICB/UFJF) para processamento experimental (Figura 1).

**Figura 1.** Desenho experimental e etapas de desenvolvimento da pesquisa.



## 4.2 Isolamento de leveduras a partir dos espécimes clínicos

Os espécimes clínicos foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar Sabouraud dextrose (Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda., Duque de Caxias, Brasil), suplementado com cloranfenicol (10mg/mL – Northeast General Pharmaceutical Factory, Shenyang, China) e incubados a 35 °C, por um período de 2-7 dias.

Das placas onde houve desenvolvimento de colônias leveduriformes, foram escolhidas para subcultivo no mesmo meio de cultura sem droga antibacteriana, preferencialmente quatro colônias representativas por espécime clínico, quando possível, morfologicamente distintas. Após obtenção de culturas puras, as amostras de leveduras foram depositadas na coleção de culturas do LMAM/ICB/UFJF, criopreservadas e submetidas a procedimento de extração de DNA para identificação molecular.

Amostras de referência (*Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 20298, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida parapsilosis* ATCC 20019 e *Candida glabrata* ATCC 90030) gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Aparecida Resende (ICB/UFMG) foram utilizadas como controle experimental.

## 4.3 Extração de DNA das leveduras isoladas

O DNA genômico das leveduras foi extraído pelo método de digestão química e purificação com fenol-clorofórmio, de acordo com metodologia já estabelecida para obtenção de DNA de leveduras de alto grau de pureza, com modificações (FURLANETO-MAIA et al., 2007).

Assim, a partir de 2,0 mL de uma cultura de 48 horas em caldo Sabouraud (Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda., Duque de Caxias, Brasil), massa celular foi obtida após centrifugação a 12000 x g, por 5 minutos em centrífuga refrigerada (Jouan CR3i, Thermo Electron Corporation, MA, EUA) e as células foram lavadas em igual volume com água destilada previamente esterilizada. Após nova centrifugação nas mesmas condições, a massa celular resultante foi suspensa em 0,5 mL de tampão de lise (Tris HCl pH 8,0 10mM, EDTA 1 mM, NaCl 100mM, Triton X100 2% v/v, SDS 1%), acrescida de pérolas de vidro e submetida a agitação em

vórtex (Coleman Equipamentos para Laboratórios Comércio e Importação Ltda., Santo André, Brasil) por 2 ciclos 1 minuto.

Posteriormente, foram adicionados 0,4 mL de fenol saturado com Tris (1M, pH 8), 0,4 mL de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram novamente agitadas em vórtex, por 10 segundos, e centrifugadas para separação de fases, a 12000 x g, por 5 minutos. A fase aquosa foi retirada e o DNA precipitado após a adição de 0,05 mL de NaCl 5M, 2 volumes de etanol gelado e centrifugação a 12000 x g, por 30 minutos, 4°C.

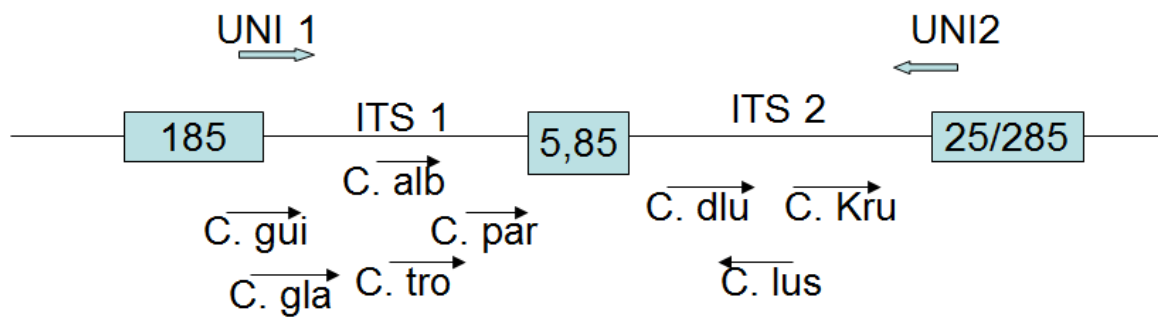
Os extratos foram lavados com etanol 70%, solubilizados, tratados com RNase 1mg/mL e quantificados por espectrofotometria (Qubit 2.0, Fluorometer, Invitrogen, Life Technologies, OR, EUA). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

#### **4.4 Identificação molecular das leveduras**

A identificação microbiana foi realizada por PCR em reações multiplex utilizando-se oligoiniciadores específicos para o gênero *Candida* (*C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. topicalis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*) e oligoiniciadores universais para leveduras clinicamente relevantes, tal como estabelecido na literatura (CARVALHO et al., 2007).

Os oligoiniciadores universais foram usados para amplificação das regiões intergênicas espaçadoras das leveduras patogênicas associadas a doenças humanas, para originar os amplicons esperados na reação de PCR multiplex com os oligoiniciadores espécie-específicos, conforme esquema ilustrado na Figura 2. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial, 10 minutos, 94°C e 40 ciclos de 15 segundos, 94°C; 30 segundos, 55°C; 45 segundos, 65°C, em termociclador Techne® TC-412 (Thermal Cycler, OSA, Reino Unido) (Tabela 1, Figura 3).

**Figura 2.** Estratégia do PCR Multiplex para as espécies de *Candida*. Organização dos genes ribossômicos fúngicos alvos, com os oligoiniciadores universais e espécie-específicos indicados. As setas indicam a direção das ampliações do PCR. ITS: RNA não funcional entre RNAr funcionais.



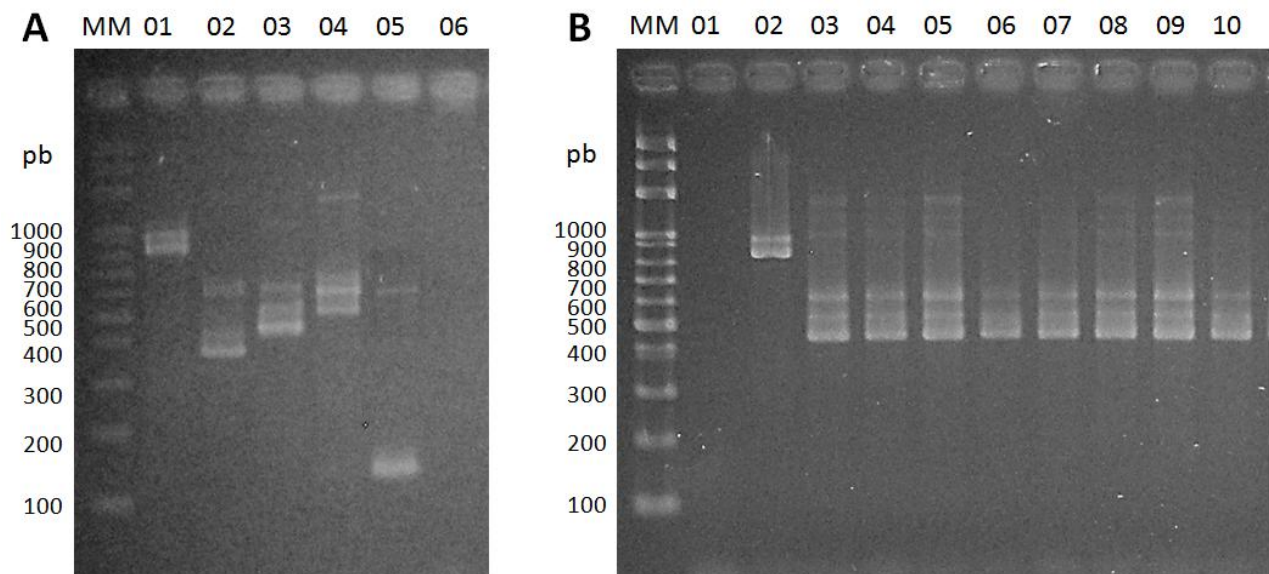


**Tabela 1:** Oligoiniciadores usados para identificação de espécies clinicamente relevantes de *Candida*, tamanhos dos fragmentos esperados visualizados em eletroforese de gel de agarose e condições de amplificação.

Espécie	Oligoiniciadores	Sequência (5' – 3')	Amplicons	Condições de amplificação
Universal para leveduras	UNI1	GTCAAACCTTGGTCATTTA	*	Desnaturação inicial, 10 min, 94°C e 40 ciclos de 15seg, 94°C; 30 seg, 55°C; 45 seg, 65°C
	UNI2	TTCTTTTCCTCCGCTTATTG		
<i>C. albicans</i>	Calb	AGCTGCCGCCAGAGTCTAA	583/446	
<i>C. dubliniensis</i>	Cdub	CTCAAACCCCTAGGGTTTGG	591/217	
<i>C. glabrata</i>	Cgla	TTGTCTGAGCTCGGAGAGAG	929/839	
<i>C. guilliermondii</i>	Cgui	TTCGGAGCAACGCCTAACCG	668/512	
<i>C. krusei</i>	Ckru	GATTTGCTTAATTGCCCCAC	590/169	
<i>C. lusitaniae</i>	Clus	TTCGGAGCAACGCCTAACCG	433/329	
<i>C. parapsilosis</i>	Cpar	TTGGCCTAGAGATAGGTTGG	570/370	
<i>C. tropicalis</i>	Ctro	GTCAACCGATTATTTAATAG	583/507	

\* Os oligoiniciadores universais foram usados para amplificação das regiões intergênicas espaçadoras das leveduras patogênicas associadas a doenças humanas, para originar os amplicons esperados na reação de PCR multiplex com oligoiniciadores espécie-específicos para *Candida* (CARVALHO et al., 2007).

**Figura 3.** Eletroforegramas representativos da identificação molecular de leveduras isoladas de secreção vaginal das pacientes avaliadas com diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal. (A) Padronização da técnica pela utilização de amostras de referência. MM= Marcador molecular, 1kb *ladder*. Canaleta 1 – *Candida glabrata* ATCC 90030 (929/839 pb); canaleta 2 – *C. parapsilosis* ATCC 20019 (570/370 pb); canaleta 3 – *C. albicans* ATCC 18804 (583/446 pb); canaleta 4 – *C. tropicalis* ATCC 750 (583/507 pb); canaleta 5 – *C. krusei* ATCC 20298 (590/169 pb); canaleta 6 – controle negativo. (B) Representativo da identificação de leveduras isoladas da secreção vaginal. MM=Marcador molecular, 1kb *ladder*. Canaleta 1 – Controle negativo; canaleta 2 - *C. glabrata*; canaletas de 3 a 10 - *C. albicans*.



## 4.5 Genotipagem das leveduras

A técnica de RAPD foi utilizada para genotipagem das leveduras representativas isoladas da secreção vaginal das pacientes com diagnóstico clínico de CVV.

Para as reações de genotipagem, utilizou-se o oligoiniciador OPA 03 (5'-AGTCAGCCA C – 3)' (IDT Integrated DNA Technologies) (HANNULA et al., 1997). As reações foram feitas em volumes de 25 µL, contendo 3 µL de DNA molde (30 ng), 12,5 µL de *Gotaq Green Master Mix 2X* (Promega Corporation, Madison WI, USA), 1,0 µL (10µM) de oligoiniciador e 8,5 µL de água ultrapura. As condições de amplificação utilizadas foram: 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguida de 35 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 36°C por 2 minuto e 72°C por 2 minutos, e extensão final de 72°C por 7 segundos. As reações foram realizadas em termociclador (Bioer Genepro).

Os amplicons obtidos em cada reação foram separados em gel de agarose a 1,5%, em TBE 1X a 80 V por 90 minutos. Os géis foram analisados em transluminador de luz ultravioleta, após tratamento com brometo de etídio (0,5 µg/ml).

Após documentação, os perfis de amplificação gênica foram comparados entre as amostras de mesma espécie, entre aquelas isoladas representativas de uma mesma paciente, e globalmente entre as amostras de *C. albicans* isoladas neste estudo, pela análise de dendograma obtido pela utilização do *software Genes* (CRUZ, 2006; CRUZ, 2008).

Desta forma, foi construída uma matriz binária pela atribuição dos parâmetros 1 para a presença e 0 para a ausência de bandas de mesmo tamanho, visualmente detectadas nos géis de agarose e classificadas como majoritárias, isso é, com alta intensidade de fluorescência sob luz ultra violeta após a coloração dos géis com o brometo de etídio. A partir dessa matriz binária, foi construída uma matriz de dissimilaridade, onde o índice de Jaccard foi adotado para estimar a dissimilaridade genética entre as amostras de leveduras estudadas. Para o agrupamento dos dados da matriz foi utilizado o método *Unweighted Pair Group Method* (UPGMA), com análise de *bootstrap* de 1000x.

#### 4.6. Análises estatísticas:

Os dados obtidos foram expressos como média e desvio padrão para variáveis quantitativas e como frequência absoluta e frequência relativa para as variáveis categóricas.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, versão 13.0 para *Windows* (Chicago, IL, EUA) e utilizados os testes t de *Student* para comparação de médias entre amostras independentes. Para verificar associação, utilizou-se o teste exato de Fischer quando possível ou o teste do  $\chi^2$  para variáveis com mais de duas categorias.

O nível de significância adotado foi de 5%, e todos os testes foram bicaudais.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Associação entre cultura de secreção vaginal, características sociodemográficas, situações clínicas associadas a fatores de risco e sinais e sintomas

Entre as pacientes que participaram deste estudo, com diagnóstico clínico de CVV (n=69), a cultura da secreção vaginal permitiu a recuperação de amostras de *Candida* em espécimes clínicos provenientes de 55 participantes, o que corresponde a uma frequência de 79,7% de positividade na cultura.

A idade não foi uma característica que pode ser relacionada com cultura positiva para *Candida spp.*, a partir da secreção vaginal ( $p=0,687$ ), sendo o mesmo observado em relação ao estado civil ( $p=0,130$ ), à etnia ( $p= 0,224$ ) e à escolaridade ( $p=0,147$ ).

Ao serem questionadas sobre a atividade sexual nos últimos 30 dias antes da consulta ginecológica que resultou no diagnóstico clínico de CVV e coleta de espécime clínico para cultura microbiológica, apenas 2 participantes (2,9%) relataram não ter vida sexual ativa, e as 67 pacientes sexualmente ativas (97,1%) informaram ter somente um parceiro sexual. Não foi observada associação entre essas variáveis e o isolamento de leveduras ( $p= 1,000$ ). Os dados sociodemográficos das pacientes participantes deste estudo são apresentados na tabela 2.

**Tabela 2.** Características sóciodemográficas do grupo de pacientes avaliadas.

Variáveis avaliadas	Pacientes no grupo (n=69)	Frequência (%)	Correlação com a cultura fúngica (valor p)
Faixa etária média	28,2 (7,9) <sup>a</sup>	-	0,687 <sup>b</sup>
Estado civil			0,130 <sup>c</sup>
Solteira	30	43,5	
Casada	39	56,5	
Etnia (cor da pele)			0,224 <sup>d</sup>
Branca	55	79,7	
Negra	08	11,6	
Parda	06	08,7	
Escolaridade			0,147 <sup>d</sup>
Superior	40	58,0	
Médio	20	29,0	
Fundamental	09	13,0	
Vida sexual ativa			1,000 <sup>c</sup>
Sim	67	97,1	
Não	02	02,9	

<sup>a</sup> Resultado expresso em média (desvio-padrão); <sup>b</sup> comparação de médias de idade realizada pelo teste t de *Student* para amostras independentes; <sup>c</sup> associação calculada pelo teste exato de Fischer; <sup>d</sup> Associação calculada pelo teste do  $\chi^2$

Embora não tenha sido estabelecida correlação entre cultura positiva para *Candida* e as variáveis clínicas como diabetes ( $p= 0,266$ ), gravidez ( $p= 0,537$ ), soropositividade para HIV ( $p= 1,000$ ), quimioterapia ( $p= 0,203$ ), uso de anticoncepcionais orais ( $p= 1,000$ ), uso de drogas antibacterianas ( $p= 0,372$ ) e uso de droga antitricomonas ( $p= 1,000$ ), observou-se uma associação entre cultura negativa e uso de corticoides ( $p= 0,039$ ), e também com o uso de drogas antifúngicas ( $p= 0,023$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Características clínicas associadas a fatores de risco para candidíase vulvovaginal no grupo de pacientes avaliadas.

Variáveis avaliadas	Pacientes no grupo (n=69)	Frequência (%)	Associação com a cultura fúngica (valor p) <sup>b</sup>
Em gestação	24	34,8	0,537
Diagnóstico de diabetes	05	07,2	0,266
Diagnóstico de AIDS	01	01,4	1,000
Anticoncepcional oral	25	36,2	1,000
Uso de dispositivo intra-uterino (DIU)	00	-	-
Em corticoterapia	02	02,9	0,039
Uso de quimioterápico <sup>a</sup>	01	01,4	0,203
Uso de droga antibacteriana			0,372
Sim	09	13,0	
Não informado <sup>c</sup>	05	07,2	
Uso de droga antifúngica			0,023
Sim	04	05,8	
Não informado <sup>c</sup>	09	13,0	
Uso de droga antitricomonas			1,000
Sim	01	01,4	
Não informado <sup>c</sup>	11	15,9	

<sup>a</sup> Quimioterapia antineoplásica <sup>b</sup> Associação calculada pelo teste exato de Fischer

<sup>c</sup> Categoria excluída para calcular a associação



O diagnóstico clínico da CVV foi realizado no serviço médico considerando-se os sinais observados no exame ginecológico e os sintomas relatados pelas pacientes. O prurido vulvar foi o sintoma mais frequentemente citado pelas pacientes avaliadas (73,9%), seguido por relato de ardência vulvar (63,8%). A maioria das participantes do estudo apresentou fluxo vaginal (97,1%) e hiperemia vulvar (63,8%). Não foram observadas, entretanto, correlações significativas entre a cultura fúngica e os sintomas relatados, sejam prurido ( $p= 0,496$ ), ou ardência vulvar ( $p= 0,350$ ), ou os sinais clínicos avaliados: fluxo vaginal ( $p= 1,000$ ) ou hiperemia vulvar ( $p= 0,350$ ).

A análise do fluxo vaginal revelou que a secreção tinha coloração branca em 88% dos casos, enquanto que secreções de coloração esverdeada, ou amarelada foram observadas em frequências de 2,9%. Além disso, secreções de coloração branco-amarelada, ou branco-esverdeada, ou amarelado-esverdeada também foram observadas (1,4%). Para uma paciente, não foi relatada a coloração do fluxo vaginal durante o exame clínico. Considerando-se o aspecto do fluxo vaginal, essa secreção foi descrita como grumosa em 84,1% dos casos ou fluida em 11,6%. Não foi relatado o aspecto do fluxo vaginal para uma paciente. Não foram observadas correlações significativas entre cultura positiva de *Candida* e coloração ( $p= 0,407$ ) ou aspecto ( $p= 0,187$ ) do fluxo vaginal. Aproximadamente metade das pacientes avaliadas (47,8%) apresentou os 4 sinais e sintomas clínicos avaliados (hiperemia, fluxo vaginal, prurido e ardência), enquanto que apenas fluxo vaginal foi observado em 17,4%. Observou-se ainda que 20,3% e 14,5% das pacientes apresentavam respectivamente, 3 e 2 das manifestações clínicas avaliadas, simultaneamente (Tabela 4).

**Tabela 4.** Manifestações clínicas relacionadas ao diagnóstico de candidíase vulvovaginal no grupo de pacientes avaliadas.

Sinais e sintomas	Pacientes no grupo (n=69)	Frequência (%)	Associação com a cultura fúngica (valor p)
Presença de prurido	51	73,9	0,496 <sup>a</sup>
Relato de ardência vulvar	44	63,8	0,350 <sup>a</sup>
Hiperemia vulvar	44	63,8	0,350 <sup>a</sup>
Ocorrência de fluxo vaginal	67	97,1	1,000 <sup>a</sup>
Cor do fluxo vaginal presente			0,407 <sup>b</sup>
Branco	59	85,5	
Esverdeado	02	02,9	
Amarelado	02	02,9	
Branco-amarelado	01	01,4	
Branco-esverdeado	01	01,4	
Amarelo-esverdeado	01	01,4	
Cor não relatada	01	01,4	
Aspecto do fluxo vaginal presente			0,187 <sup>b</sup>
Grumoso	58	84,1	
Fluido	08	11,6	
Aspecto não relatado	01	01,4	

<sup>a</sup> Associação calculada pelo teste exato de Fischer; <sup>b</sup> Associação calculada pelo teste do  $\chi^2$

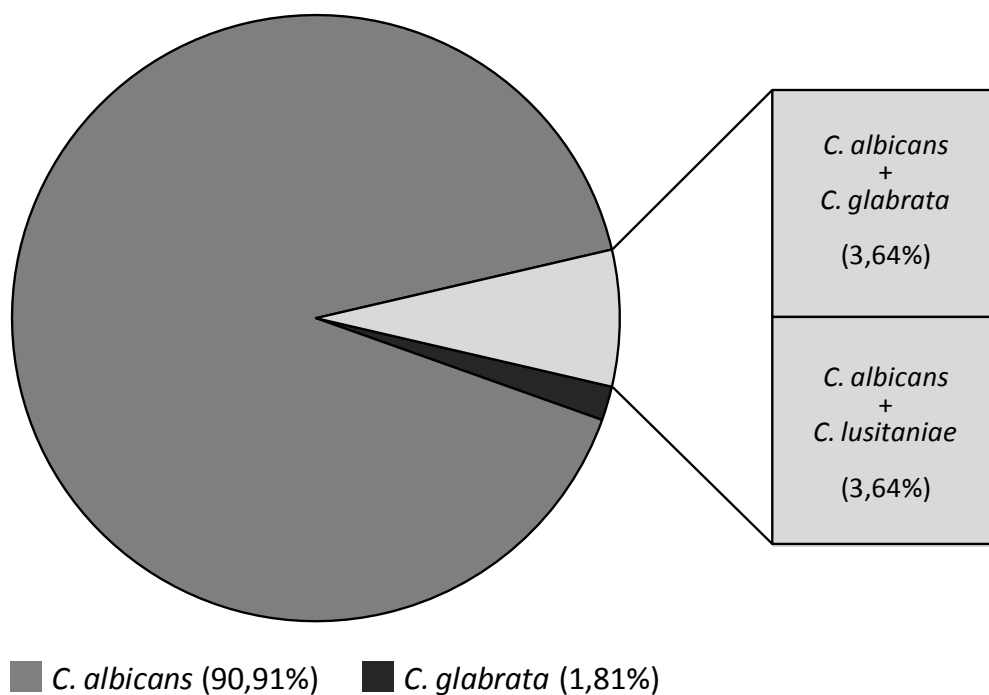
## 5.2 Identificação das leveduras isoladas nas culturas positivas

Entre as amostras de leveduras isoladas (n=211), 3 espécies foram identificadas, sendo a mais prevalente *Candida albicans* (98,1%), isolada de 54 pacientes, seguida por *C. glabrata* (5,4%), isolada de 3 pacientes e *C. lusitaniae* (3,6%), isolada de 2 pacientes.

Dessas mulheres cuja cultura de secreção vaginal foi positiva (n=55), monoinfecção foi observada em 51 pacientes (92,7%), enquanto que infecção polimicrobiana foi observada em quatro (7,3%). Ao se considerar a etiologia das infecções monomicrobianas, *C. albicans* foi a espécie predominante, isolada a partir da cultura da secreção vaginal de 50 dessas pacientes (90,9%). Além disso, *C. glabrata* também foi identificada associada à monoinfecção em 1 paciente (1,8%).

Ao se considerar a etiologia das infecções polimicrobianas, as associações *C. albicans* e *C. glabrata*, ou *C. albicans* e *C. lusitaniae* foram observadas em 2 pacientes (Figura 4).

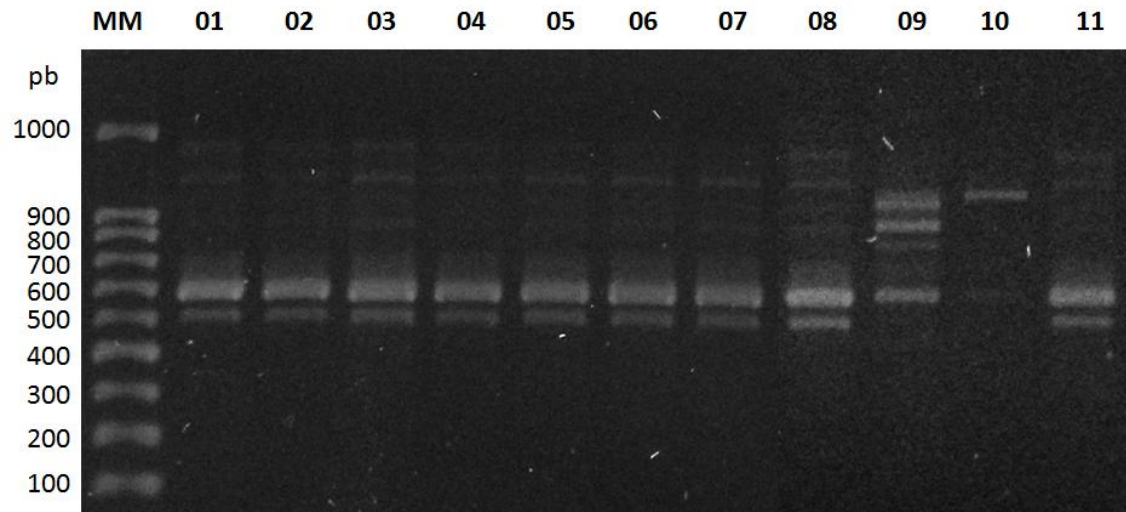
**Figura 4.** Identificação das amostras de *Candida* isoladas de secreção vaginal das pacientes avaliadas com diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal quando as culturas microbiológicas para isolamento de leveduras foram positivas.



### 5.3 Associação entre a diversidade genética das leveduras isoladas e o grupo de pacientes

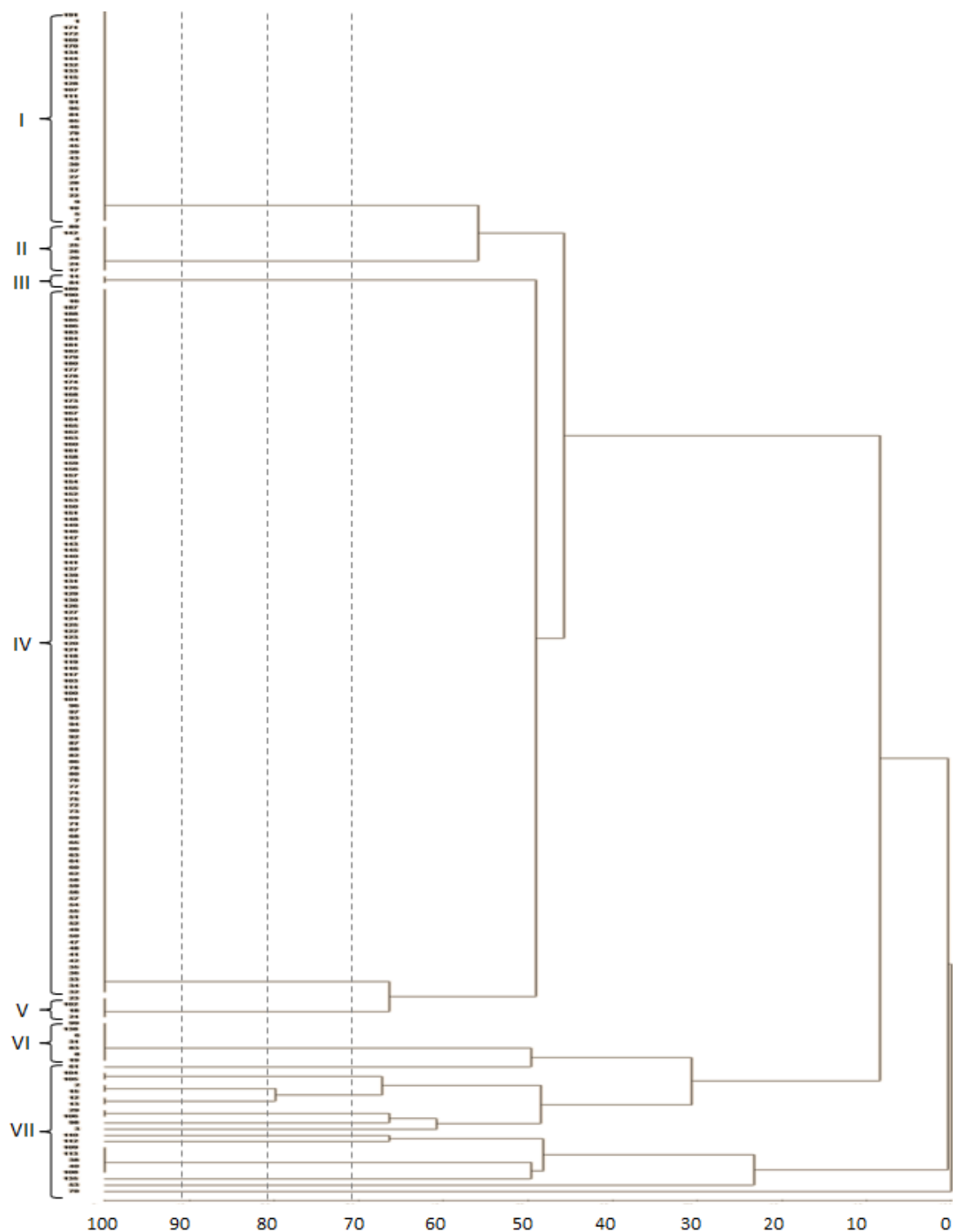
A análise de agrupamento UPGMA dos tipos eletroforéticos gerados pela genotipagem com o oligoiniciador OPA 03 das amostras de *Candida* permitiu discriminar linhagens de *C. albicans* na população amostrada. Foi observada a presença de bandas de DNA polimórfico variando de 200 a 900 pares de bases, totalizando oito marcadores de RAPD (Figura 5).

**Figura 5.** Eletroforegrama representativo da genotipagem das linhagens de *C. albicans* por RAPD, usando-se o oligonucleotídeo iniciador OPA 03. MM = Marcador molecular 100 bp *ladder*. Canaletas de 01 a 11: padrão de bandeamento das amostras clínicas isoladas de pacientes com diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal.



Como um todo foi possível evidenciar sete tipos eletroforéticos (TE) classificados como grupos I a VII, sendo que os grupos I, II, III, IV, V e VI são compostos por linhagens de levedura que apresentam 100% de similaridade genética. No grupo VII foram incluídas as linhagens de levedura altamente polimórficas que apresentaram no máximo 80% de semelhança (Figura 6).

**Figura 6.** Dendrograma de similaridade UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*) resultante da comparação dos perfis eletroforéticos obtidos pela genotipagem das amostras de *C. albicans* isoladas de pacientes com diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal, utilizando o coeficiente de Jaccard com *bootstrap* de 1000 réplicas.



Considerando-se as pacientes com cultura positiva para *C. albicans* observou-se que o TE IV e I foram os predominantes entre as linhagens recuperadas (74,5% e 38,1%, respectivamente). Os outros TEs foram observados em menores frequências entre as pacientes amostradas (Tabela 5).

**Tabela 5.** Frequência de ocorrência dos diferentes tipos eletroforéticos de *Candida albicans* observados entre as pacientes com cultura positiva

Tipo eletroforético	Frequência de observação (%)
I	38,1
II	9,0
III	5,4
IV	74,5
V	7,3
VI	10,9
VII	23,6

Ao avaliar-se a distribuição dos TEs entre as pacientes com pelo menos duas amostras de leveduras isoladas e identificadas como *C. albicans*, observou-se que 45,3% apresentaram infecção por uma mesma linhagem microbiana. Nestes casos, infecção por uma mesma linhagem foi observada majoritariamente por representantes do grupo TE IV. Infecção por duas linhagens de *C. albicans* também foi frequentemente observada, sendo que a combinação de TEs mais representativos foi I e IV. Infecção por mais de duas linhagens distintas de levedura também foi observada sendo que infecção com quatro linhagens foi observada em apenas uma paciente (Tabela 6).

**Tabela 6.** Distribuição de tipos eletroforéticos de *Candida albicans* observados entre as pacientes com cultura positiva e pelo menos duas amostras isoladas\*

Número de tipos eletroforéticos	Pacientes (%)	Combinação de tipos eletroforéticos	Frequência (%)
1	45,3	I	8,3
		IV	91,7
		I e IV	38,1
		I e VI	9,5
		I e VII	19
2	39,6	II e IV	4,7
		II e V	4,7
		III e VII	4,7
		IV e VI	4,7
		IV e VII	14,2
		I, II e IV	14,3
		I, II e V	14,3
3	13,2	I, III e VI	14,3
		I, IV e VII	14,3
		IV, V, VII	14,3
		IV, VI e VII	28,5
4	1,9	II, IV, V, VI	100

\* De 55 pacientes, em duas só foi possível a recuperação de uma amostra representativa de uma colônia na cultura.

Da análise da diversidade fúngica e dos dados sociodemográficos e clínicos das pacientes não foi possível estabelecer nenhuma correlação uma vez que os TE I e IV isoladamente ou associados foram os mais representativos independente das variáveis avaliadas em função do número de pacientes (APÊNDICE C).



## 6 DISCUSSÃO

A queixa de corrimento vaginal é a principal razão que leva mulheres do mundo inteiro a procurar serviços de saúde, sendo as vaginites infecciosas as causas mais comuns (BUYUKBAYRAK et al., 2010; LOWE; NEAL; RYAN-WENGER, 2009). Embora na prática médica o diagnóstico das vulvovaginites seja essencialmente clínico, ele é considerado inadequado, e sugere-se que deve ser confirmado por exames microbiológicos clássicos baseados em cultura ou utilizando-se técnicas moleculares (ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010; BUYUKBAYRAK et al., 2010; LOWE; NEAL; RYAN-WENGER, 2009). Além disso, considerando-se a emergente resistência antimicrobiana, é sugerido o isolamento e identificação da levedura, evitando-se terapias empíricas desnecessárias às pacientes (BANKAR et al., 2012; ANDRIOLI et al., 2009; BOATTO et al., 2007).

A alta frequência de positividade em cultura de leveduras associada às pacientes com diagnóstico clínico de CVV (79,7%) encontrada neste estudo é semelhante à apresentada por outros autores e reforça a necessidade do diagnóstico laboratorial associado ao diagnóstico clínico (BANKAR et al., 2012; LOWE; NEAL; RYAN-WENGER, 2009; LINHARES et al., 2001). Entretanto, percebe-se que o rigor na observação de sinais e sintomas durante o diagnóstico clínico, associado às boas práticas laboratoriais e carga microbiana presente na secreção vaginal, possui grande impacto na correlação entre diagnóstico de CVV e isolamento de leveduras. Vários autores relatam uma baixa frequência de isolamento de fungos (< 50%) em secreção vaginal de pacientes com diagnóstico clínico de CVV (AMOURI et al., 2011; BUYUKBAYRAK et al., 2010; AHMAD; KHAN, 2009; ANDRIOLI et al., 2009; ESMAEILZADEH; OMRAN; RAHMANI, 2009; ZIMMERMANN et al., 2009). De acordo com a literatura, é altamente provável que a maioria das mulheres com queixas vaginais comuns tenha um diagnóstico impreciso, sendo que esse problema permanece como um desafio (BANKAR et al., 2012; LOWE; NEAL; RYAN-WENGER, 2009).

Este estudo, corroborando os dados da literatura nacional e internacional, indica a predominância da espécie *C. albicans* como a mais

frequentemente associada à CVV (RAD et al., 2012; AMOURI et al., 2011; ALVES, CAMARGO; GOULART, 2010; AHMAD; KHAN, 2009; ANDRIOLI et al., 2009; CORRÊA et al., 2009; ESMAEILZADEH; OMRAN; RAHMANI, 2009; GROSS et al., 2007; HOLANDA et al., 2007; RICHTER et al., 2005; CHONG et al., 2003) e *C. glabrata* como a segunda espécie mais prevalente (BANKAR et al., 2012; AMOURI et al., 2011; RAD et al., 2011; ALVES, CAMARGO & GOULART, 2010; AHMAD & KHAN, 2009; CORRÊA et al., 2009; ZIMMERMANN et al., 2009; RICHTER et al., 2005; BASTOS et al., 2003; CHONG et al., 2003; CORSELLO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003; LINHARES et al., 2001). Tem sido registrada a participação de *C. lusitaniae* em infecções tanto mono quanto polimicrobianas, tal como observado neste estudo, considerando-se a etiologia polimicrobiana da CVV (FERRAZA et al., 2005; NAMKINGA et al., 2005; RICHTER et al., 2005; CHONG et al., 2003). Assim, mesmo que essa espécie só tenha sido encontrada em associação com *C. albicans*, há de se registrar a sua emergência na etiopatogenia da doença, suscitando estudos prospectivos para se esclarecer a real participação de *C. lusitaniae* no desenvolvimento da CVV e terapia empírica mais apropriada.

De acordo com a literatura, a taxa de ocorrência de infecção mista em CVV é bastante variada (4 a > 10%) (RAD et al., 2011; RICHTER et al., 2005). A detecção de infecção mista em CVV é possibilitada pela utilização de meios de cultura cromogênicos, ou facilitada pelo isolamento de mais de uma colônia microbiana amostral em cada placa de cultivo, ao se usar meios de cultura não cromogênicos tradicionais, como o ágar Sabouraud dextrose suplementado com cloranfenicol (BOATTO et al., 2007). Na maioria dos casos de infecção mista, são relatadas as associações: *C. albicans* e *C. glabrata*; *C. albicans* e *C. krusei*; *C. albicans* e *C. tropicalis*; *C. albicans* e *C. parapsilosis*; *C. albicans* e *C. tropicalis*; *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*; *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*; *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*; além da associação entre *C. glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae* (RAD et al., 2011; BOATTO et al., 2007; RICHTER et al., 2005). Neste estudo, foi observada, ainda, de maneira incomum, a associação de *C. albicans* e *C. lusitaniae* na secreção vaginal de pacientes com diagnóstico clínico de CVV.

A CVV é relatada principalmente em mulheres que estão em idade reprodutiva, o que também foi observado no presente trabalho. A literatura é unânime em apontar as pacientes com CVV pertencentes à faixa etária de 20 a 40 anos como as mais frequentemente acometidas pela doença (PEREIRA et al., 2012; RAD et al., 2012; AMOURI et al., 2011; BUYUKBAYRAK et al., 2010). Associa-se a esse fato, a atividade ovariana máxima com produção de estrogênio, o que favorece o crescimento de *Candida* e sua aderência às células epiteliais vaginais (BANKAR et al., 2012). A transmissão sexual de CVV é mencionada, apesar de a doença não ser considerada uma doença sexualmente transmissível (DST). Entretanto, a literatura sugere a predominância entre as mulheres que têm vida sexual ativa, tal como observado neste estudo (AMOURI et al., 2011; RAD et al., 2011; ZIMMERMANN et al., 2009; MALAZY et al., 2007; BASTOS et al., 2003; CORSELLO et al., 2003).

Poucos são os relatos envolvendo CVV em que se avalia o estado civil das pacientes. Os achados do presente estudo, como também relatados por outros autores, indicam um predomínio de CVV entre as mulheres casadas (CORRÊA et al., 2009; REED et al., 2003). Apesar disso, existem relatos que sugerem maior frequência de acometimento de CVV entre as mulheres solteiras (BASTOS et al., 2003), ou sem relação com o estado civil (LOWE; NEAL; RYAN-WENGER, 2009). Considerando-se a diversidade étnica e social dos grupos de pacientes amostrados nos estudos de CVV, a relação entre a prevalência da doença ou susceptibilidade à sua ocorrência e a etnia (cor da pele) das pacientes é controversa, não sendo estabelecida, como neste estudo, nenhuma correlação (LOWE; NEAL; RYAN-WENGER, 2009; BASTOS et al., 2003; REED et al., 2003). O mesmo fenômeno é observado em relação à escolaridade das pacientes com diagnóstico clínico de CVV (AHMAD & KHAN, 2009; LOWE; NEAL; RYAN-WENGER, 2009; MALAZY et al., 2007; XUEQIANG et al., 2007; REED et al., 2003). Apesar disso, neste estudo observou-se um predomínio da doença entre as participantes que foram consideradas de cor branca e possuíam o grau universitário.

Várias investigações foram realizadas para se avaliar os potenciais fatores de risco para CVV, mas os dados epidemiológicos são conflitantes e

seu papel na patogênese da doença ainda é controverso (AMOURI et al., 2011). Os fatores predisponentes mais comuns associados com a candidíase são a gravidez, *diabetes mellitus*, uso de contraceptivos, terapia antimicrobiana, atividade sexual e a higiene sexual (BANKAR et al., 2011). Qualquer alteração dos níveis de glicose, especialmente em situações de hiperglicemia, pode desencadear CVV, incluindo, assim, diabetes entre os fatores de risco (BANKAR et al., 2012; RODRIGUES; SIMÕES; DINIZ, 2009; ZIMMERMANN et al., 2009). Assim, diferentes taxas de prevalência de CVV em mulheres com diabetes são registradas (BANKAR et al., 2012; AMOURI et al., 2011; RAD et al., 2011; ZIMMERMANN et al., 2009; GROSS et al., 2007; MALAZY et al., 2007; RICHTER et al., 2005).

Durante a gravidez, o nível elevado de estrogênio contribui para um aumento no conteúdo de glicogênio vaginal, importante fonte de carbono para o desenvolvimento do fungo (BANKAR et al., 2012). Neste estudo, a frequência de pacientes grávidas entre as diagnosticadas com CVV foi semelhante à observada por outros autores (HOLANDA et al., 2007), porém sugere-se que a doença possa ocorrer mais comumente entre as mulheres grávidas do que nas não grávidas (BANKAR et al., 2012; AHMAD; KHAN, 2009). Neste estudo, não foi observada correlação entre cultura de leveduras positiva e gravidez como já relatado (ANDRIOLI et al., 2009), embora essa correlação tenha sido estabelecida anteriormente (LINHARES et al., 2001).

O efeito dos contraceptivos orais na predisposição à CVV é mal compreendido e os resultados das pesquisas são conflitantes. Acredita-se que o elevado teor de estrogênio nos contraceptivos orais pode ser um dos fatores de predisposição, como verificado durante a gravidez (BANKAR et al., 2012). Neste estudo, 36,2% das pacientes com CVV usavam anticoncepcionais orais e não foi observada correlação entre essa variável e a cultura de *Candida*, como observado por outros autores (ANDRIOLI et al., 2009; CORSELLO et al., 2003). Entretanto, há registros de correlação positiva entre o uso de anticoncepcionais hormonais com vulvovaginite clínica, e alguns levantamentos mostram porcentagem maior de mulheres com CVV que usam anticoncepcionais orais (CORRÊA et al., 2009; HOLANDA et al., 2007; ROSA; RUMEL, 2004; BASTOS et al., 2003). A incidência de CVV não parece estar

associada ao uso de DIU (ANDRIOLOI et al., 2009; HOLANDA et al., 2007), embora seja aceito que o aumento do risco de infecção esteja relacionado à elevada capacidade da levedura para a produção de um biofilme no DIU, que poderia atuar como um reservatório de *Candida* (AMOURI et al., 2011).

A CVV pode estar associada a situações de debilidade do hospedeiro, como no caso das pacientes em uso de corticosteroides e agentes citotóxicos, ou a doenças sistêmicas (AIDS, por exemplo) ou hematológicas que promovem a supressão funcional das células T, diminuindo a capacidade de resposta imunológica e favorecendo a infecção (BASTOS et al., 2003). Embora alguns autores tenham relatado baixa frequência de CVV em pacientes que fizeram uso de corticóides (ZIMMERMANN et al., 2009; CORSELLO et al., 2003), neste estudo duas pacientes com diagnóstico clínico de CVV que relataram fazer uso de corticoides tiveram cultura da secreção vaginal negativa para *Candida*. Tal observação pode ser explicada pela pequena amostragem de pacientes nesta situação, ou a presença de outros micro-organismos associados à condição clínica, dado o oportunismo propiciado pela terapia imunossupressora. O mesmo pode ser sugerido ao considerar-se a ausência de correlação entre positividade da cultura e a pequena amostragem de pacientes em uso de quimioterápicos antineoplásicos e com AIDS.

O uso de antibióticos é apontado como responsável por aumentar a taxa de colonização vaginal por *Candida* de 10 a 30%, pois essas drogas agem diminuindo a população bacteriana que geralmente compete com as leveduras da microbiota vaginal (BANKAR et al., 2012; BASTOS et al., 2003). Vários autores evidenciam a susceptibilidade à CVV em pacientes submetidas à antibioticoterapia e frequência de diagnóstico entre essas pacientes em taxas semelhantes às encontradas neste estudo (BANKAR et al., 2012; RAD et al., 2011; AHMAD; KHAN, 2009; GROSS et al., 2007; RICHTER et al., 2005; LINHARES et al., 2001). Embora não existam estudos com abordagem semelhante para comparação, os dados obtidos mostraram correlação entre uso de drogas antifúngicas e cultura negativa de *Candida*. Como esperado, é plausível a sugestão da interferência da droga na recuperação de amostras de *Candida* em cultura, principalmente se o uso da medicação foi em data próxima à obtenção do espécime clínico.

A sintomatologia típica da CVV inclui o prurido e o corrimento vaginal em grumos, semelhante à nata de leite. Outros sintomas também são frequentes como o desconforto vulvar, a dispareunia e a disúria, porém, nenhum deles é específico para CVV (HOLANDA et al., 2007; BASTOS et al., 2003). O prurido, considerado o principal sintoma, exacerba-se mais à noite devido ao calor local, mas, apesar de ser muito frequente, também pode estar presente em outras patologias ginecológicas (BASTOS et al., 2003). Esse foi o principal sintoma relatado neste estudo, como observado por outros autores (AMOURI et al., 2011; AHMAD; KHAN, 2009; ESMAEILZADEH; OMRAN; RAHMANI, 2009; ZIMMERMMANN et al., 2009; BOATTO et al., 2007; CORSELLO et al., 2003). A ardência vulvar, outro sintoma comumente relatado na CVV, foi o segundo sintoma mais observado neste estudo, em concordância com dados da literatura (AMOURI et al., 2011; ROSA; RUMEL, 2004; CORSELLO et al., 2003). Áreas hiperemiadas, principalmente na vulva e vagina, como observadas neste estudo, têm sido relatadas como comuns nas pacientes com CVV, às vezes como sintoma positivamente associado ao diagnóstico (AMOURI et al., 2011; CORRÊA et al., 2009; HOLANDA et al., 2007; ROSA; RUMEL, 2004; CORSELLO et al., 2003), tal como o corrimento vaginal, em algumas situações relatado como única queixa feita pelas pacientes (AMOURI et al., 2011; CORRÊA et al., 2009; ESMAEILZADEH; OMRAN; RAHMANI, 2009; ZIMMERMMANN et al., 2009; BOATTO et al., 2007; HOLANDA et al., 2007; ROSA RUMEL, 2004; BASTOS et al., 2003; CORSELLO et al., 2003).

Apesar da literatura escassa que aborde aspecto e coloração do fluxo vaginal e sua correlação com a CVV, os dados obtidos mostram-se semelhantes ao descrito por outros autores (ZIMMERMMANN et al., 2009; ROSA; RUMEL, 2004; BASTOS et al., 2003), sem relações fisiopatológicas estabelecidas. Os resultados observados neste estudo apontam, no entanto, para a necessidade de uma abertura científica e clínica que busque aprofundamento na investigação sobre o aspecto e a coloração do fluxo, à medida que outras características, diferentes daquelas classicamente descritas (corrimento vaginal em grumos, semelhante à nata de leite) foram observadas na população amostrada.

Além disso, em oposição à observação majoritária de ocorrência e relato de mais de um sinal e sintoma clínico entre as pacientes diagnosticadas com CVV, dados da literatura apontam prurido ou ardência, como manifestação clínica única predominante entre as pacientes com diagnóstico de CVV (GROSS et al., 2007).

A técnica de RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) é simples e rápida para análise de polimorfismo de DNA, pode ser utilizada como um indicador acurado das distâncias genéticas entre linhagens microbianas e adequada para identificação e diferenciação de *C. albicans* (BAUTISTA-MUÑOZ et al., 2003).

Para investigar a relação genética entre linhagens de *C. albicans* na população amostrada utilizou-se a técnica de RAPD com o oligoiniciador OPA 03. Hannula e colaboradores (1995) testaram 10 oligoiniciadores aleatórios na amplificação de isolados de leveduras e verificaram que os oligoiniciadores OPA 03 e OPA 04 geraram perfis de amplicons distintos e exibiram capacidade de amplificação igual. Em outro estudo, a utilização do oligoiniciador OPA 03 possibilitou otimizar a diferenciação intraespécie de *C. albicans* comparado a outros oligoiniciadores, o que permitiu distinguir 33 genótipos entre 363 isolados clínicos de *C. albicans* (HANNULA, 2010).

Neste estudo, a presença de oito marcadores de RAPD variando de 200 a 900 pares de bases (pb) é similar a outros estudos (SALEH et al., 2011; LI et al., 1995; WILLIAMS et al., 1995). A análise de 46 isolados de *C. albicans* revelou que o número de bandas amplificadas variou de 6 a 12 e o tamanho dos fragmentos variou de 300 a 2000 pb (LI et al., 1995).

De acordo com Dassanayake e Samaranayake (2003) em estudos baseados em polimorfismo genético, as linhagens podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com a similaridade genética entre elas: 100% = linhagens idênticas; 90% = linhagens altamente relacionadas; 80% = linhagens moderadamente relacionadas e 70% = linhagens não relacionadas.

Dessa forma, dos sete grupos formados observados no dendograma, seis são compostos por linhagens idênticas, ou seja, apresentam 100% de similaridade genética entre elas. A grande quantidade de linhagens geneticamente idênticas pode indicar a natureza clonal da população

amostrada de *C. albicans*, como já observada em outros estudos com espécies de *Candida* (BAIRES-VARGUEZ et al., 2007; TAYLOR et al., 1999; LOCKHART et al., 1997).

Por outro lado, no grupo VII observou-se grande variação intraespécie de *C. albicans*, com similaridade variando de 20 a 80%, ou seja, neste grupo há linhagens moderadamente relacionadas e linhagens não relacionadas. Este resultado indica que o oligoiniciador OPA 03 apresenta poder discriminatório para detecção de polimorfismo entre linhagens de *C. albicans*. A presença de linhagens de *C. albicans* geneticamente distintas pode indicar a ocorrência de “shuffling” genotípico ou deriva genética.

Saleh e colaboradores (2011) também observaram variabilidade genética entre linhagens de *C. albicans* pela técnica de RAPD, com três grupos apresentando alta similaridade ou idênticas (92% a 100) e um grupo com baixa similaridade (21%). Em outro estudo, linhagens de *C. albicans* foram distribuídas em três grupos, sendo dois grupos formados por linhagens idênticas ou altamente similares e um grupo com linhagens não relacionadas (45% de similaridade). Além disso, já foi sugerida a ocorrência de deriva genética ou *shuffling* genotípico em *C. albicans*, a partir da observação de divergência genética nestas leveduras em relação a outras linhagens de mesma amostragem (RIBEIRO et al., 2010).



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os resultados obtidos neste estudo corroborem com a prevalência de *C. albicans* na etiologia de CVV, apontam a emergência da sua associação com *C. lusitanae*, dado ainda não relatado na região amostrada. Essa observação suscita a necessidade do diagnóstico microbiológico para estratégias antimicrobianas mais eficazes.

Além disso, à medida que aproximadamente 20% dos espécimes clínicos provenientes de pacientes com diagnóstico clínico de CVV, tiveram cultura negativa, questiona-se o tratamento antifúngico empírico, como conduta terapêutica na rotina ginecológica.

O não estabelecimento de correlações significativas entre a positividade da cultura fúngica e as características clínicas associadas a fatores de risco e sinais e sintomas entre as pacientes com diagnóstico clínico de CVV, permite a reafirmação de que não existem manifestações patognomônicas da doença e que os procedimentos laboratoriais devem ser realizados para um diagnóstico etiológico correto de vaginite.

A observação de baixa diversidade genética entre as amostras de *C. albicans* como um todo, e a observação de infecção por uma mesma linhagem de levedura na maioria das pacientes, suscita discussão sobre a possibilidade de abertura deste estudo para a pesquisa de características biológicas destes micro-organismos. O estabelecimento de um perfil biológico composto de avaliação de virulência e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos entre linhagens de *C. albicans* circulantes na região amostrada possibilitaria a predição de prognóstico para as pacientes acometidas e serviria de base para direcionamento da terapia antimicrobiana empírica.

Além disso, estudos multicêntricos desta natureza com maior amostragem populacional e com a inclusão de pesquisa de portadores saudáveis de *Candida* na microbiota cérvico-vaginal, permitiria o entendimento do papel das leveduras geneticamente pouco relacionadas nas pacientes com diagnóstico clínico de CVV e cultura positiva.

## 8 CONCLUSÕES

- A possibilidade de cultura de leveduras negativa a partir de secreção vaginal de pacientes com diagnóstico clínico de CVV reforça a necessidade do diagnóstico laboratorial associado ao diagnóstico clínico;
- *C. albicans* é a espécie prevalente na etiologia da CVV, mas outras espécies como *C. glabrata* são também relatadas;
- Infecções polimicrobianas, incluindo a associação *C. albicans* e *C. lusitanae*, ocorrem na população amostrada com diagnóstico clínico de CVV;
- A falta de correlação entre a cultura de *Candida* e os dados sociodemográficos, situações clínicas associadas a fatores de risco e sinais e sintomas analisados confirmam a ausência de características patognomônicas na população amostrada com diagnóstico de CVV;
- As linhagens de *C. albicans* circulantes entre as pacientes com diagnóstico clínico de CVV na região amostrada possuem majoritariamente alto grau de similaridade;
- Infecção por apenas uma linhagem de *C. albicans* é frequente na população amostrada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A.; KHAN, A.U. Prevalence of *Candida* species and potential risk factors for vulvovaginal candidiasis in Aligarh, India. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 144, p. 68-71, 2009.

AKINBIYI, A.A.; WATSON, R.; WABOSO, P. Prevalence of *Candida albicans* and bacterial vaginosis in asymptomatic pregnant women in South Yorkshire, United Kingdom. **American Journal of Medicine**, Tucson, v. 74, p. 14-22, 2008.

ÁLVARES, C.A.; SUIDZINSKI, T.I.E.; COMALAVO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 319-327, 2007.

ALVES, I.A.; CAMARGO, F.P.; GOULART, L.S. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida sp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 575-579, 2010.

AMOURI, I.; SELLAMI, H.; BORJI, N.; ABBES, S.; SELLAMI, A.; CHEIKHROUHOU, F.; MAAZOUN, L.; KHALED, S.; KHROUF, S.; BOUJELBEN, Y.; AYADI, A. Epidemiological survey of vulvovaginal candidosis in Sfax, Tunisia. **Mycoses**, v. 54, p. 499-505, 2010.

ANDRIOLI, J.L.; OLIVEIRA, G.S.A.; BARRETO, C.S.; SOUSA, Z.L.; OLIVEIRA, M.C.H.; CAZORLA, I.M.; FONTANA, R. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 6, p. 300-304, 2009.

ANGOTTI, L.B.; LAMBERT, L.C.; SOPER, D.E. Vaginitis: making sense of over-the-counter treatment options. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, New York, 2007, Article ID: 97424, doi: 10.1155/2007/97424, 2007.

ARECHAVALA, A.I.; BIANCHI, M.H.; ROBLES, A.M.; SANTISO, G.; NEGRONI, R. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 305-308, 2007.

BAIRES-VARGUEZ, L.; CRUZ-GARCÍA, A.; VILLA-TANAKA, L.; SÁNCHEZ-GARCÍA, S.; GAITÁN-CEPEDA, L.A.; SÁNCHEZ-VARGAS, L.O.; QUINDÓS, G.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.. Comparison of a randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and ATB ID 32C system for identification of clinical isolates of different *Candida* species. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 148-151, 2007.

BANKAR, S.M.; POWAR, R.M.; PATIL, S.A.; KALTHUR, S.G. Prevalence of non-albican candida infection in Maharashtrian women with leucorrhoea. **Annals of Tropical Medicine and Public Health**, v. 5, p. 119-23, 2012.

BARROS, L.M.; BORIOLLO, M.F.G.; ALVES, A.C.B.A.; KLEIN, M.I.; GONÇALVES, R.B.; HÖFLING, J.F. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. **Archives of Oral Biology**, v. 53, p. 1172-1178, 2008.

BASTOS, A.M.C.; BRAVO, R.S.; FILHO, R.A.G.; ISOLAN, T.B.; BARRETO, N.A. Perfil das mulheres com processo inflamatório por *Candida* em resultados de colpocitologia oncológica numa clínica de DST. **DST- Jornal Brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 15, n. 2, p. 26-38, 2003.

BAUTISTA-MUÑOZ, C.; XAVIER, M.B.; VILLA-TANACA, L.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.. Identification of *Candida spp.* by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 414-420, 2003.

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

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

CAMARGO, F.P.C.; ALVES, I.A.; PARLOW, M.S.; GOULART, L.S. Isolamento de *Candida spp.* da mucosa vaginal de mulheres atendidas em um serviço de ginecologia do Município de Santo Ângelo – RS. **NewsLab**, São Paulo, v. 87, p. 96-104, 2008.

CARNEIRO, S.S.; PERALTA, R.M.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Contribuição da citologia de Papanicolaou para o diagnóstico de leveduras em secreção vaginal. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 36-40, 2006.

CARVALHO, A.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; MARTINS, M.L.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G.; LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 45, p. 619-627, 2007.

CARVALHO, R.J.V.; CUNHA, C.M.; SILVA, D.A.O.; SOPELETE, M.C.; URZEDO, J.E.; MOREIRA, T.A.; MORAES, P.S.A.; TAKETOMI, E.A. IgA e IgE

e subclasses de IgG anti-*Candida albicans* no soro e lavado vaginal de pacientes com candidíase vulvovaginal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 4, p.434-438, 2003.

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

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

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

CORSELLO, S.; SPINILLO, A.; OSNENGO, G.; PENNA, C.; GUASCHINO, S.; BELTRAME, A.; BLASI, M.; FESTA, A. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 110, p. 66-72, 2003.

CRUZ, C. D. **Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV: 1. 2006. 285 p.

CRUZ, C. D. **Programa Genes - Diversidade Genética**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV: 1. 2008. 278 p.

DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N.L.; FUENTEFRIA, A.M. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida spp.* orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 33-38, 2011.

DANIELS, W.; GLOVER, D.D.; ESSMANN, M.; LARSEN, B. Candidiasis during pregnancy may result from isogenic commensal strains. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 9, p. 65-73, 2001.

DASSANAYAKE, R.S.; SAMARANAYAKE, L.P. Amplification-based nucleic acid scanning techniques to assess genetic polymorphism in *Candida*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 29, p. 1-24, 2003.

DURÁN, E.L.; MUJICA, M.T.; JEWUCHOWICZ, V.M.; FINQUELIEVICH, J.L.; PINONI, M.V.; IOVANNITTI, C.A. Estudio de la variabilidad genética entre aislamientos clínicos de *Candida albicans* formadores de biopelículas. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 268-271, 2007.

EGAN, M.E.; LIPSKY, M.S. Diagnosis of Vaginitis. **Review American Family Physician**, v. 62, p.1095-1100, 2000.

ESMAEILZADEH, S.; OMRAN, S.M.; RAHMANI, Z. Frequency and etiology of vulvovaginal candidiasis in women referred to a gynecological center in Babol, Iran. **Royan Institut International Journal of Fertility and Sterility**, v. 3, n. 2, p. 74-77, 2009.

FERRAZZA, M.H.S.H.; MALUF, M.L.F.; CONSOLARO, M.E.L.; SHINOBU, C.S.; SVIDZINSKI, T.I.E.; BATISTA, M.R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A.F.L.; THÖRN, D.S.W.; OLIVEIRA, M.T.; FURLANETO, M.C. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos, Maringá, Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 2007.

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

GARCIA HEREDIA, M.; GARCIA, S.D.; COPOLILLO, E.F.; CORA ELISETH, M.; BARATA, A.D.; VAY, C.A.; TORRES, R.A.; TIRABOSCHI, N.; FAMIGLIETTI, A.M. Prevalence of vaginal candidiasis in pregnant women. Identification of yeast and susceptibility to antifungal agents. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 38, n. 1, p. 9-12, 2006.

GIRALDO, P.C.; FEITOZA, S.B.M.; GONÇALVES, A.K.S.; CORNETTA, M.C.M.; ELEUTÉRIO J.J.; TRISTÃO, A.R. A resposta imune celular da mucosa vaginal às vulvovaginites. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 18, n. 4, p. 263-265, 2006.

GROSS, N.T.; ARIAS, M.L.; MORAGA, M.; BADDASAROW, Y.; JARSTRAND, C. Species distribution and susceptibility to azoles of vaginal yeasts isolated prostitutes. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2007, ID 82412, doi:10.1155/2007/82412, 2007.

HANNULA, J. **Clonal types of oral yeasts in relation to age, health, and geography**. Dissertação acadêmica. Faculty of Medicine of the University of Helsinki, Helsinki, 2010.

HANNULA, J.; SAARELA, M.; ALALUUSUA, S.; SLOTS, J.; ASIKAINEN, S. Phenotypic and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and the United States. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 12, p. 358-365, 1997.

HOLANDA, A.A.R.; FERNANDES, A.C.S.; BEZERRA, C.M.; FERREIRA, M.A.F.; HOLANDA, M.R.R.; HOLANDA, J.C.P.; MILAN, E.P. Candidíase

vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 1, p. 3-9, 2007.

KARACA, M.; BAYRAM, A.; KOCOGLU, M.E.; GOCMEN, A.; EKSI, F. Comparison of clinical diagnosis and microbiological test results in vaginal infections. **Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology**, Montreal, v. 32, p. 172-174, 2005.

KLUFIO, C.A.; AMOA, A.B.; DELAMARE, O.; HOMBHANJE, M.; KARIWIGA, G.; IGO, J. Prevalence of vaginal infections with bacterial vaginosis, *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* among pregnant women at the Port Moresby General Hospital Antenatal Clinic. **Papua New Guinea Medical Journal**, Goroka, v. 38, p. 163-171, 1995.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Leveduras de Interesse Médico. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de micologia médica**, 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. cap. 6.

LI, D.M.; WANG, D.L.; LI, R.Y.; ZHU, L.H.; LI, D.M.; WANG, D.L.; LI, R.Y.; ZHU, H.; ZHU, L.H.. Assessment of randomly amplified polymorphic DNA markers in the classification of *C. albicans*. **Acta Mycologica Sinica**, v. 14, n. 2, p. 123-129, 1995.

LIAN, C.; ZHAO, J.; ZHANG, Z.; LIU, W. Genotype of *Candida* species associated with different conditions of vulvovaginal candidosis. **Mycoses**, v. 47, p. 495-502, 2004.

LINHARES, L.M.; WITKIN, S.S.; MIRANDA, S.D.; FONSECA, A.M.; PINOTTI, J.A.; LEDGER, W.J. Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 9, n. 4, p. 221-225, 2001.

LOCKHART, S.R.; JOLY, S.; PUJOL, C.; SOBEL, J.D.; PFALLER, M.A.; SOLL, D.R. Development and verification of fingerprinting probes for *Candida glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 143, p. 3733-3746, 1997.

LOWE, N.K.; NEAL, J.L.; RYAN-WENGER, N.A. Accuracy of the clinical diagnosis of vaginitis compared to a DNA probe laboratory standar. **Obstetrics and Gynecology**, v. 113, n. 1, p. 89-95, 2009.

MALAZY, O.T.; SHARIAT, M.; HESHMAT, R.; MAJLESI, F.; ALIMOHAMMADIAN, M.; TABARI, N.K.; LARIJANI, B. Vulvoganial candidiasis and its related factors in diabetic women. **Taiwan Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 46, n. 4, p. 399-404, 2007.

MARTINS, M.C.L.; BÔER, C.G.; SVIDZINSKI, T.I.E.; DONIDA, L.G.; MARTINS, F.A.; BOSCOLI, F.N.S.; CONSOLARO, M.E.L. Avaliação do método de

Papanicolaou para triagem de algumas infecções cérvico-vaginais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n.3, p. 217-221, 2007.

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

NAMKINGA, L.A.; MATEE, M.I.N.; KIVAISI, K.; KULLAYA, A.; MNENEY, E.E. Identification of *Candida* strains isolated from Tanzanian pregnant womem with vaginal candidiasis. **East African Medical Journal**, v. 82, n. 5, p. 226-234, 2005.

OLIVEIRA, N.C.; RAMPAZZO, R.C.P.; MINARI, M.C.; CORRÊA, P.R.C.; BIZERRA, F.C.; CARNEIRO, M.; SVIDZINSKI, T.I.E; MAIA, L.F.; YAMADA-OGATTA, S.F. Utilização de um meio cromogênico e da técnica de semi-nested PCR para identificação de espécies de *Candida*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 125-132, 2006.

OZCAN, S.K.; BUDAK, F.; YUCESLOY, G.; SUSEVER, S.; WILLKE, A. Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 114, n. 2, p. 139-45, 2006.

PAVIATO, L.B.; ZIMMERMMANN, J.B.; ZIMMERMMANN, S.G.; RODRIGUES, M.T. Aspectos epidemiológicos da candidose vulvo-vaginal. In: JORNADA NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2., 1995, São Luis (MA); REUNIÃO DA SBPC, 47., 1995, São Luis (MA). **Anais da 47ª Reunião Anual da SBPC**, São Luís (MA): Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1995, [S.I.].

PEREIRA, D.C.; BACKES, L.T.H.; CALIL, L.N.; FUENTEFRÍA, A.M. A six-year epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in cytopathology reports in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 2, p. 163-168, 2012.

PINTO, P.M.; RESENDE, M.A.; KOGA-ITO, C.Y.; TENDLER, M. Genetic variability analysis among clinical *Candida spp.* isolates using Random Amplified Polymorphic DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 147-152, 2004.

RAD, M.M.; ZAFARGHANDI, A.S.; ZABIHI, M.A.; TAVALLAEE, M.; MIRDAMADI, Y. Identification of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis by Multiplex PCR. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2012, ID 872169, doi:10.1155/2012/872169, 2012.

RAD, M.M.; ZAFARGHANDI, S.; ABBASABADI, B.; TAVALLAEE, M. The epidemiology of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 155, p. 199-203, 2011.



REED, B.D.; ZAZOVE, P.; PIERSON, C.L.; GORENFLO, D.W.; HORROCKS, J. *Candida* transmission and sexual behaviors as risks for a repeat episode of *Candida* vulvovaginitis. **Journal of women's health**, v. 12, n. 10, p. 979-989, 2003.

RIBEIRO, M.A.; DIETZE, R.; PAULA, C.R.; DA MATTA, D.A.; COLOMBO, A.L. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. **Mycopathologia**, v. 151, p. 5-10, 2000.

RIBEIRO, E.L.; CARDOSO, C.G.; SILVA, S.P.; ALVES, N.A.; TOLEDO, O.A.; PIMENTA, F.C. Genetic similarity of *Candida albicans* isolated from the buccal cavity of children with Down's syndrome and their parents and/or caregivers. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 28, n. 3, p. 224-8, 2010.

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

RIVERO, M.; CENTENO, S.; DIAZ, J. Frecuencia de espécies de *Candida* aisladas em pacientes embarazadas con vulvovaginitis. **Revista da Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 23, n. 2, p. 148-52, 2003.

RODRIGUES, M.T.; SIMÕES, L.Z.; DINIZ, C.G. Clinical, microbiological and therapeutic aspects of vulvovaginal candidiasis and recurrent vulvovaginal candidiasis: importance of regional surveys. **HU Revista**, v. 35, n. 3, p. 175-181, 2009.

RODRIGUES, M.T.; ZIMMERMANN, J.B.; PAVIATO, L.B.; ZIMMERMANN, S.G. Etiologia e fatores predisponentes de candidose vulvo-vaginal: valor do microcultivo e do Efeito Reynolds-Braude no seu diagnóstico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18, 1995, Santos (SP). **Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Santos (SP): Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1995, [S.l.].

ROSA, M.I.; RUMEL, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: Estudo exploratório. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 1, p. 65-70, 2004.

SALEH, H.A.; EI-HARIRI, M.; MOAWAD, A.A.; REFAI, M.K. Genotyping of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* isolates recovered from human, animals and soil in El-Fayoum Governorate. **International Journal of Genetics**, v. 1, n. 2, p. 27-35, 2011.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, V.; HERMOSILIA, G.; ABARCA, C. Nosocomial candiduria in women undergoing urinary catheterization. Clonal relationship between strains isolated from vaginal tract and urine. **Medical Mycology**, v. 45, p. 645-51, 2007.

SUÁREZ, V.L.; LANCHA, M.R.P. Identificación de levaduras de exudados vaginales: características clínicas asociadas a la candidiasis. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Ciudad de La Habana, v. 54, p. 21-25, 2004.

TAYLOR, J.; JACOBSON, D.; FISHER, M. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 197-246, 1999.

VALÉRIO, H.M.; WEIKERT-OLIVEIRA, R.C.B.; RESENDE, M.A. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 174-178, 2006.

XUEQIANG, F.; YINGZHI, Z.; YANFANG, Y.; YUTAO, D.; HUIQINGAQ, L. Prevalence and risk factors of trichomoniasis, bacterial vaginosis, and candidiasis for married women of child-bearing age in rural Shandong. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 60, p. 257-261, 2007.

WEISSENBACHER, T.; WITKIN, S.S.; LEDGER, W.J.; TOLBERT, V.; GINGELMAIER, A.; SCHOLZ, C.; WEISSENBACHER, E.R.; FRIESE, K.; MYLONAS, I. Relationship between clinical diagnosis of recurrent vulvovaginal candidiasis and detection of *Candida* species by culture and polymerase chain reaction. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 279, n. 2, p. 125-129, 2009.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 18(24), p. 7213-7218, 1990.

WENJIN, Q.; YIFU, S. Epidemiological study on vaginal *Candida glabrata* isolated from pregnant women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 38, p. 49-54, 2006.

WILLIAMS, D.W.; WILSON, M.J.; LEWIS, M.A.; POTTS, A.J.C. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2476-2479, 1995.

WILLINGER, B.; BERGER, A.; LI, L.; HIRSCHI, A.M.; ASPÖCK, C.; MAKRISTATHIS, A.; PRÜCKI, M.; ROTTER, M.L. Epidemiological analysis of *Candida* yeasts by pulsed-field gel electrophoresis. **Mycoses**, v. 37, p. 401-403, 1994.

ZIMMERMMANN, J.B.; PAIVA, A.O.; COSTA, A.C.S.S.; SOUSA, A.M.G.V.; CHAGAS, A.R.; LIMA, A.A.C. Validade do diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal. **HU Revista**, v.35, n.1, p. 11-18, 2009.

ZIMMERMMANN, J.B.; PAVIATO, L.B.; ZIMMERMMANN, S.G.; RODRIGUES, M.T. Estudo clínico da candidose vulvo-vaginal. In: JORNADA NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2., 1995, São Luis (MA); REUNIÃO DA SBPC, 47., 1995, São Luis (MA). **Anais** da 47<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC, São Luís (MA): Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1995, [S.I.].

## APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Setor de Microbiologia - ICB

*PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Márcio Tavares Rodrigues*

*ENDEREÇO: ICB/Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Campus Universitário s/n, Martelos*

*CEP:36036-900 – JUIZ DE FORA – MG*

*FONE: (32) 2102-3213.*

*E-MAIL: marciotrodrigues@yahoo.com.br*

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

*A Sra está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa "Leveduras isoladas de pacientes com candidíase vulvovaginal em Juiz de Fora, MG: estudo sobre etiologia, recorrência, susceptibilidade a antifúngicos e relações fenéticas". Neste estudo pretendemos gerar conhecimentos sobre candidíase vulvovaginal e candidíase vulvovaginal recorrente para fins epidemiológicos, através da detecção de espécies de Candida em pacientes da região e seu comportamento frente a diferentes medicamentos utilizados. O motivo que nos leva a estudar este assunto está relacionado ao uso, às vezes, abusivo de medicamentos que poderiam ser substituídos por outros mais eficazes em alguns casos.*

- As participantes, voluntárias, não serão submetidas a nenhum procedimento clínico que ofereça riscos físicos ou dolorosos. Uma amostra de secreção será colhida pelo uso de um cotonete esterilizado na vagina durante sua consulta. Considerada pesquisa com risco mínimo, eventuais desconfortos emocionais serão minimizados, uma vez que as amostras serão coletadas pelo seu médico durante os exames ginecológicos que são realizados rotineiramente. Estes estudos vão permitir formular ações para uma diminuição de riscos associados ao uso incorreto dos medicamentos.*

*Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecida sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo seu médico. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizadas as experiências. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. A Sra. não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório de Micologia do ICB e a outra será fornecida a você.*

Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Setor de Microbiologia - ICB

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos do estudo "Leveduras isoladas de pacientes com candidíase vulvovaginal em Juiz de Fora, MG: estudo sobre etiologia, recorrência, susceptibilidade a antifúngicos e relações fenéticas", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo e que eventuais leveduras isoladas sejam mantidas na coleção de culturas do Departamento de Microbiologia do ICB/UFJF. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200 .

Nome	Assinatura participante	Data
------	-------------------------	------

Nome	Assinatura pesquisador	Data
------	------------------------	------

Nome	Assinatura testemunha	Data
------	-----------------------	------

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o CEP  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFJF

CAMPUS UNIVERSITÁRIO DA UFJF

PRO-REITORIA DE PESQUISA

CEP 36036.900

FONE: 32 3229 3788

## APÊNDICE B - Formulário de coleta de dados das pacientes com CVV



Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia - Setor de Microbiologia - ICB  
Leveduras isoladas de pacientes com candidíase vaginal em Juiz de Fora, MG: estudo sobre etiologia,  
recorrência, susceptibilidade a antifúngicos e relações fenéticas

### Anexo 3

#### FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS

Caso Nº [ ][ ][ ][ ] Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Prontuário [ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]

Nome: \_\_\_\_\_ Idade (anos): \_\_\_\_ Origem: [ ] Pública [ ] Particular

Endereço: \_\_\_\_\_ Telefones: \_\_\_\_\_

1. Estado civil: [ ] solteira [ ] casada [ ] outro
2. Cor: [ ] branca [ ] preta [ ] parda [ ] amarela [ ] outra
3. Nível de escolaridade: [ ] superior [ ] médio [ ] fundamental [ ] nenhum
4. Ocupação profissional: \_\_\_\_\_
5. Vida sexual ativa (últimos 30 dias): [ ] não [ ] sim → Parceiros [ ] 01 [ ] mais de 01
6. Gestante: [ ] não [ ] Sim. Idade Gestacional: \_\_\_\_\_
7. Estresse agudo recente: [ ] não [ ] sim
8. Antibióticos nos últimos 30 dias:  
Antifúngico [ ] sim [ ] não Antibacteriano [ ] sim [ ] não Anti-tricomonas [ ] sim [ ] não
9. Corticoterapia nos últimos 30 dias: [ ] não [ ] sim
10. Em uso de quimioterápicos: [ ] não [ ] sim
11. Soropositivo: [ ] não [ ] sim
12. Diabetes: [ ] não [ ] sim → [ ] tipo I [ ] tipo II
13. Prurido vulvar: [ ] não [ ] sim
14. Ardência vulvar: [ ] não [ ] sim
15. Hiperemia vulvar: [ ] não [ ] sim
16. Fluxo: [ ] não [ ] sim → 17. Coloração do Fluxo: [ ] branco [ ] amarelado [ ] esverdeado
18. Aspecto do Fluxo: [ ] grumoso [ ] fluido
19. Uso de DIU: [ ] não [ ] sim
20. Uso de anticoncepcional: [ ] não [ ] sim

#### 19. Paciente com história de recorrência:

[ ] Segundo episódio - Data episódio anterior \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Diagnóstico: [ ] Clínico [ ] Papanicolaou [ ] Cultura → Etiologia: \_\_\_\_\_

[ ] Terceiro episódio - Data episódio anterior \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Diagnóstico: [ ] Clínico [ ] Papanicolaou [ ] Cultura → Etiologia: \_\_\_\_\_

[ ] Quarto episódio - Data episódio anterior \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Diagnóstico: [ ] Clínico [ ] Papanicolaou [ ] Cultura → Etiologia: \_\_\_\_\_

[ ] Outros - Data episódio anterior \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Diagnóstico: [ ] Clínico [ ] Papanicolaou [ ] Cultura → Etiologia: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE C - Tipos eletroforéticos de *C. albicans* e características sócio-demográficas, clínicas associadas a fatores de risco e ao diagnóstico de candidíase vulvovaginal no grupo de pacientes avaliadas.**

Paciente	TE <sup>b</sup>	Idade	Estado civil <sup>c</sup>	Etnia	Escolaridade <sup>d</sup>	Vida sexual	Gestação	Uso de antibiótico	AIDS	Diabetes	Relato de prurido	Relato de Ardência	Presença de Hiperemia	Presença de Fluxo	Coloração do fluxo	Aspecto do fluxo <sup>e</sup>
D04	I, III, VI	27	Solt	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D05	IV	23	Solt	Branca	Sup	Ativa	-	+	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D06	I, II, IV	32	Cas	Branca	Med	Ativa	-	-	+	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D07	IV	43	Cas	Parda	Sup	Ativa	-	-	-	+	+	+	-	nd	nd	
D08	I, IV	26	Solt	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Amarelado	Gru
D09	IV, VI, VII	32	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D10	IV, V, VII	24	Solt	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	-	-	+	Branco	Gru
D11	I, VII	31	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Fluido
D12	I, VII	27	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D13	I, IV, VII	nd <sup>b</sup>	Cas	Negra	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D14	IV	nd	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Fluido
D15	IV	36	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	-	-	-	+	Branco	Gru
D16	IV	nd	Solt	Branca	Sup	Ativa	-	+	-	-	+	+	+	-	nd	nd
D17	IV	35	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D18	IV	nd	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D19	IV, VI, VII	nd	Solt	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D20	II, IV	31	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D21	I, IV	nd	Cas	Branca	Sup	Ativa	+	-	-	-	+	+	+	+	Branco/esverdeado	Gru
D22	IV	26	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Fluido
D23	IV	28	Solt	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D24	IV	40	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D25	IV	33	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru

### APÊNDICE C – Continuação

D26	IV	45	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Fluido
D27	IV	22	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D28	I, VI	43	Solt	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D29	I, IV	26	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D30	I, IV	28	Cas	Branca	Sup	Ativa	+	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D32	IV	32	Cas	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
D33	IV	22	Solt	Parda	Sup	Ativa	-	+	-	-	+	+	+	+	nd	Gru
D34	I, VI	nd	Solt	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco/amarelo/esverdeado	nd
J04	I, IV	26	Cas	Branca	Med	Ativa	-	-	-	-	+	-	-	+	Branco	Gru
J05	I	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
J06	III, VII	37	Cas	Parda	Med	Ativa	+	-	-	-	-	-	-	+	Branco	Gru
J08	II, IV, V, VI	21	Solt	Branca	Fund	Ativa	-	+	-	-	+	-	-	+	Branco	Gru
J10	I, II, V	52	Cas	Branca	Med	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
J11	II, V	27	Solt	Branca	Med	Ativa	-	-	-	-	-	-	-	+	Branco	Gru
J14	I, VII	22	Cas	Branca	Sup	Ativa	+	+	-	-	+	-	-	+	Branco	Gru
J17	IV, VI	17	Solt	Branca	Med	Ativa	-	+	-	-	-	-	-	+	Branco	Gru
J19	I, IV	31	Cas	Branca	Med	Ativa	+	-	-	-	+	-	-	+	Branco	Gru
J21	I, VII	28	Cas	Branca	Sup	Ativa	+	-	-	-	+	-	-	+	Branco	Gru
J22	I, IV	27	Solt	Branca	Sup	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
J23	I	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
J24	IV	28	Cas	Negra	Med	Ativa	-	-	-	-	+	+	+	+	Branco	Gru
J25	IV	nd	Cas	Branca	Fund	Ativa	+	-	-	-	-	+	+	+	Branco	Gru
J26	IV, VII	17	Cas	Branca	Med	Ativa	+	-	-	-	-	-	-	+	Branco	Gru
J27	IV	17	Solt	Parda	Med	Ativa	+	-	nd	nd	-	-	-	+	Branco	Gru



### APÊNDICE C – Continuação

J28	IV, VII	21	Solt	Branca	Fund	Ativa	+	-	-	-	-	-	-	+	Branco	Gru
J29	IV	21	Solt	Negra	Fund	Ativa	+	-	-	-	-	-	-	+	Branco	Gru
J30	IV	17	Cas	Parda	Fund	Ativa	+	-	-	-	+	-	-	+	Branco	Gru
J31	IV, VII	19	Cas	Branca	Med	Ativa	+	-	-	-	+	-	-	+	Branco	Gru
J32	IV	nd	Cas	Branca	Med	Ativa	+	-	-	-	+	+	+	+	Esverdeado	Gru
J33	IV	19	Solt	Parda	Med	Ativa	+	-	-	-	-	+	+	+	Esverdeado	Gru
J34	I, IV	17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

<sup>a</sup> Dados faltantes nas fichas das pacientes e, considerados como não determinados

<sup>b</sup> Tipos eletroforéticos observados dendograma gerado pela genotipagem de *C. albicans* por RAPD

<sup>c</sup> Estado civil estratificado em pacientes casadas (Cas) ou solteiras (Solt)

<sup>d</sup> Escolaridade estratificada em pacientes com nível superior completo (Sup), nível médio (Med) ou nível fundamental (Fund)

<sup>e</sup> Aspecto do fluxo vaginal estratificado em grumoso (Gru) ou fluido (Fluido)

**Apêndice D: Artigo publicado - Período de 2009 a 2013**

Rodrigues M.T., Simões L.Z., Diniz C.G. Clinical, microbiological and therapeutic aspects of vulvovaginal candidiasis and recurrent vulvovaginal candidiasis: importance of regional surveys. **HU Revista**, v. 35, n. 3, p. 175-181, 2009.

# Clinical, microbiological and therapeutic aspects of vulvovaginal candidiasis and recurrent vulvovaginal candidiasis: importance of regional surveys

Marcio Tavares Rodrigues\*  
Letícia Zambelli Simões\*  
Cláudio Galuppo Diniz\*\*

## ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (VVC) has a varied aetiology. The yeasts involved in this disease have presented increased resistance to the azoles and polyenes, the drugs of choice for treatment. In recurrent VVC, the therapeutic difficulties are even greater. The epidemiological relevance of aetiological diagnosis and of the antifungogram in clinical treatment is discussed.

**Keywords:** Candidiasis, Vulvovaginal. Recurrence. Diagnosis. Antifungal Agents.

## 1 VULVOVAGINITIS

The vulvovaginitis that is frequently diagnosed in gynaecological services refers to a variety of inflammatory disorders of the lower genital tract, which can be secondary to infection, irritation, allergy or systemic disease (ANGOTTI; LAMBERT; SOPER, 2007). It is the most common infection of the feminine genital tract, characterized by a triad of symptoms such as vulvovaginal pain, itching and burning (CAMARGO et al., 2008). In more than 90% of cases, the aetiology of vulvovaginitis includes yeasts, protozoans and bacteria (AKINBIVI et al., 2008; ANGOTTI; LAMBERT; SOPER, 2007; CHONG et al., 2007; EGAN; LIPSKY, 2000). The exact prevalence and cause of vulvovaginitis are uncertain due to the conditions of diagnosis and treatment, in spite of its asymptomatic nature and multifactorial causes (EGAN; LIPSKY, 2000).

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is associated with different species of *Candida*, and in the United States and in other countries, is the second most common cause of acute vaginitis after unspecific bacterial vaginosis due to the GAM complex: *Gardnerella vaginalis*, anaerobes and *Mycoplasma* (ARECHAVALA et al., 2007; CHONG et al., 2007; EGAN; LIPSKY, 2000;). In these regions, bacterial vaginosis is generally the most common cause of vaginitis, being linked

with 40–50% of cases in women of reproductive age. It has been found in 15–19% of outpatients in departments of gynaecology, in 10–30% of pregnant women and in 20–40% of patients in clinics for the treatment of sexually transmissible diseases (AKINBIYI; WATSON; WABOSO, 2008).

In Europe and several developed countries, VVC is the most common cause of vaginitis and it is expected that 75% of all women around the world will present, during their lifetime, with at least one episode of vulvovaginal candidiasis (ARECHAVALA et al., 2007; CHONG et al., 2003, 2007; EGAN; LIPSKY, 2000; REED et al., 2003). In Brazil, epidemiological data about the disease are scarce (ROSA; RUMEL, 2004). *Candida albicans* is the infectious agent that is recovered in 80–90% of patients and approximately 5–40% of women may develop recurrent episodes (CHONG et al., 2007; EGAN; LIPSKY, 2000; REED et al., 2003).

It is accepted that the trichomoniasis caused by *Trichomonas vaginalis* is the third most common cause of vaginitis, affecting 180 million women around the world, and accounting for 10–25% of vaginal infections. Its incidence, however, is declining in most developed countries (EGAN; LIPSKY, 2000; KLUFIO et al., 1995).

\* Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia - Juiz de Fora, MG

\*\* Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia - Juiz de Fora, MG.  
E-mail: claudio.diniz@ufjf.edu.br

In general, the vaginal discharge carries out cervical mucus and old cells that have lined the vagina. The amount of vaginal discharge varies with age, menstrual cycle, pregnancy and the use of oral contraceptives. The vaginal environment in healthy individuals is characterized by a dynamic relationship between *Lactobacillus acidophilus* and other members of the microbiota, estrogen, glycogen, vaginal pH and metabolic products of resident microorganisms and pathogens. *L. acidophilus* produces hydrogen peroxide, which is toxic for some microorganisms, and its fermentative activity contributes to the maintenance of vaginal pH between 3.8 and 4.2, contributing to the occurrence of yeasts of the *Candida* type (ATURNINO et al., 2005; EGAN; LIPSKY, 2000).

Vaginitis occurs when the vaginal microbiota is altered by the introduction of a pathogen or by alterations in the pH in the vaginal environment, permitting microbial proliferation (EGAN; LIPSKY, 2000; GROSS et al., 2007). *Candida* belongs to the human microbiota, being found especially in the skin and in mucous membranes. These yeasts may also be found in the female genital tract of approximately 20% of healthy women, with this rate increasing during pregnancy (ARECHAVALA et al., 2007).

In studies on the association of vaginal pH and the presence of vulvovaginitis, *Candida* sp. occurred more frequently at pH 4.0, *Trichomonas vaginalis* at pH 6.0, *Gardnerella vaginalis* at pH 5.0, and other bacteria between a pH of 4.0 to 6.0 (SATURNINO et al., 2005).

Overall, VVC is considered a public health issue that affects millions of women annually, creating great discomfort, interfering with sexual activity and affectionate relations and compromising the work performance of a significant number of the economically active population (HOLANDA et al., 2007).

### 1.1 Vulvovaginal candidiasis

VVC is one of the most frequent diagnoses in gynaecological practice and its incidence has increased drastically (HOLANDA et al., 2007; SHEEP et al., 2006). The predisposition for the development of these yeast infections is mediated by multiple factors, such as the level of health, the use of prosthetic products, the prior colonization of mucous membranes by microorganisms with potential virulence and their ability to adhere to the host tissues (EL-AZIZI; STARKS; KHardORI, 2004). The disease is considered an opportunistic infection and a change from the asymptomatic to symptomatic condition indicates a transition of the saprophytic form of *Candida albicans* to the pathogenic form.

Currently, the factors responsible for this transition and the mechanisms that result in the pathogenic behaviour of *C. albicans* are not clear (HOLANDA et al., 2007; SHINOBU et al., 2007).

Species of *Candida* are thought to be opportunistic pathogens, which depend on their own physiology and host predisposing factors to cause infection. Like other amphibiotic microorganisms belonging to the human microbiota, during homeostatic equilibrium, these yeasts remain in the mucous membranes as regular colonizers. However, under physiological imbalance in the host, *Candida* strains may reproduce excessively and express new features such as virulence factors (CAMARGO et al., 2008).

The pathogenic potential of *Candida* depends on several virulence factors, such as the ability to grow at 37 °C and to produce hyphae and pseudo-hyphae, representing a barrier for phagocytosis and allowing the fixation of the yeast onto the epithelium, the production of exoenzymes (phospholipases and proteinases) that help in the adherence of the yeasts to the mucous membrane and the mannan that promote the depression of the host immune system (CAMARGO et al., 2008; SHINOBU et al., 2007). Other virulence factors such as haemolytic activity and resistance to hydrogen peroxide have been considered, but their relevance in vaginal specimens should be studied in more detail (SHINOBU et al., 2007).

During the development of the infectious diseases caused by *Candida*, such as candidiasis, the process of adhesion of the yeast to the epithelial surface takes place, generally by the union of the conidium to a membrane receptor. Once joined, the conidia are not able to penetrate the vaginal epithelium. Their germination is necessary and pseudo-hyphae are produced (HOLANDA et al., 2007). The observation of filaments accompanying the blastoconidia via direct microscopic examination is an indication of the invasive capacity of *Candida*. In addition, the association of infectious disease symptoms with the production of the germ tube by the yeast has been demonstrated (SHINOBU et al., 2007; SUÁREZ; LANCHI, 2004). On the other hand, vaginal defenses against infection are determined by factors such as the microbiological balance, the integrity of the mucous membrane, the presence of the A and G immunoglobulins and the polymorphonuclear and monocyte populations (HOLANDA et al., 2007).

Given the endogenous origin of the disease, i.e. in an attempt to differentiate between asymptomatic and symptomatic colonization, the direct counting of microorganisms in clinical specimens was proposed, according to the criterion of Higashide

and collaborators, as described by Suárez and Lancha (2004). Up to 10 colony forming units from the primary isolation would be considered asymptomatic colonization, whereas more than 10 colony forming units would be indicative of infectious disease.

VVC may be associated with situations of weakness in the host, such as neoplasias and immunodeficiency. Several authors have suggested other predisposing factors such as antibiotics, immunosuppressive and antineoplastic drugs, oestrogen therapy, small traumas caused during the sexual act, the use of synthetic fabrics and tight fibres, and a diet of very acidic food, allergies (rhinitis and bronchial asthma) and the use of the intrauterine device (HOLANDA et al., 2007; ROSA; RUMEL, 2004). It is also accepted that any alteration in glucose levels, especially in situations of hyperglycemia, and any state in which the rates of vaginal glycogen become elevated, may unleash VVC. Thus pregnancy, the use of oral contraceptives and hormonal replacement therapy that result in episodes of hyperoestrogenism and thus high levels of glycogen, may favour VVC (SUÁREZ; LANCHA, 2004). The increase in the glycogen availability enhances the yeasts' growth and their ability for adhesion (ÁLVARES; SUIDZINSKI; COMALAVO, 2007). In addition, the presence of regular menstrual cycles has been identified as a risk factor for VVC, especially related to the oestradiol peak (HOLANDA et al., 2007; SUÁREZ; LANCHA, 2004).

With regards hygiene, it has also been suggested that hygiene carried out in the direction of the anus to the vagina, and residues of faeces in underwear, might be associated with vulvovaginal candidiasis (ÁLVARES; SUIDZINSKI; COMALAVO, 2007; HOLANDA et al., 2007; ROSA; RUMEL, 2004).

## 2 CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL

### CONSIDERATIONS

VVC is clinically characterized by itching, burning, urination pain and a thick, white, odourless granulated vaginal discharge, and the vulva and vagina are frequently oedemic and hyperemic. The injuries may extend to the perineal, perianal and inguinal regions and, in typical cases, to the vaginal walls and the lip of the womb, with small yellow-white spots. The most common symptoms are itching, discharge, erythema and edema, which may intensify in the premenstrual period, when the acidity increases (ÁLVARES; SUIDZINSKI; COMALAVO, 2007; BOATTO et al., 2007).

Another studies describing the clinical characteristics of VVC, itching and vaginal discharge were also the most common symptoms, followed

by erythema and edema, although *Candida* was only isolated from 52% of the patients evaluated, and there was no correlation between the yeasts isolated and the symptoms presented. Other studies have shown that patients with *C. albicans* complain of itching, leucorrhea and erythema more often than patients bearing other *Candida* species (BOATTO et al., 2007; HOLANDA et al., 2007). Itching has been observed to be the most important clinical symptom in patients with VVC, permitting differentiation from vaginitis of other aetiologies, in which it is less frequent. According to some authors, *Candida* species other than *C. albicans* may occur without symptoms in approximately 44% of cases (HOLANDA et al., 2007).

Although *C. albicans* is the most prevalent infectious agent associated with human VVC, other species, such as *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondi* and *C. krusei* are also highly associated (CAMARGO et al., 2008; CHONG et al., 2003; EGAN; LIPSKY, 2000; GROSS et al., 2007; HOLANDA et al., 2007). Reports have shown the simultaneous participation of two or more species in a single disease episode (ARECHAVALA et al., 2007). Variation in the species by geographical location is related to the disease epidemiology (HOLANDA et al., 2007). VVC due to *C. albicans* is clinically indistinguishable from that due to other species that result in very similar symptomatology. However, it has been reported that *C. albicans* is more frequently associated with the symptoms than other species, which are more resistant to the usual therapies (SIMÕES, 2005).

## 3 DIAGNOSTIC ASPECTS

The clinical diagnosis of VVC is suggested by the presence of the classic symptoms and must be confirmed by laboratory diagnosis, which involves microscopic examinations (blastoconidia structures are observed, associated or not with the pseudo-hyphae), isolation of the yeast in culture medium and metabolic tests to determine the species (CAMARGO et al., 2008). According to the same authors, the signs and symptoms were not associated with the isolation of *Candida* in culture. This suggests that there are no pathognomonic clinical manifestations of vulvovaginal candidiasis, and demonstrates the need for at least one microscopic exam and whenever possible culture in order to confirm the diagnosis. To summarize, self-diagnosis or diagnosis based only on the clinical experience of this disease, prior to an appropriate gynaecological examination, leads to many unnecessary treatments and lack of correct treatment of cases that do not present the classic symptomatology.

The most commonly used diagnostic methods for VVC are direct examination with KOH (20–40%) or coloured smears (Papanicolaou, Gram, Giemsa or Blue of Cresil) of the vaginal contents. The identification of the wrapped sort has not been employed in daily practice and is indicated in cases in which the symptomatology is highly suggestive and all previous tests were negative, or in a recurrence, to identify the species responsible (SHEEP et al., 2006).

Recently, there has been much interest in the use of Papanicolaou cytology to diagnose some of the cervico-vaginal infections associated with sexually transmitted pathogens. This reflects the fact that the technique is sensitive, cheap and highly reproducible. In the case of VVC, it allows the observation of yeasts, the pseudo-hyphae, and also cellular alterations indicating inflammation and/or infection. Cytology could be considered a morphological method with an efficiency very similar to the Gram stain for detecting vaginal yeasts, making it highly applicable in the routine laboratory (CARNEIRO et al., 2006). According to some authors, comparison of the accuracy of the clinical diagnosis with microbiological results in vaginal infections showed that only 43.2% of infections were confirmed by laboratory examinations, thus suggesting that clinical diagnosis is insufficient and that infection must be confirmed by microbiological tests (KARACA et al., 2005).

Analysis of the sensitivity and specificity of the clinical diagnosis showed that the prevalence of VVC was 19.3% and that the frequency of vulvovaginitis diagnosed by clinical examination was 17%, with a sensitivity of 38% and specificity of 88% (ROSA; RUMEL, 2004). These findings are consistent with those of the literature, where it has been noted that the symptoms do not differ between the three most common causes of vaginitis/vaginosis (bacterial, *C. albicans* and *T. vaginalis*) and that the presence of signs and symptoms has limited value, only diagnosing half (49%) of the patients that really have the infection. So, low accuracy has been demonstrated in predicting candidiasis based only on clinical findings, without laboratory confirmation.

The frequency of symptoms such as itching, irritation, leucorrhea and urinary pain is not known and such symptoms are unspecific. As a result, clinical and self-diagnosis without laboratory confirmation are questionable. The handling of vaginitis remains empirical, based on the consensus that vaginitis does not bring risk to life and that the empirical treatment is not damaging. The introduction of antifungal chemotherapy and self-medication was enthusiastically adopted by

consumers and physicians, without worrying about the potential effects of the abusive and very often unsuitable use of medicines (ROSA; RUMEL, 2004).

#### 4 THERAPEUTIC CONSIDERATIONS

In most cases, infection by *Candida* species can be treated by antimicrobial drugs, the antifungal azoles being the drugs of choice. Imidazolic and triazolic agents have been employed (fluconazole, miconazole, clotrimazole, itraconazole and ketoconazole), besides the polyenes nistatine and amphotericin B (CARVALHO, 2003; GALLE; GIANINNI, 2004; FERRAZZA et al., 2005). However, some studies point to the resistance of *Candida* species to some of these compounds (ARECHAVALA et al., 2007; CHONG et al., 2007; FERRAZZA et al., 2005; GALLE; GIANINNI, 2004; SIMÕES, 2005; GROSS et al., 2007).

Although the azoles represent a great advance in the treatment of systemic and local fungicidal infections, the inappropriate or overuse of these drugs in the treatment of yeast pathologies has contributed to the selection of resistant or less sensitive strains. Antifungal susceptibility patterns differ among *Candida* species, making it necessary to identify the aetiological agent before therapy (ROZKIEWICZ et al., 2005).

Given the lack of standardization in the techniques for evaluating susceptibility to antifungals, the literature recognizes the difficulty of comparing regional studies on the aetiology of VVC and its empirical treatment. Furthermore, there is a shortage of studies on the epidemiology and profiles of sensitivity to drugs of yeasts associated with VVC. This type of study is important, since many patients do not respond to initial therapy (FERRAZZA et al., 2005).

It has been suggested that the difficulties in the treatment of VVC are not only related to the susceptibility of the yeasts to the antifungal drugs, since there is a tendency for any of the *Candida* species other than *albicans* to require greater concentrations of antifungals for inhibition, as compared to *C. glabrata* treated with fluconazole (RIBEIRO et al., 2001). However, during pregnancy, the use of the topical imidazoles shows greater efficiency than nistatine. For therapy lasting seven days in uncomplicated VVC, instead of the short treatments that are commonly used in patients who are not pregnant, an alternative option is the use of imidazolic and triazolic agents, by oral or intravaginal route; however, the cost–benefit ratio and the wishes of the patient must be taken into consideration, since the efficiency appeared to be similar when the two forms of drug

administration were compared (YOUNG; JEWELL, 2001; NURBHAI et al., 2007).

With regards antimicrobial resistance, the use of fluconazole at low doses to prevent fungal infections in immunocompromised patients has caused the selection of yeasts of the microbiota, such as *C. glabrata* and *C. krusei*, that are resistant to this antifungal agent (CARVALHO, 2003). It was also reported that most women who presented with recurrence showed a slightly higher occurrence of *C. glabrata*, which is less sensitive to the imidazolic drugs commonly used in the treatment of VVC and of recurrent vulvovaginal candidiasis (ÁLVARES et al., 2007).

## 5 RECURRENT VULVOVAGINAL CANDIDIASIS

As already mentioned, 5–40% of women with VVC have episodes of recurrence (CHONG et al., 2007; EGAN; LIPSKY, 2000; REED et al., 2003). Recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC) is diagnosed when the patient presents up to four episodes of VVC in the period of one year (CHONG et al., 2007; EGAN; LIPSKY, 2000), or up to three episodes in one year when not related to antibiotic therapy (CHONG et al., 2003). It is not known for certain whether the recurrence of VVC is secondary to predisposing/precipitant factors, sexual transmission, an intestinal reservoir or vaginal persistence (EGAN; LIPSKY, 2000).

Overall, it is accepted that two principal hypotheses are associated with the recurrence of candidiasis: a) reinfection through sexual transmission or from other reservoirs of the organism (digestive or urinary tract); b) reinfection due to the incomplete elimination of *Candida* species that have an increased virulence or are resistant to the antimicrobial drugs. A reduction in local cellular immunity may also be a risk factor for RVVC (CHONG et al., 2003).

In recent years, a significant increase in *Candida* species other than *albicans* that cause vaginitis has been observed, mainly in those cases connected with RVVC (CHONG et al., 2003). Allied to that, the occurrence of *Candida* strains that are resistant to antifungals has inspired some authors to propose not only microbiological diagnosis, but the additional performance of an antifungigram (ARECHAVALA et al., 2007; FERRAZZA et al., 2005; GALLE; GIANINNI, 2004).

In the Brazilian case, there are many questions about the necessity of laboratory diagnosis, especially for cases of RVVC, for which the value of mycological diagnosis is recognized by some authors, as well as the use of the antifungigram (FERRAZZA et al., 2005; GALLE; GIANINNI, 2004; RIBEIRO et al., 2001).

Reports from gynaecological services have shown that at least half of the women who are referred as bearers of RVVC in fact have symptoms due to causes other than candidiasis (SIMÕES, 2005).

Several of the *Candida* species other than *albicans* that are commonly isolated are less sensitive to the azolic derivatives, making the treatment of these infections more difficult. Although the antifungal susceptibility of the yeasts of the genus *Candida* is historically predictable, the susceptibility patterns of strains circulating nowadays are not easily predicted, especially given environmental selection and the cultural differences in the different regions. This is one of the reasons underlying the development of susceptibility tests for these drugs. Efforts to standardize these tests led to the establishment and regular update of antimicrobial testing manuals such as the document supplied by the Clinical and Laboratory Standards Institute, which is referred to in Brazilian microbiological practice (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008). As an alternative to the CLSI recommendations to evaluate antimicrobial susceptibility, the E-test method, which is used to check susceptibility to the antifungals *in vitro*, is clinically validated to predict the susceptibility patterns of yeasts in a more simple way and can easily be incorporated into the clinical microbiology routine (CROCCO et al., 2004).

## 6 FINAL CONSIDERATIONS

Despite the CLSI recommendations, there is still a lack of standardization in the techniques of drug susceptibility testing concerning the yeasts associated with VVC and RVVC employed by Brazilian laboratories. In this regard it is difficult to compare regional studies leading to empirical treatment. Besides, the scientific data on the epidemiology of VVC and RVVC are very limited, especially in our country.

Regional surveys are necessary to determine the involvement of different *Candida* species in the aetiology of VVC and RVVC, as well as their antifungal susceptibility patterns, since many patients do not respond to the initial therapy. The epidemiological data produced in these studies might assist in the handling of VVC and RVVC when it is impossible to confirm the clinical diagnosis through microbiological tests.

Knowledge of the drug susceptibility patterns in strains circulating in the different regions will also allow the rationalization of the empirical use of antifungal drugs, contributing to the control of the resistance phenomenon. Furthermore, these studies might be useful in predicting the recurrence of the disease.

## REFERENCES

- AKINBIYI, A. A.; WATSON, R.; WABOSO, P. Prevalence of *Candida albicans* and bacterial vaginosis in asymptomatic pregnant women in South Yorkshire, United Kingdom. **American Journal of Medicine**, Tucson, v. 74, p. 14-22, 2008.
- ÁLVARES, C. A.; SUIDZINSKI, T. I. E.; COMALAVO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 319-327, 2007.
- Angotti, L. B.; Lambert, L. C.; Soper, D. E. Vaginitis: making sense of over-the-counter treatment options. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, New York, 2007, Article ID: 97424, doi: 10.1155/2007/97424, 2007. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ido/2007/097424.abs.html>>. Acesso em: 12 mar. 2009.
- ARECHAVALA, A. I. et al. identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 24, p. 305-308, 2007.
- BOATTO, H. F. et al. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com *candidíase* vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 29, p. 80-84, 2007.
- CAMARGO, F. P. C. et al. Isolamento de *Candida* spp. da mucosa vaginal de mulheres atendidas em um serviço de ginecologia do Município de Santo Ângelo – RS. **NewsLab**, São Paulo, v. 87, p. 96-104, 2008.
- CARNEIRO, S. S. et al. Contribuição da citologia de Papanicolaou para o diagnóstico de leveduras em secreção vaginal. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 36-40, 2006.
- CARVALHO, R. J. V. et al. IGA, IGE e Subclasses de IGG anti-*Candida albicans* no soro e lavado vaginal de pacientes com candidíase vulvovaginal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 49, p. 571-576, 2003.
- CHONG, P. P. et al. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. In recurrent and one-off vaginitis, and high association of non – albicans species with non-pregnant status. **Infection, Genetics and Evolution**, Aberdeen, v. 7, p. 449-456, 2007.
- Chong, p. p. et al. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 52, p. 657-666, 2003.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard**. 3<sup>rd</sup> ed. CLSI document M27-A3, Wayne, 2008.
- CROCCO, E. I. et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 79, p. 689-697, 2004.
- EL-AZIZI, M. A.; STARKS, S. E.; KHANDORI, N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp and bacteria in the biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 96, p. 1067-1073, 2004.
- EGAN, M. E.; LIPSKY, M. S. Diagnosis of Vaginitis. **American Family Physician**, Leewood, v. 62, p. 1095-1100, 2000.
- FERRAZZA, M. H. S. H. et al. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 58-63, 2005.
- GALLE, L. C.; GIANINNI, M. J. S. M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 40, p. 229-236, 2004.
- GROSS, N. T. et al. Species distribution and susceptibility to azoles of vaginal yeasts isolated prostitutes. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, New York, 2007, Article ID: 82412, doi: 10.1155/2007/82412, 2007. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ido/2007/082412.ref.html>>. Acesso em: 12 mar. 2009.
- HOLANDA, A. A. R. et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 29, p. 3-9, 2007.
- KARACA, M. et al. Comparison of clinical diagnosis and microbiological test results in vaginal infections. **Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology**, Montreal, v. 32, p. 172-174, 2005.
- KLUFIO, C. A. et al. Prevalence of vaginal infections with bacterial vaginosis, *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* among pregnant women at the Port Moresby General Hospital Antenatal Clinic. **Papua New Guinea Medical Journal**, Goroka, v. 38, p. 163-171, 1995.
- NURBHAI, M. et al. Oral versus intra-vaginal imidazole and triazole anti-fungal treatment of uncomplicated vulvovaginal candidiasis (thrush). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Malden, Article ID: CD002845, doi: 10.1002/14651858, 2007. Disponível em: <<http://www.cochrane.org/reviews/en/ab002845.html>>. Acesso em: 12 mar. 2009.



- REED, B. D. et al. *Candida* transmission and sexual behaviors as risks for a repeat episode of *candida* vulvovaginitis. **Journal of Women's Health**, New Rochelle, v. 12, p. 979-989, 2003.
- RIBEIRO, M. A. et al. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. **Mycopathologia**, Albany, v. 151, p. 5-10, 2001.
- ROSA, M. I.; RUMEL, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: Estudo exploratório. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 26, p. 65-70, 2004.
- ROZKIEWICZ, D. et al. Prevalence of *Candida albicans* in stool of children in 2003 with or without diarrhea from Bialystok region. **Przegląd Epidemiologiczny**, Zegrze, v. 59, p. 43-51, 2005.
- SATURNINO, A. C. et al. Vulvovaginitis: vaginal pH changes and associated microflora. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 20, p. 266-269, 2005.
- SHINOBU, C. S. et al. Lack of association between genotypes and virulence factors in *C. albicans* strains isolated from vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 467-471, 2007.
- SIMÕES, J. A. Sobre o diagnóstico da candidíase vaginal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 233-234, 2005.
- SUÁREZ, V. L.; LANCHI, M. R. P. Identificación de levaduras de exudados vaginales: características clínicas asociadas a la candidiasis. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Ciudad de La Habana, v. 54, p. 21-25, 2004.
- YOUNG, G.; JEWELL, D. Topical treatment for vaginal candidiasis (thrush) in pregnancy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Malden, Article ID: CD000225, doi: 10.1002/14651858.CD000225, 2001. Disponível em: <<http://www.cochrane.org/reviews/en/ab000225.html>>. Acesso em: 12 mar. 2009.

Enviado em 12/5/2009

Aprovado em 10/9/2009

**Apêndice E: Artigo publicado - Período de 2009 a 2013**

Rodrigues M.T., Gonçalves A.C., Alvim M.C.T., Castellano-Filho D.S., Zimmermann J.B., Silva V.L., Diniz C.G. Associação entre cultura de secreção vaginal, características sociodemográficas e manifestações clínicas de pacientes com diagnóstico de candidíase vulvovaginal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 35, n. 12, p. 554-561, 2013.

# Associação entre cultura de secreção vaginal, características sociodemográficas e manifestações clínicas de pacientes com diagnóstico de candidíase vulvovaginal

*Association between vaginal secretion culture, socio-demographic characteristics and clinical manifestations of patients with vulvovaginal candidiasis*

MÁRCIO TAVARES RODRIGUES<sup>1</sup>

ANA CAROLINA GONÇALVES<sup>1</sup>

MARIANA CAROLINA TOCANTINS ALVIM<sup>1</sup>

DIDIER SILVEIRA CASTELLANO FILHO<sup>2</sup>

JULIANA BARROSO ZIMMERMANN<sup>3</sup>

VÂNIA LÚCIA DA SILVA<sup>1</sup>

CLÁUDIO GALUPPO DINIZ<sup>1</sup>

## Artigo Original

### Palavras-chave

Candidíase vulvovaginal/microbiologia  
*Candida*  
Diagnóstico clínico

### Keywords

Candidiasis, vulvovaginal/microbiology  
*Candida*  
Clinical diagnosis

### Resumo

**OBJETIVO:** Investigar a etiologia, o perfil epidemiológico de pacientes com candidíase vulvovaginal (CVV) e possíveis fatores predisponentes. **MÉTODOS:** Secreção vaginal das pacientes foi semeada em ágar Sabouraud e amostras de leveduras foram isoladas e identificadas por *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Dados demográficos, clínicos e fatores predisponentes foram obtidos por meio de questionário. Para análise estatística, foram utilizados os testes t de Student, Fischer e do  $\chi^2$ , com auxílio do *software* Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), com nível de significância de 5%. **RESULTADOS:** Foram avaliadas 69 pacientes, com idade entre 15 e 52 anos, predominando mulheres brancas (79,7%), com escolaridade de nível superior completo (58%), casadas (56,5%) e com vida sexual ativa (97,1%). Dentre elas, 34,8% eram gestantes, 7,2% diabéticas, 1,4% soropositivas para AIDS e 36,2% usavam anticoncepcional oral. Antibioticoterapia recente foi citada por 13% das pacientes, uso de antifúngico por 5,8% e de antitricomonas por 1,4%. Uso de corticosteroides foi relatado por 2,9% das participantes e de antineoplásicos, por 1,4%. Fluxo vaginal e prurido foram as principais queixas apresentadas, respectivamente, por 97,1 e 73,9% das pacientes, seguido de ardência (63,8%) e hiperemia (63,8%). Quando presente, o fluxo foi majoritariamente branco (88,1%) ou grumoso (86,6%). O diagnóstico foi confirmado pela cultura em 55 (79,7%) pacientes, sendo 4 casos de infecção mista. A espécie prevalente foi *C. albicans*, seguida por um caso de *C. glabrata*, que foi encontrada em mais duas pacientes em associação com *C. albicans*. Nas outras duas infecções polimicrobianas, *C. lusitanae* foi isolada com *C. albicans*. **CONCLUSÕES:** Embora a positividade da cultura tenha sido alta e os dados clínicos de CW sejam característicos, a sintomatologia não é patognomônica. *C. albicans* é a espécie prevalente, mas deve-se atentar para a ocorrência de outras espécies na etiologia de CW, como a emergência de *C. lusitanae*.

### Abstract

**PURPOSE:** To investigate the etiology and the epidemiological profile of patients with vulvovaginal candidiasis (VVC) and predisposing factors. **METHODS:** Vaginal secretions were streaked in Sabouraud agar and yeast samples were isolated and identified by *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Demographic and clinical data were obtained with a questionnaire. For statistical analysis, the Student's t test, the  $\chi^2$  and Fischer tests were applied as needed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software, with the level of significance set at 5%. **RESULTS:** Sixty-nine patients aged from 15 to 52 years were evaluated. They were predominantly white (79.7%), with higher education (58%), married (56.5%) and sexually active (97.1%). Among them, 34.8% were pregnant, 7.2% diabetic, 1.4% seropositive for AIDS, and 36.2% were using oral contraceptives. Recent antibiotic therapy was mentioned by 13% of the patients, and antifungal or anti-trichomonas therapy was mentioned by 5.8 and 1.4% of the patients, respectively. Corticosteroid use was reported by 2.9% and antineoplastic by 1.4%. Vaginal discharge and itching were the main complaints (97.1 and 73.9%), followed by burning (63.8%) and erythema (63.8%). When present, the vaginal flow was predominantly white (88.1%) or lumpy (86.6%). The diagnosis was confirmed by culture in 55 (79.7%) patients, with mixed infections in 4 patients. The most prevalent species was *C. albicans*, followed by *C. glabrata* (one monoinfection and two mixed infections with *C. albicans*). *C. lusitanae* and *C. albicans* were also identified in mixed infections (two patients). **CONCLUSION:** Despite the high culture positivity and clinical data characteristic of VVC, the symptoms were not pathognomonic. *C. albicans* is the most prevalent species, but other species are also involved in VVC etiology, such as the emergence of *C. lusitanae*.

### Correspondência

Cláudio Galuppo Diniz  
Rua José Lourenço Kelmer, s/n  
Campus Universitário  
CEP: 36036-900  
Juiz de Fora (MG), Brasil

### Recebido

25/11/2013

### Aceito com modificações

15/12/2013

Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora (MG), Brasil.

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora (MG), Brasil.

<sup>2</sup>Disciplina de Obstetrícia do Curso de Medicina, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora – Juiz de Fora (MG), Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora (MG), Brasil.

Fonte de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (financiamento); PROQUALI/Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF (bolsa).

Conflito de interesses: nada a declarar.

## Introdução

As vulvovaginites, principal queixa nas consultas ginecológicas, referem-se a uma variedade de distúrbios inflamatórios do trato genital inferior, caracterizada por uma tríade de sintomas, como dor vulvovaginal, prurido e ardor, que podem ser secundárias à infecção, irritação, alergia ou doença sistêmica<sup>1</sup>. Embora as causas infecciosas sejam responsáveis por mais de 90% dos casos e incluam vaginose bacteriana, candidíase e tricomoníase, aproximadamente 30% das mulheres sintomáticas permanecem sem diagnóstico após avaliação clínica<sup>1,2</sup>. Recomenda-se que o diagnóstico de infecções vaginais não deva se basear apenas nos dados clínicos e que exames microbiológicos como cultura e teste de susceptibilidade a drogas devam ser incorporados, quando possível, como complementares ao diagnóstico das vulvovaginites<sup>3,4</sup>.

A candidíase vulvovaginal (CVV), associada a diferentes espécies do gênero *Candida*, é a segunda causa de vaginite aguda, depois da vaginose bacteriana. Na Europa e em outras regiões, a CVV é a causa mais comum de vaginite, e estima-se em todo o mundo que 75% das mulheres apresentam, durante a sua vida, pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal<sup>1</sup>. A prevalência de *Candida albicans* na etiologia da CVV é relatada de forma abundante na literatura, embora a ocorrência de outras espécies, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* tem sido cada vez mais frequente<sup>5-8</sup>. Além disso, outras espécies como *C. krusei*, *C. kefyr* e *C. lusitanae* tem sido apontadas como emergentes<sup>9-15</sup>. A etiologia da CVV tem sido, ainda, associada a mais de uma espécie de *Candida* ou à associação de *Candida* com outros micro-organismos<sup>5,6,12,16,17</sup>.

A doença acomete principalmente as mulheres em idade reprodutiva e caracteriza-se clinicamente pelo prurido vulvar intenso, ardência, leucorreia, dispareunia, disúria, edema e eritema vulvovaginal<sup>17,18</sup>. As formas assintomáticas de CVV estão mais associadas com as espécies de *C. não-albicans*<sup>18</sup>. Não existem manifestações clínicas patognomônicas de CVV, tornando-se importante identificar o agente etiológico para o diagnóstico diferencial de outras vaginites infecciosas<sup>19-21</sup>. Além disso, tem sido observado um aumento na resistência aos derivados azólicos, principalmente entre as espécies de *C. não-albicans* isoladas de pacientes com CVV, sendo este um importante fator para o desenvolvimento dos casos de recorrência<sup>7,8,15,22</sup>.

O tratamento da CVV normalmente é empírico, sendo os derivados azólicos e os poliênicos as drogas mais utilizadas<sup>12,14,22,23</sup>. A maioria das mulheres não responde à terapia inicial, e os casos de recidivas são frequentes, colocando em dúvida a eficácia desses tratamentos. As dificuldades encontradas estão associadas às espécies *C. não-albicans*, que dependem de concentrações maiores de antifúngicos para

serem inibidas<sup>11</sup>. O perfil de susceptibilidade de espécies de *Candida* aos antifúngicos não é o mesmo nas diferentes populações ou comunidades, o que torna fundamental a identificação do agente etiológico causador da candidíase antes de iniciar a terapêutica empírica<sup>11,12,22,23</sup>.

Algumas situações têm sido relatadas como importantes fatores de risco para CVV, como gravidez, uso de antibióticos de amplo espectro, uso de contraceptivos orais, *diabetes mellitus* e imunodeficiências<sup>17,19</sup>. São apontadas ainda como fatores predisponentes de CVV as neoplasias, corticoterapia, dieta alimentar ácida, hábito de usar roupas justas ou de fibra sintética, pequenos traumas durante o ato sexual, ciclos menstruais regulares e hábitos higiênicos inadequados<sup>18</sup>.

Considerando que a variação das espécies de acordo com a localização geográfica deve ser levada em conta entre os fatores epidemiológicos de CVV<sup>11,18,20</sup> e que os dados epidemiológicos sobre a doença no Brasil são escassos<sup>19,24</sup>, pesquisas regionais são necessárias para a determinação do envolvimento de diferentes espécies de *Candida* na etiologia da CVV, ajudando no tratamento e manejo clínico dessa patologia<sup>1</sup>. Assim, neste estudo, os objetivos foram isolar e identificar amostras de *Candida* a partir de secreção vaginal de pacientes com diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal na Zona da Mata Mineira e investigar possíveis correlações entre cultura positiva, características sociodemográficas e manifestações clínicas associadas a fatores de risco e sinais e sintomas.

## Métodos

Trata-se de um estudo descritivo, observacional, transversal, realizado com amostras de conveniência. A população amostrada foi composta por 69 pacientes com diagnóstico clínico de CVV, recrutadas entre dezembro de 2009 e dezembro de 2011, em dois consultórios da rede particular e/ou conveniada e em um ambulatório de hospital da rede pública (Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus) em Juiz de Fora, Minas Gerais, durante consulta ginecológica. Um formulário foi preenchido para cada paciente pelo profissional atendente, contendo informações como idade, raça, nível de escolaridade, estado civil, atividade sexual, presença de fatores de risco ou predisponentes para CVV e sinais e sintomas associados. Todas as pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, parecer nº 031/2009.

Amostras de secreção vaginal foram coletadas durante o exame clínico das pacientes, com zangarões flexíveis esterilizados (Alamar Tecnocientífica Ltda., Diadema, Brasil), e imediatamente imersas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) em tubos de ensaio lacrados com rolhas de

algodão hidrofóbico. O material foi enviado no mesmo dia ao Laboratório de Micologia Ambiental e Médica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (LMAM/ICB/UFJF) para processamento experimental.

Os espécimes clínicos foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar Sabouraud dextrose (Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda., Duque de Caxias, Brasil), suplementado com cloranfenicol (10 mg/mL – Northeast General Pharmaceutical Factory, Shenyang, China), e incubados a 35°C, por um período de 2–7 dias. Das placas onde houve desenvolvimento de colônias leveduriformes, foram escolhidas para subcultivo no mesmo meio de cultura sem droga antibacteriana quatro colônias representativas por espécime clínico, quando possível, morfológicamente distintas. Após obtenção de culturas puras, as amostras de leveduras foram depositadas na coleção de culturas do LMAM/ICB/UFJF, criopreservadas e submetidas a procedimento de extração de DNA para identificação molecular. As amostras de referência *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 20298, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida parapsilosis* ATCC 20019 e *Candida glabrata* ATCC 90030 foram utilizadas como controle experimental.

O DNA genômico das leveduras foi extraído pelo método de digestão química e purificação com fenol-clorofórmio, de acordo com metodologia já estabelecida para obtenção de DNA de leveduras de alto grau de pureza, com modificações<sup>25</sup>. Assim, a partir de 2,0 mL de uma cultura de 48 horas em caldo Sabouraud (Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda., Duque de Caxias, Brasil), massa celular foi obtida após centrifugação a 12.000 x g, por 5 minutos em centrífuga refrigerada (Jouan CR3i, Thermo Electron Corporation, MA, EUA), e as células foram lavadas em igual volume com água destilada previamente esterilizada. Após nova centrifugação nas mesmas condições, a massa celular resultante foi suspensa em 0,5 mL de tampão de lise (Tris HCl pH 8,0 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton X100 2% v/v, SDS 1%), acrescida de pérolas de vidro e submetida a agitação em vórtex (Coleman Equipamentos para Laboratórios Comércio e Importação Ltda., Santo André, Brasil) por 2 ciclos 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados 0,4 mL de fenol saturado com Tris (1M, pH 8), 0,4 mL de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), e as amostras foram novamente agitadas em vórtex, por 10 segundos, e centrifugadas para separação de fases, a 12.000 x g, por 5 minutos. A fase aquosa foi retirada e o DNA, precipitado, após a adição de 0,05 mL de NaCl 5M, 2 volumes de etanol gelado e centrifugação a 12.000 x g, por 30 minutos, a 4°C. Os extratos foram lavados com etanol 70%, solubilizados, tratados com RNase 1 mg/mL e quantificados por espectrofotometria (Qubit 2.0, Fluorometer, Invitrogen, Life Technologies, OR, EUA).

A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

A identificação microbiana foi realizada por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em reações multiplex, utilizando-se oligoiniciadores específicos para o gênero *Candida* (*C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. topicalis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis*) e oligoiniciadores universais para leveduras clinicamente relevantes, tal como estabelecido na literatura<sup>26</sup>. Os oligoiniciadores universais foram usados para amplificação das regiões intergênicas espaçadoras das leveduras patogênicas associadas a doenças humanas, para originar os amplicons esperados na reação de PCR multiplex com os oligoiniciadores espécie-específicos. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial, 10 minutos, 94°C e 40 ciclos de 15 segundos, 94°C; 30 segundos, 55°C; 45 segundos, 65°C, em termociclador Techne® TC-412 (Thermal Cycler, OSA, Reino Unido)<sup>26</sup>.

Os dados obtidos foram expressos como média e desvio padrão para variáveis quantitativas e como frequência absoluta e frequência relativa para as variáveis categóricas. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 13.0 para *Windows* (Chicago, IL, EUA) e utilizado o teste t de Student para comparação de médias entre amostras independentes. Para verificar associação, utilizou-se o teste exato de Fischer quando possível ou o teste do  $\chi^2$  para variáveis com mais de duas categorias. O nível de significância adotado foi de 5%, e todos os testes foram bicaudais.

## Resultados

Entre as pacientes que participaram deste estudo, com diagnóstico clínico de CVV (n=69), a cultura da secreção vaginal permitiu a recuperação de amostras de *Candida* em espécimes clínicos provenientes de 55 participantes, o que corresponde a uma frequência de 79,7% de positividade na cultura. Entre as leveduras isoladas, 3 espécies foram identificadas, sendo a mais prevalente *Candida albicans* (98,1%), isolada de 54 pacientes, seguida por *C. glabrata* (5,4%), isolada de 3 pacientes e *C. lusitaniae* (3,6%), isolada de 2 pacientes.

Dessas mulheres cuja cultura de secreção vaginal foi positiva, monoinfecção foi observada em 51 pacientes (92,7%), enquanto que infecção polimicrobiana foi observada em 4 (7,3%). Ao se considerar a etiologia das infecções monomicrobianas, *C. albicans* foi a espécie predominante, isolada a partir da cultura da secreção vaginal de 50 dessas pacientes (90,9%). Além disso, *C. glabrata* também foi identificada associada à monoinfecção em 1 paciente (1,8%). Ao se considerar a etiologia das

infecções polimicrobianas, as associações *C. albicans* e *C. glabrata* ou *C. albicans* e *C. lusitanae* foram observadas em duas pacientes.

Os dados sociodemográficos das pacientes participantes deste estudo são apresentados na Tabela 1. A idade não foi uma característica que pode ser relacionada com cultura positiva para *Candida* spp. a partir da secreção vaginal ( $p=0,6$ ), sendo o mesmo observado em relação ao estado civil ( $p=0,1$ ), à etnia ( $p=0,2$ ) e à escolaridade ( $p=0,1$ ).

**Tabela 1.** Características sociodemográficas do grupo de pacientes avaliadas

Variáveis avaliadas	Pacientes no grupo (n=69)	Frequência (%)	Correlação com a cultura fúngica (valor p)
Faixa etária média	28,2 (7,9)*	–	0,6**
Estado civil			0,1***
Solteira	30	43,5	
Casada	39	56,5	
Etnia (cor da pele)			0,2****
Branca	55	79,7	
Negra	08	11,6	
Parda	06	08,7	
Escolaridade			0,1****
Ensino Superior	40	58,0	
Ensino Médio	20	29,0	
Ensino Fundamental	09	13,0	
Vida sexual ativa			NS
Sim	67	97,1	
Não	02	02,9	

\*Resultado expresso em média (desvio-padrão); \*\*comparação de médias de idade realizada pelo teste *t* de Student para amostras independentes; \*\*\*associação calculada pelo teste exato de Fischer; \*\*\*\*associação calculada pelo teste do  $\chi^2$ ; NS: não significante

**Tabela 2.** Características clínicas associadas a fatores de risco para candidíase vulvovaginal no grupo de pacientes avaliadas

Variáveis avaliadas	Pacientes no grupo (n=69)	Frequência (%)	Associação com a cultura fúngica (valor p)*
Em gestação	24	34,8	0,5
Diagnóstico de diabetes	05	7,2	0,2
Diagnóstico de AIDS	1	1,4	NS
Anticoncepcional oral	25	36,2	NS
Uso de dispositivo intrauterino	0	–	–
Em corticoterapia	02	2,9	0,03
Uso de quimioterápico**	1	1,4	0,2
Uso de droga antibacteriana			0,3
Sim	9	13,0	
Não informado***	5	7,2	
Uso de droga antifúngica			0,02
Sim	4	5,8	
Não informado***	09	13,0	
Uso de droga anti-tricomonas			NS
Sim	1	1,4	
Não informado***	11	15,9	

\*Associação calculada pelo teste exato de Fisher; \*\*quimioterapia antineoplásica; \*\*\*categoria excluída para calcular a associação; NS: não significante.

Ao serem questionadas sobre a atividade sexual nos últimos 30 dias antes da consulta ginecológica que resultou no diagnóstico clínico de CVV e coleta de espécime clínico para cultura microbiológica, apenas 2 participantes (2,9%) relataram não ter vida sexual ativa, e as 67 pacientes sexualmente ativas (97,1%) informaram ter somente um parceiro sexual. Não foi observada associação entre essas variáveis e o isolamento de leveduras ( $p=1,0$ ).

Embora não tenha sido estabelecida correlação entre cultura positiva para *Candida* e as variáveis clínicas como diabetes ( $p=0,266$ ), gravidez ( $p=0,537$ ), soropositividade para AIDS ( $p=1,000$ ), quimioterapia ( $p=0,203$ ), uso de anticoncepcionais orais ( $p=1,000$ ), uso de drogas antibacterianas ( $p=0,372$ ) e uso de droga anti-tricomonas ( $p=1,000$ ), observou-se uma associação entre cultura negativa e uso de corticoides ( $p=0,039$ ) e também com o uso de drogas antifúngicas ( $p=0,023$ ) (Tabela 2).

O diagnóstico clínico da CVV foi realizado no serviço médico, considerando-se os sinais observados no exame ginecológico e os sintomas relatados pelas pacientes (Tabela 3). O prurido vulvar foi o sintoma mais frequentemente citado pelas pacientes avaliadas (73,9%), seguido por relato de ardência vulvar (63,8%). A maioria das participantes do estudo apresentou fluxo vaginal (97,1%) e hiperemia vulvar (63,8%). Não foram observadas, entretanto, correlações significativas entre a cultura fúngica e os sintomas relatados, sejam prurido ( $p=0,496$ ) ou ardência vulvar ( $p=0,350$ ), ou os sinais clínicos avaliados: fluxo vaginal ( $p=1,000$ ) ou hiperemia vulvar ( $p=0,350$ ).

**Tabela 3.** Manifestações clínicas relacionadas ao diagnóstico de candidíase vulvovaginal no grupo de pacientes avaliadas

Sinais e sintomas	Pacientes no grupo (n=69)	Frequência (%)	Associação com a cultura fúngica (valor p)
Presença de prurido	51	73,9	0,4*
Relato de ardência vulvar	44	63,8	0,3*
Hiperemia vulvar	44	63,8	0,3*
Ocorrência de fluxo vaginal	67	97,1	NS
Cor do fluxo vaginal presente			0,4**
Branco	59	85,5	
Esverdeado	2	2,9	
Amarelado	2	2,9	
Branco-amarelado	1	1,4	
Branco-esverdeado	1	1,4	
Amarelo-esverdeado	1	1,4	
Cor não relatada	1	1,4	
Aspecto do fluxo vaginal presente			0,1**
Grumoso	58	84,1	
Fluido	8	11,6	
Aspecto não relatado	1	1,4	

\*Associação calculada pelo teste exato de Fisher; \*\*associação calculada pelo teste do  $\chi^2$ .

A análise do fluxo vaginal revelou que a secreção tinha coloração branca em 88% dos casos, enquanto que secreções de coloração esverdeada ou amarelada foram observadas em frequências de 2,9%. Além disso, secreções de coloração branco-amarelada, branco-esverdeada ou amarelado-esverdeada também foram observadas (1,4%). Para uma paciente, não foi relatada a coloração do fluxo vaginal durante o exame clínico. Considerando-se o aspecto do fluxo vaginal, essa secreção foi descrita como grumosa em 84,1% dos casos ou fluida em 11,6%. Não foi relatado o aspecto do fluxo vaginal para uma paciente. Não foram observadas correlações significativas entre cultura positiva de *Candida* e coloração ( $p=0,407$ ) ou aspecto ( $p=0,187$ ) do fluxo vaginal.

Aproximadamente metade das pacientes avaliadas (47,8%) apresentou os 4 sinais e sintomas clínicos avaliados (hiperemia, fluxo vaginal, prurido e ardência), enquanto que apenas fluxo vaginal foi observado em 17,4%. Observou-se ainda que 20,3 e 14,5% das pacientes apresentavam, respectivamente, 3 e 2 das manifestações clínicas avaliadas, simultaneamente.

## Discussão

A queixa de corrimento vaginal é a principal razão que leva mulheres do mundo inteiro a procurar serviços de saúde, sendo as vaginites infecciosas as causas mais comuns<sup>2,4</sup>. Embora na prática médica o diagnóstico das vulvovaginites seja essencialmente clínico, ele é considerado inadequado, e sugere-se que deve ser confirmado por exames microbiológicos clássicos baseados em cultura ou utilizando-se técnicas moleculares<sup>2,4,5</sup>. Além disso, considerando-se a emergente resistência antimicrobiana, é sugerido o isolamento e identificação da levedura, evitando-se terapias empíricas desnecessárias às pacientes<sup>7,20,27</sup>.

Neste estudo, a alta frequência de positividade em cultura de leveduras associada às pacientes com diagnóstico clínico de CVV (79,7%) é semelhante à apresentada por outros autores e reforça a necessidade do diagnóstico laboratorial associado ao diagnóstico clínico<sup>2,3,7</sup>. Entretanto, percebe-se que o rigor na observação de sinais e sintomas durante o diagnóstico clínico, associado às boas práticas laboratoriais e carga microbiana presente na secreção vaginal, possui grande impacto na correlação entre diagnóstico de CVV e isolamento de leveduras. Vários autores relatam uma baixa frequência de isolamento de fungos (>50%) em secreção vaginal de pacientes com diagnóstico clínico de CVV<sup>4,6,15,20,21,28</sup>. De acordo com a literatura, é altamente provável que a maioria das mulheres com queixas vaginais comuns tenha um diagnóstico impreciso, sendo que esse problema permanece como um desafio<sup>2,7</sup>.

Este estudo, confirmando os dados da literatura nacional e internacional, indica a predominância da espécie

*C. albicans* como a mais frequentemente associada à CVV<sup>5,6,8,9,12,15,18,20-22,29</sup> e *C. glabrata* como a segunda espécie mais prevalente<sup>3,5-9,12,17,21,23,26,27,29</sup>. Tem sido registrada a participação de *C. lusitaniae* em infecções tanto mono quanto polimicrobianas, tal como observado neste estudo, considerando-se a etiologia polimicrobiana da CVV<sup>9,10,15</sup>. Assim, mesmo que essa espécie só tenha sido encontrada em associação com *C. albicans*, há de se registrar a sua emergência na etiopatogenia da doença, suscitando estudos prospectivos para se esclarecer a real participação de *C. lusitaniae* no desenvolvimento da CVV e terapia empírica mais apropriada.

De acordo com a literatura, a taxa de ocorrência de infecção mista em CVV é bastante variada (4 a >10%)<sup>12,16</sup>. A detecção de infecção mista em CVV é possibilitada pela utilização de meios de cultura cromogênicos, ou facilitada pelo isolamento de mais de uma colônia microbiana amostral em cada placa de cultivo, ao se usar meios de cultura não cromogênicos tradicionais, como o ágar Sabouraud dextrose suplementado com cloranfenicol<sup>27</sup>. Na maioria dos casos de infecção mista, são relatadas as associações: *C. albicans* e *C. glabrata*; *C. albicans* e *C. krusei*; *C. albicans* e *C. tropicalis*; *C. albicans* e *C. parapsilosis*; *C. albicans* e *C. tropicalis*; *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*; *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*; *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*; além da associação entre *C. glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*<sup>10,16,27</sup>. Neste estudo, foi observada, ainda, de maneira incomum, a associação de *C. albicans* e *C. lusitaniae* na secreção vaginal de pacientes com diagnóstico clínico de CVV.

A CVV é relatada principalmente em mulheres que estão em idade reprodutiva, o que também foi observado no presente trabalho. A literatura consultada é unânime em apontar as pacientes com CVV pertencentes à faixa etária de 20 a 40 anos como as mais acometidas pela doença<sup>4,6,8,24</sup>. Associa-se a esse fato a atividade ovariana máxima com produção de estrogênio, o que favorece o crescimento de *Candida* e sua aderência às células epiteliais vaginais<sup>7</sup>. A transmissão sexual de CVV é mencionada, apesar de a doença não ser considerada uma doença sexualmente transmissível (DST). Entretanto, a literatura sugere a predominância entre as mulheres que têm vida sexual ativa, tal como observado neste estudo<sup>6,16,17,28,30,31</sup>.

Poucos são os relatos envolvendo CVV em que se avalia o estado civil das pacientes. Os achados do presente estudo, como também os relatados por outros autores, indicam um predomínio de CVV entre as mulheres casadas<sup>29,32</sup>. Apesar disso, existem relatos que sugerem maior frequência de acometimento de CVV entre as mulheres solteiras<sup>17</sup>, ou sem relação com o estado civil<sup>2</sup>. Considerando-se a diversidade étnica e social dos grupos de pacientes amostrados nos estudos de CVV, a relação entre a prevalência da doença ou suscetibilidade à sua ocorrência e

a etnia (cor da pele) das pacientes é controversa, não sendo estabelecida, como neste estudo, nenhuma correlação<sup>2,17,32</sup>. O mesmo fenômeno é observado em relação à escolaridade das pacientes com diagnóstico clínico de CVV<sup>2,21,31-33</sup>. Apesar disso, neste estudo, observou-se um predomínio da doença entre as participantes que foram consideradas de cor branca e grau universitário.

Várias investigações foram realizadas para se avaliar os potenciais fatores de risco para CVV, mas os dados epidemiológicos são conflitantes e seu papel na patogênese da doença ainda é controverso<sup>6</sup>. Os fatores predisponentes mais comuns associados com a candidíase são gravidez, *diabetes mellitus*, uso de contraceptivos, terapia antimicrobiana, atividade sexual e higiene sexual<sup>7</sup>. Qualquer alteração dos níveis de glicose, especialmente em situações de hiperglicemia, pode desencadear CVV, incluindo, assim, diabetes entre os fatores de risco<sup>1,7,28</sup>. Assim, diferentes taxas de prevalência de CVV em mulheres com diabetes são registradas<sup>6,7,12,16,22,28,31</sup>.

Durante a gravidez, o nível elevado de estrogênio contribui para um aumento no conteúdo de glicogênio vaginal, importante fonte de carbono para o desenvolvimento do fungo<sup>7</sup>. Neste estudo, a frequência de pacientes grávidas entre as diagnosticadas com CVV foi semelhante à observada por outros autores<sup>18</sup>, porém sugere-se que a doença possa ocorrer mais comumente entre as mulheres grávidas do que nas não grávidas<sup>7,21</sup>. Neste estudo, não foi observada correlação entre cultura de leveduras positiva e gravidez como já relatado<sup>20</sup>, embora essa correlação tenha sido estabelecida anteriormente<sup>3</sup>.

O efeito dos contraceptivos orais na predisposição à CVV é mal compreendido, e os resultados das pesquisas são conflitantes. Acredita-se que o elevado teor de estrogênio nos contraceptivos orais pode ser um dos fatores de predisposição, como verificado durante a gravidez<sup>7</sup>. Neste estudo, 36,2% das pacientes com CVV usavam anticoncepcionais orais, e não foi observada correlação entre essa variável e a cultura de *Candida*, como observado por outros autores<sup>20,30</sup>. Entretanto, há registros de correlação positiva entre o uso de anticoncepcionais hormonais com vulvovaginite clínica, e alguns levantamentos mostram porcentagem maior de mulheres com CVV que usam anticoncepcionais orais<sup>17-19,29</sup>. A incidência de CVV não parece estar associada ao uso de DIU<sup>18,20</sup>, embora seja aceito que o aumento do risco de infecção esteja relacionado à elevada capacidade da levedura para a produção de um biofilme no DIU, que poderia atuar como um reservatório de *Candida*<sup>6</sup>.

A CVV pode estar associada a situações de debilidade do hospedeiro, como no caso das pacientes em uso de corticosteroides e agentes citotóxicos, ou a doenças sistêmicas (AIDS, por exemplo) ou hematológicas que promovem a supressão funcional das células T, diminuindo

a capacidade de resposta imunológica e favorecendo a infecção<sup>17</sup>. No entanto, neste estudo, tal como relatado por outros autores, foi observada baixa frequência de CVV em pacientes que fizeram uso de corticoides, quimioterápicos antineoplásicos ou soropositivas para HIV<sup>28,30</sup>.

O uso de antibióticos é apontado como responsável por aumentar a taxa de colonização vaginal por *Candida* de 10 a 30%, pois essas drogas agem diminuindo a população bacteriana que geralmente compete com as leveduras da microbiota vaginal<sup>7,17</sup>. Vários autores evidenciam a suscetibilidade à CVV em pacientes submetidas à antibioticoterapia e frequência de diagnóstico entre essas pacientes em taxas semelhantes às encontradas neste trabalho<sup>7,12,16,21,22</sup>. Embora não existam estudos com abordagem semelhante para comparação, os dados obtidos mostram correlação entre uso de drogas antifúngicas e cultura negativa de *Candida*. Como esperado, é plausível a sugestão da interferência da droga na recuperação de amostras de *Candida* em cultura, principalmente se o uso da medicação foi em data próxima à obtenção do espécime clínico.

A sintomatologia típica da CVV inclui o prurido e o corrimento vaginal em grumos, semelhante à nata de leite. Outros sintomas também são frequentes, como o desconforto vulvar, a dispareunia e a disúria, porém nenhum deles é específico para CVV<sup>17,18</sup>. O prurido, considerado o principal sintoma, exacerba-se mais à noite devido ao calor local, mas, apesar de ser muito frequente, também pode estar presente em outras patologias ginecológicas<sup>17</sup>. Esse foi o principal sintoma relatado neste estudo, como observado por outros autores<sup>6,15,21,27,28,30</sup>. A ardência vulvar, outro sintoma comumente relatado na CVV, foi o segundo sintoma mais observado neste estudo, em concordância com dados da literatura<sup>6,19,30</sup>. Áreas hiperemiadas, principalmente na vulva e vagina, como observadas neste estudo, têm sido comumente relatadas como comuns nas pacientes com CVV, às vezes como sintoma positivamente associado ao diagnóstico<sup>6,18,19,29,30</sup>, tal como o corrimento vaginal, em algumas situações relatado como única queixa feita pelas pacientes<sup>6,15,17-19,27-30</sup>.

Apesar da literatura escassa que aborde aspecto e coloração do fluxo vaginal e sua correlação com a CVV, os dados obtidos neste estudo mostram-se semelhantes ao descrito por outros autores<sup>17,19,28</sup>, sem relações fisiopatológicas estabelecidas. Além disso, em oposição à observação majoritária de ocorrência e relato de mais de um sinal e sintoma clínico entre as pacientes diagnosticadas com CVV, dados da literatura apontam prurido ou ardência como manifestação clínica única predominante entre as pacientes com diagnóstico de CVV<sup>22</sup>.

Embora os resultados obtidos neste estudo corroborem a prevalência de *C. albicans* na etiologia de CVV, apontam a emergência da sua associação com *C. lusitanae*, dado ainda não relatado na região amostrada. Essa observação



suscita a necessidade do diagnóstico microbiológico para estratégias antimicrobianas mais eficazes. Além disso, à medida que aproximadamente 20% dos espécimes clínicos provenientes de pacientes com diagnóstico clínico de CVV tiveram cultura negativa, questiona-se o tratamento antifúngico empírico como conduta terapêutica na rotina ginecológica. O não estabelecimento de correlações significativas entre a positividade da cultura fúngica e as características clínicas associadas a fatores de risco e sinais e sintomas entre as pacientes com diagnóstico clínico de CVV permite a reafirmação de que não existem manifestações patognômicas da doença e que os procedimentos

laboratoriais devem ser realizados para um diagnóstico etiológico correto de vaginite.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Federal de Juiz de Fora – PRORH e PROPESQ – pelo apoio financeiro. À Dra. Aline Siqueira Ferreira pela disponibilidade e ajuda na análise estatística dos resultados.

## Referências

- Rodrigues MT, Simões LZ, Diniz CG. Clinical, microbiological and therapeutic aspects of vulvovaginal candidiasis and recurrent vulvovaginal candidiasis: importance of regional surveys. *HU Rev.* 2009;35(3):175-81.
- Lowe NK, Neal JL, Ryan-Wenger NA. Accuracy of the clinical diagnosis of vaginitis compared to a DNA probe laboratory standard. *Obstet Gynecol.* 2009;113(1):89-95.
- Linhares LM, Witkin SS, Miranda SD, Fonseca AM, Pinotti JA, Ledger WJ. Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2001;9(4):221-5.
- Esim Buyukbayrak E, Kars B, Karsidag AY, Karadeniz BI, Kaymaz O, Gencer S, et al. Diagnosis of vulvovaginitis: comparison of clinical and microbiological diagnosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2010;282(5):515-19.
- Alves IA, Camargo FP, Goulart LS. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* sp. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(5):575-9.
- Amouri I, Sellami H, Borji N, Abbes S, Sellami A, Cheikhrouhou F, et al. Epidemiological survey of vulvovaginal candidosis in Sfax, Tunisia. *Mycoses.* 2011;54(5):e499-505.
- Bankar SM, Powar RM, Patil SA, Kalthur SG. Prevalence of non-albican *Candida* infection in Maharashtrian women with leucorrhoea. *Ann Trop Med Public Health.* 2012;5(2):119-23.
- Mahmoudi Rad M, Zafarghandi AS, Amel Zabihi M, Tavallaee M, Mirdamadi Y. Identification of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2012;2012:872169.
- Chong PP, Lee YL, Tan BC, Ng KP. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. *J Med Microbiol.* 2003;52(Pt 8):657-66.
- Rivero M, Centeno S, Díaz J. Frecuencia de espécies de *Candida* aisladas en pacientes embarazadas con vulvovaginitis. *Rev Soc Venez Microbiol.* 2003;23(2):148-52.
- Ferrazza MSHS, Maluf MLF, Consolaro MEL, Shinobu CS, Svidzinski TIE, Batista MR. [Characterization of yeasts isolated from the vagina and their association with vulvovaginal candidiasis in two cities of the South of Brazil]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005;27(2):58-63. Portuguese.
- 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(5):2155-62.
- García-Heredia M, García 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(1):9-12. Portuguese.
- Ozcan SK, Budak F, Yucesoy G, Susever S, Willke A. Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. *APMIS.* 2006;114(2):139-45.
- Esmailzadeh S, Omran SM, Rahmani Z. Frequency and etiology of vulvovaginal candidiasis in women referred to a gynecological center in Babol, Iran. *Int J Fertil Steril.* 2009;3(2):74-7.
- Mahmoudi Rad M, Zafarghandi S, Abbasabadi B, Tavallaee M. The epidemiology of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;155(2):199-203.
- Bastos AMC, Bravo RS, Goulart Filho RA, Isalan TB, Barreto NA. Perfil das mulheres com processo inflamatório por *Candida* em resultados de colpocitologia oncológica numa clínica de DST. *DST J Bras Doenças Sex Transm.* 2003;15(2):26-38.
- Holanda AAR, Fernandes ACS, Bezerra CM, Ferreira MAF, Holanda MRR, Holanda JCP, et al. [Vulvovaginal candidiasis: symptomatology, risk factors and concomitant anal colonization.] *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007;29(1):3-9. Portuguese.
- Rosa MI, Rumel D. [Risk factors for vulvovaginal candidiasis: an exploratory study]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2004;26(1):65-70. Portuguese.
- Andrioli JL, Oliveira GSA, Barreto CS, Sousa ZL, Oliveira MCH, Cazorla IM, et al. [Frequency of yeasts in vaginal fluid of women with and without clinical suspicion of vulvovaginal candidiasis.] *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009;31(6):300-4. Portuguese.
- Ahmad A, Khan AU. Prevalence of *Candida* species and potential risk factors for vulvovaginal candidiasis in Aligarh, India. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009;144(1):68-71.
- Gross NT, Arias ML, Moraga M, Baddasarow Y, Jarstrand, C. Species distribution and susceptibility to azoles of vaginal yeasts isolated prostitutes. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2007;2007:82412.
- Ribeiro MA, Dietze R, Paula CR, Da Matta DA, Colombo AL. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. *Mycopathologia.* 2001;151(1):5-10.
- Pereira DC, Backes LTH, Calil LN, Fuentefria AM. A six-year epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in cytopathology reports in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Patol Trop.* 2012;41(2):163-8.

25. Furlaneto-Maia L, Specian AFL, Thörn DSW, Oliveira MT, Furlaneto MC. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. *Acta Sci Health Sci*. 2007;29(1):33-7.
26. Carvalho A, Costa-De-Oliveira S, Martins ML, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Ludovico P, et al. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med Mycol*. 2007;45(7):619-27.
27. Boatto HF, Moraes MS, Machado AP, Girão MJBC, Fischman O. [Relationship of laboratory results with clinical signs and symptoms of patients with vulvovaginal candidiasis and the significance of the sexual partners for the maintenance of the infection]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29(2):80-4. Portuguese.
28. Zimmermann JB, Paiva AO, Costa ACSS, Sousa AMGV, Chagas AR, Lima AAC. Validade do diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal. *HU Rev*. 2009;35(1):11-8.
29. Corrêa PR, David PRS, Peres NP, Cunha KC, Almeida MTG. [Phenotypic characterization of yeasts isolated from the vaginal mucosa of adult women]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;31(4):177-81. Portuguese.
30. 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(1):66-72.
31. Malazy OT, Shariat M, Heshmat R, Majlesi F, Alimohammadian M, Tabari NK, et al. Vulvovaginal candidiasis and its related factors in diabetic women. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2007;46(4):399-404.
32. Reed BD, Zazove P, Pierson CL, Gorenflo DW, Horrocks J. *Candida* transmission and sexual behaviors as risks for a repeat episode of *Candida* vulvovaginitis. *J Womens Health (Larchmt)*. 2003;12(10):979-89.
33. Fang X, Zhou Y, Yang Y, Diao Y, Li H. Prevalence and risk factors of trichomoniasis, bacterial vaginosis, and candidiasis for married women of child-bearing age in rural Shandong. *Jpn J Infect Dis*. 2007;60(5):257-61.

## ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PRO-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP UFJF  
36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

### Parecer nº 031/2009

**Protocolo CEP-UFJF:** 1676.020.2009 **FR:** 251477 **CAAE:** 0024.0.180.000-09

**Projeto de Pesquisa:** "Leveduras isoladas de pacientes com candidíase vulvovaginal em Juiz de Fora, MG: estudo sobre etiologia, recorrência, susceptibilidade a antifúngicos e relações fenéticas".

**Pesquisador Responsável:** Márcio Tavares Rodrigues

**Pesquisadores Participantes:** Cláudio Galuppo Diniz, Juliana Barroso Zimmermann e Didier Silveria Castelhandro Filho

**Instituição:** Universidade Federal de Juiz de Fora / Instituto de Ciências Biológicas / Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia

Sumário/comentários do protocolo:

- O estudo encontra-se bem justificado, com revisão da literatura pertinente. Trata-se de uma pesquisa que pretende analisar a ocorrência de candidíase vulvovaginal (CVV) e candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) na região, pretendendo, assim, levantar discussões acerca do tratamento empírico utilizado atualmente, considerando-se as limitações na disponibilidade de diagnóstico ou mesmo de terapia antimicrobiana. Os pesquisadores descrevem detalhadamente sobre as patologias, seus tratamentos e suas casuísticas. O objetivo geral do trabalho é "ampliar os conhecimentos sobre CVV e CVVR, através de estudo de detecção das espécies de *Candida* circulantes nas pacientes da região, seu perfil de susceptibilidade aos antifúngicos e sua relação clonal. Os objetivos específicos são: Isolar e identificar amostras de *Candida* de espécime clínico colhido de pacientes com diagnóstico clínico de CVV e/ou CVVR, atendidas em serviços de saúde na cidade de Juiz de Fora (MG); Verificar a distribuição de espécies de *Candida* isoladas e identificadas na população amostrada; Determinar o perfil de susceptibilidade das amostras de leveduras isoladas e identificadas frente a antifúngicos de interesse clínico-microbiológico como azólicos e poliênicos; Genotipar as amostras de *Candida* isoladas e identificadas para avaliação de similaridade clonal entre as linhagens geneticamente caracterizadas; Identificar possíveis relações fenéticas entre as linhagens isoladas de diferentes pacientes e entre aquelas que apresentarem episódios de recorrência; Estabelecer possíveis correlações fisiológicas e moleculares entre as linhagens isoladas e seu padrão de susceptibilidade a antifúngicos para possível detecção de marcadores epidemiológicos.

- Metodologicamente, farão parte do grupo amostral pacientes do sexo feminino com diagnóstico clínico de CVV atendida nos serviços parceiros (PAM Marechal, Maternidade Therezinha de Jesus, consultórios particulares dos médicos Dr. Didier Silveira Castelhandro Filho e Dra. Juliana Barroso Zimmermann), entre Julho de 2009 e Maio de 2010. Estima-se que este grupo amostral será de 120 mulheres. Todos os parceiros encaminharão um ofício de concordância de participação no estudo. As pacientes serão divididas em dois grupos: aquelas sem episódio de recorrência (grupo CVV) e aquelas que apresentarem mais de três episódios de CVV no período estudado (grupo CVVR). Serão critérios de inclusão: pacientes com diagnóstico clínico de CVV, que não fizeram uso de drogas antifúngicas sistêmicas nos últimos 30 dias e que aceitarem participar do estudo mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Serão considerados critérios de exclusão: pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de vaginose bacterianas ou por protozoários, além daquelas que não consentirem em participar do estudo. As pacientes deverão também responder a um questionário para caracterização do perfil epidemiológico da população estudada. Os pesquisadores descrevem com detalhes os procedimentos para coleta do espécime clínico, do exame microscópico direto, da cultura e identificação, do teste de susceptibilidade às drogas antifúngicas, da genotipagem e dos testes estatísticos.

- O TCLE foi corretamente redigido, de acordo com as definições da Res. CNS 196/96

- A pesquisa possui um orçamento de R\$ 8.300,00, detalhadamente descrito de acordo com as necessidades do trabalho. Há uma declaração do chefe do departamento de Parasitologia, Microbiologia e imunologia do ICB/UFJF atestando possuir a infra-estrutura necessária ao projeto e disponibilizando o material necessário para a realização do mesmo.

Prof.ª Dr.ª Edalberto A. Vargas Dias  
Coordenadora do CEP/UFJF



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PRO-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF  
36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

- O cronograma está descrito em trimestres, de acordo com o calendário do doutorado do pesquisador, com início da pesquisa em Abril de 2009, procedimentos de coleta dos dados com início em Julho de 2009 e término da pesquisa em Março de 2012. Os pesquisadores enfatizam no protocolo que a coleta dos dados só terá início após aprovação do mesmo no Comitê de Ética.

- O pesquisador principal é médico, mestre em microbiologia. Um dos participantes é biólogo, doutor em ciências biológicas (microbiologia). Duas pesquisadoras participantes são acadêmicas do curso de Farmácia da UFJF. Outros dois participantes são médicos, ginecologistas, um com mestrado em saúde brasileira e a outra doutora em medicina (ginecologia e obstetrícia).

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela **aprovação** do protocolo de pesquisa proposto.

**Situação:** Projeto Aprovado  
Juiz de Fora, 16 de Abril de 2009

Profa. Dra. Iêda Maria Vargas Dias  
Coordenadora CEP/UFJF

RECEBI

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2009

ASS: \_\_\_\_\_