

Keith Cássia da Cunha

**Caracterização genotípica e fenotípica de *Candida*
sp de fluido vaginal de mulheres adultas**

São José do Rio Preto

2010

Keith Cássia da Cunha

Caracterização genotípica e fenotípica de *Candida sp*
de fluido vaginal de mulheres adultas

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
– Eixo Temático: Medicina e Ciências
Correlatas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Margarete T. Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto

2010

Cunha, Keith Cássia da
Caracterização genotípica e fenotípica de *Candida sp* de fluido vaginal
de mulheres adultas/ Keith Cássia da Cunha
São José do Rio Preto, 2010
69p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio
Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof^a Dr^a Margarete Teresa Gottardo de Almeida

1. *Candida sp*; 2. RAPD-PCR; 3. Candidíase Vulvovaginal

Keith Cássia da Cunha

Caracterização genotípica e fenotípica de *Candida sp*
de fluido vaginal de mulheres adultas

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof^ª Dr^ª Margarete Teresa Gottardo de Almeida

2º Examinador: Prof^ª Dr^ª Ana Marisa Fusco Almeida

3º Examinador: Prof^ª Dr^ª Lúcia Buchalla Bagarelli

Suplentes: Prof^ª Dr^ª Mara Corrêa Lelles Nogueira

Prof^ª Dr^ª Eleni Gomes

São José do Rio Preto, 16/04/2010.

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas	vi
Lista de abreviaturas e símbolos	vii
Resumo	x
Abstract	xi
Introdução	1
Objetivos	5
Artigos Científicos	7
Artigo 1	8
Artigo 2	13
Conclusões	56
Referências	58
Anexos	67

Dedicatória

Aos meus pais, Gisleine e Francisco

Pelos exemplos de vida, por me incentivarem na realização dos meus objetivos, mesmo em meio às dificuldades. Pela compreensão frente aos meus momentos de ansiedade e dificuldade.

A minha avó Genoveva

Por suas orações, que com certeza me fortaleceram para continuar esse caminho.

Aos meus irmãos Juliana e Lucas

Pelo incentivo, exemplo de determinação, amizade; Mesmo distantes vocês são essenciais em minha vida.

Aos meus sobrinhos Gabriel e Maria Eduarda

Mesmo que vocês ainda não compreendam o significado desse trabalho, tenho certeza que vocês sempre torcerão pela titia.

A todos vocês, muito obrigada pela alegria que trazem em minha vida, pelo apoio, amor e compreensão.

Agradecimentos

À Deus, pelo dom da vida e por sempre iluminar meu caminhos.

À minha querida orientadora, Prof^ª Dr^ª Margarete Teresa Gottardo de Almeida, por acreditar que eu seria capaz de desenvolver esse trabalho, pelo carinho, tolerância, incentivo, pelas horas dedicadas, por contribuir com meu crescimento profissional e principalmente pessoal.

Aos professores Luis Carlos de Mattos, Mara Correa Lelles Nogueira, Maurício Lacerda Nogueira, por suas contribuições didáticas, científicas e experimentais, na realização do projeto.

Aos integrantes dos Laboratórios de Microbiologia, Virologia e Imunologia pela compreensão e parceria, durante o trabalho realizado.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP e ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde pela excelência na qualidade do curso.

À Diretoria Geral da FAMERP, Dr^º Humberto Liedtke Júnior pelo investimento no programa de Pós Graduação.

Ao Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, representado pelo Prof^º Dr^º Antônio Hélio Olliane que disponibilizou o serviço.

Aos médicos do Instituto de Medicina Reprodutiva e Fetal, muito obrigada pela colaboração junto a nossa pesquisa.

Às Dras. Lucia Buchalla Bagarelli, Alessandra de Souza B. Munhoz, e Juliana Pessini, pela atenção e parceria junto à execução do projeto.

À Juliana R. Cintra por ter sido uma ótima parceira de trabalho, por dividir comigo horas do seu final de semana que dedicamos a coleta, pelas conversas agradáveis, pelos conselhos, pelo apoio.

A Luciana e Valéria por terem me ensinado com tanta dedicação, por terem me recebido sempre muito bem.

Aos colegas de trabalho João Paulo, Gislaine e Natália, pelo apoio nas coletas, pelos “plantões” no laboratório, pela paciência, conversas tornando o trabalho mais agradável.

A Gisela e Jorge Unifesp, pela colaboração na construção dos dendogramas, por terem me recebido muito bem, deixando muitas vezes seus compromissos para me ajudar.

Aos funcionários Marquinhos, Fabiano e Pablo (STI), por me ajudarem com os inúmeros problemas técnicos da informática.

A Araceli Chacon Sobrinha, pela companhia e contribuição na parte final desse trabalho.

A Bianca, Christian e Gilson, por receberem tão bem, mesmo em dias e horários inoportunos.

Às pacientes, pela compreensão e colaboração com o projeto, pois sem vocês o trabalho não existiria.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas.

Figura 1. Distribuição da frequência das espécies de leveduras no conteúdo vaginal das mulheres adultas, sintomáticas e assintomáticas.....10

Artigo 2. Molecular and phenotypic characterization of *Candida sp* strains from vaginal fluid adults women.

Figure 1. Electrophoresis of the DNA band of three genotypes of *C.albicans*: genotype A (133 pb), B (512 pb) and C (133 and 512 pb).....48

Figura 2. Dendrogram for all 107 isolates of *C. albicans* patients, generated from RAPD obtained with primer B-14.....49

Figure 3. Electrophoretic separation of RAPD-PCR products obtained with primer B-14 of *C.albicans* molecular size markers 1Kb DNA. Hallmark monomorphic band.....50

Figure 4. Dendrogram for all 7 isolates of *C. glabrata* patients with symptoms or asymptomatic, generated from RAPD obtained with primer OPE-18.....51

LISTA DE TABELAS

Artigo 2. Molecular and phenotypic characterization of *Candida sp* strains from vaginal fluid adults women.

Table 1. Values of interpretative breakpoint for antifungal drugs. MIC ($\mu\text{g/mL}$).....52

Table 2. Virulence factors of *C. albicans* and *C. glabrata*.....53

Table 3 . Number of samples by combined analysis of high similarity among clusters by RAPD and virulence factors of *C. albicans* strains.....54

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ATCC – American Type Culture Collection

°C – Graus Celsius

C. – *Candida*

CFU – Unidades formadoras de colônias

CLSI - The Clinical and Laboratory Standards Institute

CVV – Candidíase vulvovaginal

CVVR – Candidíase vulvovaginal recorrente

DDS - Susceptibilidade dose-dependência

DIU – Dispositivo intra-uterino

DNA – Ácido desoxiribonucleico

dNTP – Desoxinucleosídeo

EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

µg/mL - Micrograma por mililitro

HIV - Human Immunodeficiency Virus

IUDs – Intrauterine devices

µL- Microlitro

LH - hormônio luteinizante

MIC – Minimum inhibitory concentration

mL - Mililitro

mM - Milimolar

ng - Nanograma

® - Marca registrada

Pb – Pares de base

PCR – Reação da polimerase em cadeia

PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

pmol - Picomol

R – Resistente

RAPD – Randomly Amplified Polymorphic DNA

RVVC – Recurrent Vulvovaginal Candidíasis

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

rDNA – Ácido desoxirribonucléico ribossomal

rRNA – Ácido ribonucléico ribossomal

S - Sensível

sp. – Espécie

TBE – TRIS – ácido bórico - EDTA

UPGMA – Unweighthed pair-group method using arithmetic average

V - Volts

VVC – Vulvovaginal Candidíasis

X - Vezes

% - Por cento

≥ Maior que ou igual a

≤ Menor que ou igual a

RESUMO

RESUMO

Introdução. *Candida albicans* é amplamente reconhecida como patógeno, ocorrendo frequentemente em candidíase vulvovaginal. **Objetivos.** Comparar os genótipos entre os isolados de infecção, colonização e isolados recorrentes com os determinantes de virulência (fosfolipase, proteinase, amilase, gelatinase, hemolisina, termotolerância e biofilme) e susceptibilidade antifúngica *in vitro*. **Material e Método.** 313 amostras de fluido vaginal foram coletadas de mulheres com ou sem indicações sintomáticas para candidíase vulvovaginal (CVV), como prurido vaginal, corrimento, ardência e dispareunia. A susceptibilidade antimicrobiana foi avaliada frente a quatro drogas (fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B), determinada pelo método de diluição (M27A2-CLSI). As leveduras foram submetidas ao PCR (polimerase chain reaction), RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*), e ao RFLP (*Restriction fragment length polymorphic*), este último, utilizada para a identificação de *Candida dubliniensis*. **Resultados.** Considerando-se a espécie prevalente, *C. albicans* mostrou taxas elevadas de sensibilidade significativas aos azólicos e, a grande maioria, produziu vários fatores de virulência, independente de sua origem, infecção ou colonização. A análise estatística permitiu a identificação de 17 *clusters* com identidade genética idêntica, e outros moderadamente relacionados, ou independentes. **Conclusão.** Não houve correlação entre os padrões genéticos com a virulência e susceptibilidade antimicrobiana, sugerindo que as regiões genéticas amplificadas estão relacionadas a outros eventos biológicos; a inclusão de outros *primers* poderá permitir uma associação maior entre os isolados de *C. albicans*.

ABSTRACT

Introduction: *Candida albicans* is widely recognized as the pathogen often occurring in vulvovaginal candidiasis. **Objective:** To compare the genotypes, among infection or colonization and recurrent isolates, with virulence determinants (phospholipase, proteinase, amylase, gelatinase, haemolysin, thermotolerance and biofilm), and to *in vitro* antifungal susceptibilities. **Methods:** 317 samples of vaginal fluid of were collected from women with or without symptomatic indications to VVC, including vaginal itching, abnormal discharge, soreness and dyspareunia to mycological investigation. The antimicrobial susceptibility was evaluated for 4 drugs (fluconazole, Itraconazole, ketoconazole and amphotericin B, by dilution method (M27A2- CLSI). Yeasts were subjected PCR (polimerase chain reaction), RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*), and to RFLP (*Restriction fragment lenght polymorphic*), this last one, used for identification of *Candida dubliniensis*. **Results:** Considering the prevalent species, *C. albicans* showed high rates of significant sensitivity to azoles and the vast majority of produced virulence factors, regardless of their origin, infection or colonization. Statistical analysis enabled identification of 17 clusters with identical genetic identity, and other moderately related, or unrelated. **Conclusions:** There was no correlation between the genetic patterns with virulence and antimicrobial susceptibility for all isolates, suggesting that, the amplified genetic regions do not match with variables and might be related to other biological events. The inclusion of other *primers* could allow higher association among *C. albicans* strains.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Candidíase Vulvovaginal (CVV) é um processo infeccioso e/ou inflamatório da vulva e vagina, causado por leveduras que habitam a mucosa vaginal. ⁽¹⁻⁴⁾ É um dos diagnósticos mais freqüentes na prática diária de ginecologistas, ^(5 - 8) sua incidência tem aumentado de 25% na população feminina em geral, a 42% entre as adolescentes, tornando-se a segunda maior infecção genital nos Estados Unidos e no Brasil. ^(6,7,9) De modo geral, estima-se que 75% das mulheres adultas apresentem pelos menos um episódio de CVV durante sua vida; destas, 40 a 50% vivenciarão mais de uma ocorrência e 5% atingirão o caráter recorrente (CVVR), este último, especialmente comum nas mulheres mais velhas. ^(10, 11, 12) Caracteristicamente, o agente etiológico dominante nessas pacientes é *C. glabrata*, cujo perfil de suscetibilidade às drogas imidazólicas, é menor. ⁽¹³⁾

Além da via sexual, a transmissão endógena é considerada a mais comum forma de aquisição da levedura, especialmente a partir do trato gastro-intestinal, de onde é veiculada para vagina por auto-inoculação, local no qual se adapta e se desenvolve. ^(3,14,15)

Considerando-se mulheres adultas com CVV, apesar dos sintomas não serem patognomônicos, as principais queixas clínicas são: prurido, corrimento e hiperemia vaginal e vulvar, ardor, dispaurenia, disúria, fissura e edema. ^(3,16,17)

A CVV é causada por fungos leveduriformes, tendo como principal etiologia *C. albicans*, em 80 a 90% dos casos ⁽¹³⁾. No entanto, em 10 a 20%, outras espécies estão envolvidas, conhecidas como não-albicans (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis*). Dados recentes destacam

C. glabrata como a segunda espécie em frequência nas CVV, ^(6,18) e mais raramente, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula sp* e *Trichosporon sp.* ⁽¹⁹⁻²¹⁾. No entanto, estes mesmos microrganismos, são detectados em cerca de 30% das mulheres adultas saudáveis e sem sintomas de CVV. ^(3,7,19)

A relação parasita/hospedeiro depende do balanço entre a virulência do microrganismo e as defesas do hospedeiro. ⁽²²⁾ Do ponto de vista do hospedeiro, a prévia colonização por levedura e a posterior queda da resposta imunológica, observadas em situações de imunossupressão, tais como em diabetes mellitus, gestantes, transplantados etc, são fatores considerados predisponentes. Somam-se a isso, a adoção de dieta rica em carboidratos, o uso de roupas sintéticas, certas práticas sexuais (oral e anal), dispositivos intrauterinos e o uso de contraceptivos hormonais ^(10, 22, 23). Para esse último dado, a disponibilidade de glicogênio no ambiente vaginal, devido aos altos níveis de hormônios femininos, especialmente progesterona, serve como excelente fonte de carbono para o crescimento e a germinação das leveduras. ⁽¹⁶⁾ Já, do ponto de vista da microbiota vaginal, os lactobacilos presentes na mucosa vaginal atuam como uma barreira defensiva à CVV, uma vez que competem pelos nutrientes, realizam um processo de co-agregação, inibem a adesão dos fungos ao epitélio vaginal e até, produzem substâncias inibidoras da multiplicação do fungo. ⁽¹³⁾ De outro modo, as leveduras produzem toxinas e enzimas hidrolíticas extracelulares (hemolisina, proteases e fosfolipases), e demais atuantes na conversão de levedura em pseudohifa, na aderência a substratos inertes e biológicos, e na formação de biofilme. ^(24 - 30)

Considera-se *C. albicans* como um modelo fúngico para virulência ⁽²⁴⁻³⁰⁾. Diante de sua capacidade em formar biofilme, as células fúngicas primeiro aderem a superfícies por intermédio de fatores específicos (fibronectina e fibrinogênio) e não (hidrofobicidade e forças eletrostáticas da superfície da célula). ^(31,32) No biofilme, os organismos encontram-se envolvidos em uma densa matriz de polissacarídeos, que pode interferir sobre os mecanismos de proteção contra as agressões geradas pelo meio, disponibilidade de nutrientes, cooperação metabólica e aquisição de novos traços genéticos. ⁽³³⁾ Num episódio de CVV, a avaliação da capacidade de formação de biofilme é importante devido à possibilidade de sua ocorrência em dispositivos intra-uterinos (DIU) e em anéis vaginais contraceptivos. ^(34, 35)

A aquisição de ferro pelos microrganismos patogênicos é uma das atividades metabólicas de maior importância para a sua sobrevivência, o que traz, muitas vezes, prejuízos para o hospedeiro. Nesse sentido, diversos microrganismos, especialmente *C. albicans*, ⁽³⁶⁻³⁸⁾ produzem hemolisinas, para tal finalidade. ⁽³⁹⁻⁴¹⁾

A manutenção ou disseminação das infecções fúngicas, está condicionada a capacidade dos fungos em sobreviver sob diferentes temperaturas que o corpo humano apresenta. ⁽⁴²⁾ No entanto, mediante temperaturas extremas (39 a 42° C), raros grupos de fungos conseguem multiplicar, daí serem considerados termo-tolerantes e, portanto, mais virulentos. ⁽⁴³⁾

O tratamento das vaginites vem sendo realizado de modo empírico, já que o diagnóstico laboratorial a partir de cultura de secreção vaginal e testes de avaliação de

sensibilidade antimicrobiana, raramente são solicitados pelos médicos. Considera-se tal situação como um grande problema, uma vez que tem havido mudanças, tanto na etiologia, quanto no perfil de resposta aos antifúngicos. ^(44, 45) Nesse sentido, a frequente exposição aos fármacos, particularmente azólicos, tem levado à seleção de espécies cada vez mais resistentes, especialmente *C. krusei* e *C. glabrata*. ⁽⁴⁶⁾ Se, a proposta terapêutica atual vem se desenvolvendo frente aos derivados imidazólicos e triazólicos, preferencialmente, fluconazol, miconazol, clotrimazol, itraconazol e cetoconazol, e diante da diversidade de respostas de sensibilidade encontradas, os estudos de caracterização fenotípica devem ser cada vez mais sistematizados. Os parâmetros de respostas são variados apresentando percentuais de sensibilidade entre 10% até 100%. ⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾ Assim, condutas terapêuticas que utilizem fármacos do grupo dos poliênicos, particularmente a nistatina e anfotericina B, vêm sendo adotadas como recursos alternativos. ⁽⁵⁰⁾

A relação existente entre grupos taxonômicos frente à variáveis, tais como: a resistência a antimicrobianos, a virulência, a detecção de surtos, e até ao conhecimento das relações evolutivas entre espécies fúngicas vem sendo estudada por métodos moleculares: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), a cariotipagem por PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE*), RFLP (restriction fragment length polymorphism), microsátélites, hibridização, entre outras. ⁽⁵¹⁻⁵⁴⁾

A presente proposta caracteriza-se como primeiro estudo de investigação de espécies do gênero *Candida* em mucosa vaginal de pacientes de São José do Rio Preto e região. Além disso, até o presente, há poucos estudos de investigação e correlação

genotípica e fenotípica entre tais isolados de *Candida sp*, tema que certamente contribuirá para prevenção, controle e tratamento candidíase vulvovaginal.

1.1 OBJETIVOS

1.1.a Objetivo Geral

Identificar e caracterizar correlacionar *Candida sp*. em fluido vaginal de mulheres adultas, por métodos fenotípicos e genotípicos.

1.1.b. Objetivos Específicos

Determinar os indicadores clínicos relacionados com CVV.

Investigar a produção de fatores de virulência: proteinase, fosfolipase, hemolisina, amilase, gelatinase, termotolerância e biofilme.

Avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Candida sp* por microdiluição e difusão em disco.

Comparar: (i) genótipos das espécies de *Candida* a partir de infecção, recorrência e colonização; (ii) genótipos com a produção de fatores de virulência; (iii) genótipos com suscetibilidade antifúngica *in vitro*.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

RESULTADOS

Os resultados encontram-se descritos em dois artigos, o primeiro deles já publicado e o segundo, a ser submetido à publicação em revistas indexadas.

Artigos

1. Corrêa PR, David PR, Peres NP, da Cunha KC, de Almeida MTG. **Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas.** Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 2009 Apr; 31(4): 177-181.

2 . Keith Cássia da Cunha, Juliana Rodrigues Cintra, Natália Seron Brizzotti, Jorge Meneses Nunes, Lúcia Buchalla Bagarelli, Analy Salles de Azevedo Mello, Mara Correa Lelles Nogueira, Denise Cristina Mos Vaz, Luiz Carlos de Mattos, Luiz Zaror Cornejo, Margarete Teresa Gottardo de Almeida. **Molecular and phenotypic characterization of *Candida sp* strains from vaginal fluid of adults women.** Formatado segundo as normas de publicação do periódico “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz”, a ser submetido após a defesa pública desta dissertação.

PALLA DOS REIS CORREIA¹
 PAULO RODRIGO DOS SANTOS DAVID²
 NATHÁLIA PERPETUA PERES³
 KEITH CÁSSIA DA CUNHA⁴
 MARGARETE TERESA GOTTARDO DE ALMEIDA⁵

Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas

Phenotypic characterization of yeasts isolated from the vaginal mucosa of adult women

Artigo original

Palavras-chave

Candidíase vulvovaginal/epidemiologia
 Fatores de risco
 Fatores de virulência
 Vulvovaginite
 Sinais e sintomas

Keywords

Candidiasis, vulvovaginal/epidemiology
 Risk factors
 Virulence factors
 Vulvovaginitis
 Signs and symptoms

Resumo

OBJETIVO: caracterizar fenotipicamente leveduras isoladas do conteúdo vaginal de 223 mulheres adultas, sintomáticas (S) e assintomáticas (A) para vulvovaginite, e determinar os indicadores clínicos que possivelmente levam ao surgimento de sinais e sintomas relacionados ao acometimento da mucosa por essa patologia. **MÉTODOS:** Inicialmente foi aplicado um questionário, com questões abertas e fechadas, sobre dados clínicos epidemiológicos. Logo, ocorreu o diagnóstico micológico com semeadura em meio Chrom Agar *Candida*, identificação micromorfológica e bioquímica. Métodos específicos para detecção de fatores de virulência, proteinase e fosfolipase foram empregados. A análise estatística das variáveis foi estabelecida utilizando os testes χ^2 e χ^2 de Pearson. **RESULTADOS:** *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente (87%, S e 67%, A), seguida de *Candida glabrata* (4%, S e 17%, A). O número de mulheres que referiram adoção de anticoncepcionais foi mais alto entre as sintomáticas, 77%. Nos dois grupos estudados, em torno de 87% apresentaram ciclos menstruais regulares, 57% das mulheres eram casadas com idade entre 30 a 40 anos. Em relação a práticas sexuais, houve para parte das pacientes, concomitância entre as hábitos, anal, oral e vaginal. Em relação à fosfolipase, apenas *Candida albicans* produziu este fator de virulência em 37,5%. A proteinase foi detectada em *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*. Esse último fator de virulência esteve associado, principalmente, a isolados de pacientes sintomáticas. **CONCLUSÕES:** a colonização e infecção da mucosa vaginal por levedura é real com diversas espécies de *Candida* presentes. No entanto, *Candida albicans* se destaca como espécie prevalente em mucosa vaginal de mulheres adultas. Fica evidente a emergência de espécies de *Candida* não *albicans*, algumas com resistência intrínseca aos azólicos, tais como *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, e *Candida guilliermondii*, o que pode ser explicado pelo uso inadequado de medicamentos e tratamento empírico.

Abstract

PURPOSE: to characterize, phenotypically, yeasts isolated from the vaginal content of 223 symptomatic (S) and asymptomatic (A) adult women with vulvovaginitis, and to determine the clinical indicators which may lead to the appearance of signs and symptoms related to the mucosa involvement by this pathology. **METHODS:** a questionnaire with open and closed questions on epidemiological clinical data was applied initially. Then, mycological diagnosis with sowing in Chrom Agar *Candida* was done, followed by micro-morphological and biochemical identification. Specific methods for the detection of the virulence factors, proteinase and phospholipase were employed. Statistical analysis was performed through χ^2 and Pearson's χ^2 tests. **RESULTS:** the most prevalent species found was *Candida albicans* (87%, S and 67%, A) followed by *Candida glabrata* (4%, S e 17% A). The number of women reporting the use of contraceptives was higher among the symptomatic, 77%. In the two groups studied, about 87% of the women presented regular menstrual cycles and 57% were married with ages between 30 to 40 years old. Concerning the sexual practices, there has been concomitance among anal, oral and vaginal habits from the patients. Only *Candida albicans* produced the virulence factor phospholipase in 37.5% of them. Proteinase has been detected in *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*. This latter virulence factor was mainly associated to isolates from symptomatic patients. **CONCLUSIONS:** it is a fact that the vaginal mucosa can be colonized and infected by yeasts, with several *Candida* species present. Nevertheless, *Candida albicans* is the most prevalent in the vaginal mucosa of adult women. It is evident the emergence of non-*albicans* *Candida* species, some of them with intrinsic resistance to azolics, such as *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, and *Candida guilliermondii*, which can be explained by the inadequate use of medicines and empirical treatment.

Correspondência:

Paulo dos Reis Correia
 Rua Padre Américo Capri, 680 – Brasil
 CEP 38420-472 – Uberlândia, MG, Brasil
 E-mail: pauldosreis@uefpa.com.br

Recebido

26/1/09

Aceito em modificação

18/4/09

Serviço de Ginecologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto – São José do Rio Preto (SP), Brasil.

¹ Pós-graduada (Mestrado) em Microbiologia pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP – São José do Rio Preto (SP), Brasil.

² Médico da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMED – São José do Rio Preto (SP), Brasil.

³ Enfermeira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMED – São José do Rio Preto (SP), Brasil.

⁴ Bióloga da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMED – São José do Rio Preto (SP), Brasil.

⁵ Professora Doutora de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMED – São José do Rio Preto (SP), Brasil.

Introdução

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção da mucosa genital¹, causada por fungos leveduriformes². Esses micro-organismos são considerados oportunistas porque em condições propícias, como presença de fatores pré-disponíveis locais ou sistêmicos, podem proliferar e desencadear processos infecciosos³.

A flora vaginal autóctone é complexa e sua composição varia de acordo com uma multiplicidade de acontecimentos, como fatores hormonais; número de parceiros; uso de contraceptivos orais; uso de antibioticoterapia; diabetes; uso de preservativos; tabagismo e maus hábitos em matéria de higiene. Todos estes são considerados como fatores de risco para o surgimento de infecções genitais⁴.

As cepas do gênero *Candida* podem ser encontradas como habitantes normais dessas mucosas: estando presente em 20 a 80% da população adulta saudável⁵. Entretanto, são detectados em 10% das mulheres na pré-menopausa, 5 a 10% das menopausadas e em 30% das gestantes⁶. Durante o período entre a menarca e a menopausa, aproximadamente 75% das mulheres sofrem ao menos um episódio de CVV. Dessas, 40% tiveram mais de um episódio e 5% apresentam episódios de repetição com quatro ou mais eventos anuais, daí a designação de CVV recorrente⁷. As manifestações clínicas mais comuns nesse tipo de infecção são disúria, hiperemia, ardência, corrimento, prurido, dispareunia e fissuras⁸.

Estudos sobre a prevalência de CVV com diagnóstico pós-cultura indicam que, embora a espécie mais frequente seja *Candida albicans*, com 80% de ocorrência, a frequência de outras espécies "não *albicans*", está aumentando⁹, e nesse grupo, foram encontradas principalmente *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*¹⁰. Tal fato é preocupante, pois em geral as duas últimas são mais resistentes aos antifúngicos clássicos utilizados na prática clínica¹.

Apesar da alta prevalência de mulheres adultas com queixa clínica sugestiva de CVV, até o momento, não existem estudos sistemáticos sobre sua etiologia na região do Noroeste paulista. Estudos que abordem a origem, bem como fatores de riscos associados à vulvovaginite, contribuirão para adoção de estratégias de medida de controle dessa nosologia. Assim, a presente proposta teve como objetivo geral investigar os agentes fúngicos presentes na mucosa vaginal de mulheres adultas de São José do Rio Preto, região Sudeste do Brasil.

Métodos

Foi realizado um estudo transversal de caráter exploratório, com abordagem quantitativa, durante o período de Março de 2007 a Agosto de 2008. Após aprovação

pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, e assinatura do termo de consentimento pelas pacientes, o trabalho teve seu início. Inicialmente, os dados foram obtidos por meio de entrevista, a qual incluiu questões abertas e fechadas sobre dados clínicos epidemiológicos e outras pertinentes a variáveis envolvidas: idade, escolaridade, práticas sexuais, método anticoncepcional adotado e uso prévio de antibióticos, além da análise de fatores predisponentes para CVV, seguido da investigação micológica. Para tal, participaram do estudo 223 mulheres adultas, sendo caracterizadas como assintomáticas (101) e sintomáticas (122) para CVV. A amostragem não foi populacional e, sim, proveniente de ambulatório de ginecologia, isto é, por demanda espontânea.

A coleta das amostras e a avaliação clínica foram estabelecidas por médicos do Serviço de Ginecologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto. Parte do conteúdo do fluido vaginal das 223 mulheres foi utilizado para o exame direto e outra, para cultura em Ágar Sabouraud Dextrose (Himedia, Mumbai, Índia) com e sem 100 mg/mL de cloranfenicol (Difco, Lawrence, EUA). Seguiu-se a incubação a 30 °C por até 15 dias, sendo que as culturas que não apresentaram crescimento, após esse período, foram consideradas negativas.

Inicialmente, a identificação ocorreu segundo características morfológicas e bioquímicas em Chrom Ágar *Candida*® (Paris, França), este teste fornece dados presuntivos de identificação, a partir da diferenciação de coloração e morfologia das colônias por espécies. A confirmação das espécies foi estabelecida por auxanograma¹¹, uma prova de assimilação de açúcares, realizada em meio mínimo de carbono e nitrogênio. No momento da leitura segue-se a uma chave de identificação, observando na placa os açúcares assimilados até chegar à espécie. O microcultivo em ágar fubá (Oxoid, Basingstok, UK) acrescido de twen 80 (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e a prova do tubo germinativo, foram realizados como testes conclusivos para identificação de *Candida albicans*, já que essa é a única espécie que apresenta resultado positivo nos dois testes.

Todas as leveduras foram avaliadas quanto à produção de fatores de virulência, a saber, fosfolipase e proteínase, segundo protocolos descritos^{12,13}. Estes testes foram realizados em duplicata e armazenados em estufa úmida a 35 °C, por até cinco dias, as leituras foram realizadas observando a presença de halos ao redor das colônias, indicativos para produção de tipos enzimáticos.

Todas as variáveis foram analisadas pelo teste de associação do tipo χ^2 com intervalo de confiança de 95%. Para associação entre produção de fatores de virulência e dado clínico (sintomática ou assintomática), aplicou-se o teste do χ^2 de Pearson.

Resultados

Caracterização micológica

Das 223 participantes do estudo, 87 mulheres apresentaram cultura positiva para leveduras, sendo 69 (55%) isolados provenientes do Grupo Sintomático (n=122), e 18 (18%) do Assintomático (n=101). A distribuição das espécies fúngicas e o correspondente percentual de ocorrência estão apresentados na Figura 1.

A análise individual dos grupos possibilitou a detecção de diferenças quanto aos critérios clínicos e epidemiológicos. Assim, no Grupo Sintomático a média de idade foi de 30,6 anos; 57% eram casadas, 36% separadas e 7% solteiras. Quanto ao método anticoncepcional, foi observado que 77% referiram adoção, sendo 46,5% usuárias de anticoncepcional hormonal oral, isolado ou combinado com outro método. A recorrência foi observada em 84,2% dos casos, sendo que desses 69% tiveram até cinco episódios e 3% mais do que cinco. Considerando o ciclo menstrual, 88% menstruavam de forma regular. Em relação à atividade sexual, a prática vaginal e a oral foram as mais frequentes. As demais modalidades, oral, anal e ou concomitância entre duas ou mais, ocorreram em menor percentual. Diversos sinais e sintomas concorreram para manifestação clínica de CVV, com destaque para a disúria (91,3%) e hiperemia vaginal (89,6%) como as mais frequentes.

Para o Grupo Assintomático, a média de idade foi de 37,1 anos; 56% eram casadas, 32% solteiras e

12% separadas. A adoção de métodos anticoncepcionais esteve presente em 44% das participantes, sendo o tipo hormonal oral isolado ou associado com outros métodos observado em 28,7%. Os resultados relativos a episódios anteriores de CVV foram detectados em 42% das pacientes, com 71% para até cinco episódios e 29% para mais do que essa quantidade. Quanto ao ciclo menstrual, 72% menstruavam, sendo 87% de modo regular. A avaliação da atividade sexual mostrou que as práticas vaginal e oral foram preferenciais. Entretanto, outras práticas, oral, anal e ou concomitância entre duas ou mais, ocorreram em menor percentual. A detecção de espécies não *albicans* foi mais frequente no Grupo Assintomático, totalizando 33%.

Frente aos isolados clínicos de *Candida sp.*, estudou-se a produção de fator de virulência, proteinase e fosfolipase, comumente associados à patogenicidade. Assim, *C. albicans* foi a única espécie produtora da fosfolipase. Entretanto para a mesma espécie, a produção concomitante deste fator e a proteinase foram observadas em 33,3% (n=20). Nos isolados de *Candida albicans*, dentro do Grupo Sintomático, os resultados de produção de fator de virulência foram mais expressivos: proteinase ocorreu em 66,7% (n=40) e fosfolipase em 37,5% (n=23). Já para *Candida glabrata*, a síntese de proteinase ocorreu apenas nos isolados provenientes do Grupo Assintomático, correspondendo a 16,7% (n=1).

As cepas de *Candida tropicalis* demonstraram ocorrência de 100% (n=2) de produção do fator proteinase. Já a mesma enzima nos isolados de *Candida parapsilosis* ocorreu

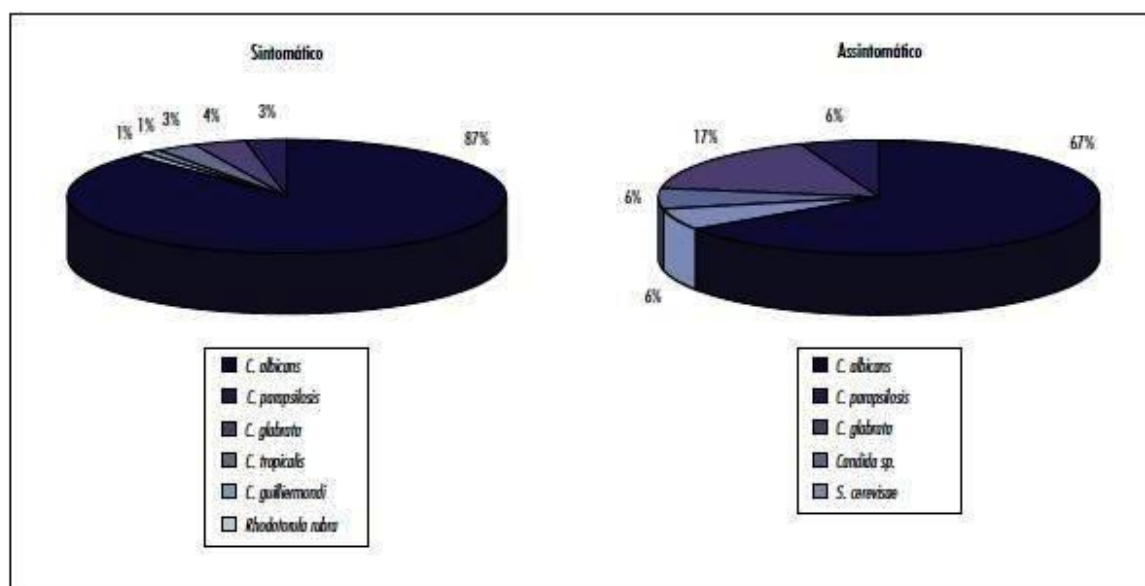


Figura 1 - Distribuição da frequência das espécies de leveduras no conteúdo vaginal das mulheres adultas, sintomáticas e assintomáticas.

em três casos, sendo originários do Grupo Sintomático (n=1) e Grupo Assintomático (n=2).

Para as espécies *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida spp.* e *Candida guilliermondii*, independentemente do grupo, não foi detectado nenhum dos fatores.

De acordo com o teste χ^2 de Pearson, não houve evidência de associação entre a condição clínica, sintomática ou não, com produção de fosfolipase ($p=0,1$). Porém, houve frente à proteinase ($p=0,02$), uma vez que as cepas isoladas das mulheres sintomáticas foram produtoras desse fator de virulência em 59,8% dos casos.

Discussão

Infecções por *Candida sp* em superfícies mucosas são comuns, debilitantes e frequentemente recorrentes. Aproximadamente três quartos de mulheres saudáveis em idade fértil sofrem de CVV com significativa morbidade física e psicológica¹⁴. Na presente análise, foi possível identificar *Candida sp* em 31% de mulheres sintomáticas e em 8% de mulheres assintomáticas.

Cerca de 80% de todas as leveduras identificadas na mucosa vaginal são *Candida albicans*¹⁵. De fato, *Candida albicans* esteve amplamente distribuída na população estudada, ora como comensal (67%) ou como patógena (87%). Uma provável justificativa para o alto índice de *Candida albicans*, presente na mucosa de mulheres assintomáticas, seria a presença desta espécie no trato gastrointestinal ou na via sexual, na qual a partir dessa fonte endógena, disseminaria¹⁶.

Entretanto, recentemente, as espécies de *Candida* não *albicans* vêm mudando este panorama clínico, apresentando-se como patógeno, especialmente pela seleção de espécies mais resistentes¹⁷. A porcentagem de ocorrência por espécies não *albicans* foi expressiva, 13% ao Grupo Sintomático e 33% ao Assintomático. Outros estudos confirmam esta distribuição, foi observada a ocorrência destas espécies entre 9,9 a 32% dos casos de vulvovaginite, respectivamente. As espécies de não *albicans* encontradas aqui foram *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis*, dado concordante com outros estudos, que as identificam na última década, como espécies emergentes responsáveis por CVV^{1,18}. Chama-se a atenção que espécies não *albicans* vêm ocorrendo em mulheres adultas sem sintomatologia, descrito pela literatura em cerca de 44% dos casos¹⁹. Tendo em vista a presente investigação, os dados foram concordantes com o exposto acima.

O aumento da acidez vaginal é influenciado por diversos fatores, dentre estes, a adoção de anticoncepcionais hormonais orais, especialmente em estado hiperestrogênico. O uso de anticoncepcionais oral fornece condições nutritivas que favorecem o estabelecimento do fungo na mucosa vaginal²⁰.

No presente estudo, a maior parte das mulheres portadoras de leveduras fazia uso desse método contraceptivo.

As formas recorrentes são definidas com a repetição de quatro ou mais episódios sintomáticos ao ano, ou quando se tem três episódios não relacionados com antibioticoterapia prévia no último ano⁷. Nesse sentido, das mulheres acometidas com CVV, 10 a 40% tornam-se recorrentes²¹. No presente estudo, foram detectados índices maiores aliados aos dos Grupos Assintomático (42%) e Sintomático (84,2%). O significado de *Candida sp.*, presente na vagina de mulheres assintomáticas entre episódios de recorrência, não está claro. O achado desses organismos, durante períodos livres de sintomas, poderia indicar um tratamento prévio inadequado ao uso insuficiente de antifúngicos, ou mesmo à resistência dos fungos aos fármacos. Entre 10 a 33% dos casos de recorrência descritos na literatura^{22,23}, a etiologia é atribuída a espécies não *albicans*, como *Candida glabrata* (mais frequente), seguida de *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Saccharomyces cerevisiae*, dados equivalentes aos encontrados nesse estudo.

O ciclo menstrual é qualificado como regular quando da sua ocorrência entre 25 e 35 dias. Essa regularidade, considerando o intervalo de análise dos últimos seis meses, foi detectada em 88% das mulheres sintomáticas e 87% das assintomáticas. Embora não haja consenso no que tange aos fatores de risco para a CVV, a presença de ciclos menstruais regulares tem sido identificada como relevante, uma vez que a acidez, subsequente aos picos hormonais de FSH, LH, estradiol e progesterona determinantes da ovulação e formação do corpo lúteo, poderia contribuir para invasão recidival do fungo²⁴.

Diversos sinais e sintomas estão presentes na maioria das mulheres com CVV, com destaque para prurido, dispareunia e corrimento, com índices entre 82 a 94%^{9,14}, e modernamente associados à espécie *Candida albicans*²¹. Comparando os resultados aqui obtidos com os da literatura, as mesmas queixas clínicas foram observadas nas participantes do Grupo Sintomático, porém com índices menores: 41,7, 17,4 e 55,6%, respectivamente. Entretanto, disúria e hiperemia vaginal ocorreram em altos índices. Ainda, comparando as queixas entre os dois grupos analisados (Sintomático e Assintomático), foi observada uma diferença significativa apenas para disúria, hiperemia, dispareunia, hiperemia vulvar e fissura. De fato, corrimento e prurido podem estar associados a outros fatores, desde microbianos, imunológicos e fisiológicos¹⁶.

A concomitância entre práticas sexuais tem sido considerada como fator de risco para o estabelecimento da infecção fúngica, o que foi confirmado com os dados dessa investigação. Os resultados mostraram associação significativa entre sexo orogenital e infecção por *Candida*, dados suportados por estudo prévio²⁵. Uma explicação

para tal fato deve ser a transmissão por contato, além de que um terço da população adulta pode conter *Candida albicans* oral e, conseqüentemente, outras espécies²⁴.

Os atributos que contribuem para virulência de *Candida albicans* incluem adesão, formação de hifas e produção de enzimas hidrolíticas extracelulares^{25,26}. De fato, em relação às enzimas, *Candida albicans* produz fosfolipase e proteinase, e a detecção desses tipos enzimáticos comprova a alta patogenicidade dessa espécie, especialmente nas de origem do Grupo Sintomático.

Concluímos que a colonização e infecção da mucosa vaginal por levedura é real com diversas espécies de *Candida* presentes. No entanto, *Candida albicans* se destaca como espécie prevalente em mucosa vaginal de mulheres adultas. Fica evidente a emergência de espécies de *Candida* não *albicans*, algumas com resistência intrínseca aos azólicos, tais como *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*, o que pode ser explicado pelo uso inadequado de medicamentos e tratamento empírico.

Referências

- Ferrazza MSHS, Maluf MLF, Consolaro MEL, Shinobu CS, Svidzinski TIE, Batista MR. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27(2):58-3.
- Geva A, Bornstein J, Dan M, Shoham HK, Sobel JD. The VI-SENSE vaginal discharge self-test to facilitate management of vaginal symptoms. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(5):1351-6.
- Silva CRG, Melo KE, Leão MVP, Ruts R, Jorge AOC. Presença de *Candida* nas mucosas vaginal e bucal e sua relação com IgA salivar. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30(6):300-5.
- Campos AC, Freitas-Junior R, Ribeiro LF, Paulinelli RR, Reis C. Prevalence of vulvovaginitis and bacterial vaginosis in patients with koilocytosis. *Sao Paulo Med J*. 2008;126(6):333-6.
- Rosa MI, Rumel D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2004;26(1):65-7.
- Schaller M. [*Candida albicans* - interactions with the mucosa and the immune system]. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2006;4(4):328-36.
- Fidel PL Jr. History and update on host defense against vaginal candidiasis. *Am J Reprod Immunol*. 2006;57(1):2-12.
- Edwards I. The diagnosis and treatment of infectious vaginitis. *Dermatol Ther*. 2004;17(1):102-10.
- 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 antifungal agents. *Rev Argent Microbiol*. 2006;38(1):9-12.
- Zardo V, Mezzari A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. *News Lab*. 2004;63:136-6.
- Larone DH. Medically important fungi. A guide to identification. AMS Press: Washington; 1995.
- Price MF, Wilkison ID, Gentry IO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Saboraudia*. 1982;20:15-20.
- Ruchel R, De Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Coleg. GT. *Candida* acid proteinases. *J Med Vet Mycol*. 1992; 30 [Suppl 1]:123-132.
- Boatto HF, Moraes MS, Machado AP, Girão MJBC, 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. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29(2):80-4.
- Benavides JL, Rodríguez DS, Menchaca RT, Gonzalez G, Gonzalez EG, Tristan ER. Especies de *Candida* no albicans en la consulta de ginecología. *Med Universitaria*. 2007;9(37):161-5.
- Mendling W, Pinto De Andrade M, Gutschmidt J, Gantenberg R, Presber W, Schönian G. Strain specificity of yeasts isolated from different locations of women suffering from vaginal candidosis, and their partners. *Mycoses*. 2000;43(11-12):387-92.
- Nyirjesy P, Seeney SM, Grody MH, Jordan CA, Buckley HR. Chronic fungal vaginitis: the value of cultures. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173(3 Pt 1):820-3.
- Rylander E, Berglund AL, Krassny C, Petrini B. Vulvovaginal candida in a young sexually active population: prevalence and association with oro-genital sex and frequent pain at intercourse. *Sex Transm Infect*. 2004;80(1):54-7.
- Holanda AAR, Fernandes ACS, Bezerra CM, Ferreira MAF, Holanda MRR, Holanda JCP, et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29(1):3-9.
- Dan M, Kanelt N, Levin D, Poch F, Samra Z. Vaginitis in a gynecologic practice in Israel: causes and risk factors. *Isr Med Assoc J*. 2003;5(9):629-32.
- Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynaecol Obstet*. 2000;71 Suppl 1:S21-7.
- Spinillo A, Bernuzzi AM, Cevini C, Gulminetti R, Luzzi S, De Santolo A. The relationship of bacterial vaginosis, *Candida* and *Trichomonas* infection to symptomatic vaginitis in postmenopausal women attending a vaginitis clinic. *Maturitas*. 1997;27(3):253-60.
- Patel DA, Gillespie J, Sobel JD, Leaman D, Nyirjesy M, Weitz MV, et al. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;190(3):644-53.
- Reed BD, Gorenflo DW, Gillespie BW, Pierson CL, Zazove P. Sexual behaviors and other risk factors for *Candida* vulvovaginitis. *J Womens Health Gend Based Med*. 2000;9(6):645-55.
- Monod M, Borg-von ZM. Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. *Chem Immunol*. 2002;81:114-28.
- Ombrella AM, Racca I, Ramos L. Atividades proteínase y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. *Revista Iberoam Micol*. 2008;25(1):12-16.

**Molecular and phenotypic characterization of *Candida sp* strains from vaginal fluid
adults women**

Keith Cássia da Cunha, Juliana Rodrigues Cintra, Natália Seron Brizzotti, Jorge Meneses Nunes, Lúcia Buchalla Bagarelli, Anely Salles de Azevedo Mello, Mara Correa Lelles Nogueira, Denise Cristina Mos Vaz, Luiz Carlos de Mattos, Luiz Zaror Cornejo, Margarete Teresa Gottardo de Almeida.

Laboratório de Microbiologia, Departamento de Doenças Dermatológicas Infecciosas e Parasitárias - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – (FAMERP)

* Corresponding autor:

Prof^a Dr^a Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Laboratório de Microbiologia – FAMERP

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Preto

CEP: 15090-000 – São José do Rio Preto, São Paulo

FONE: (017) 32015741

margarete@famerp.br

ABSTRACT - *Candida albicans* is widely recognized as the pathogen often occurring in vulvovaginal candidiasis. The aim of this study was to compare the genotypes of all samples, with virulence determinants (phospholipase, proteinase, amylase, gelatinase, haemolysin, thermotolerance and biofilm), and to *in vitro* antifungal susceptibilities. Three hundred and thirteen samples of vaginal fluid of were collected from women with or without symptomatic indications to VVC, including vaginal itching, abnormal discharge, soreness and dyspareunia to mycological investigation. The antimicrobial susceptibility was evaluated for 4 drugs (fluconazole, Itraconazole, ketoconazole and amphotericin B, by dilution method (M27A2- CLSI). Yeasts were submitted PCR (polimerase chain reaction), RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*), and to RFLP (*Restriction fragment lenght polymorphic*), this last one, used for identification of *Candida dubliniensis*. Considering prevalent species, *C. albicans* showed higher sensitivity patterns to azoles and, the majority produced several virulence factors, independent of origin, infection or colonization. Statistical analyses allowed to identification of 17 *clusters* with total genetic relatedness, and others with minor or outright strains unrelated. There was no correlation between the genetic patterns with virulence and antimicrobial susceptibility, suggesting that, the amplified genetic regions might be related to other biological events. The inclusion of other *primers* could allow higher association among *C. albicans* strains.

Key-words: *Candida sp* - RAPD-PCR - Genotype-Phenotype Correlations - Candidiasis Vulvovaginal.

INTRODUCTION

Vulvovaginal Candidiasis (VVC) is an infection / inflammation of the lower female genitourinary tract, especially the vulva and vagina caused by normal inhabitants of the vaginal mucosa (Ferrer, 2000; Mendling e Seebacher, 2003; Rosa e Rumel, 2004; Schaller, 2006). It has been considered one of the most common diagnoses in daily practice of gynecologists (Corrigan, Clancy *et al.*, 1998; Corsello, Spinillo *et al.*, 2003; Rylander, Berglund *et al.*, 2004; Sobel, 2007), and its incidence has increased from 25%, in the general female population, to 42% among adolescents, becoming the second largest genital infection in the United States and Brazil (Corsello, Spinillo *et al.*, 2003; Barousse, Van Der Pol *et al.*, 2004; Rylander, Berglund *et al.*, 2004). Approximately three-quarters of women will experience an episode of VVC at least once in their life and 5-8% of them will have more than four attacks within a year; this condition has been designated as recurrent VVC (RVVC) (Mardh, Novikova *et al.*, 2003; Marrazzo, 2003; Patel, Gillespie *et al.*, 2004). To the last one, *C. glabrata* is considered as the main etiology, whose profile present lower susceptibility to the imidazole drugs (Ziarrusta, 2002).

VVC is not traditionally considered a sexually transmitted disease; nevertheless, the transmission of candida can occur during vaginal intercourse. Particularly, Candida transmission and sexual behaviors are linked to RVVC, and, epidemiological evidence suggests that anogenital and, especially, orogenital can be involved. Since the symptoms are not pathognomonic, the main clinical complaints are itching, vaginal discharge, burning, dispaurenia, dysuria, swelling and redness of the vulva and vagina (Sobel, 1990; Edwards, 2004; Rosa e Rumel, 2004).

The VVC is caused by yeast (Ziarrusta, 2002), which in 80 to 90% of the cases *C. albicans* is its major pathogen and, in 10 to 20%, other species, known as non-*albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitaniae* and *C. dubliniensis*). Recent data, present *C. glabrata* as the second species most frequent in VVC (Pichová, Pavlíčková *et al.*, 2001; Corsello, Spinillo *et al.*, 2003), and more rarely, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula sp*, *sp* and *Trichosporon*, (Acikgoz, Sancak *et al.*, 2004; Lopes Consolaro, Aline Albertoni *et al.*, 2004; Us e Cengiz, 2007). These last ones are detected in about 30% of adult healthy women (Lopes Consolaro, Aline Albertoni *et al.*, 2004; Rosa e Rumel, 2004; Rylander, Berglund *et al.*, 2004).

The relationship between parasite and the host depends on the balance between the virulence of the organism and defenses (Nardin, 2000). In fact, the colonization of the vaginal epithelium and the subsequent decline of immune response observed in situations of immunosuppression, such as diabetes mellitus, pregnant women, transplant etc, are considered predisposing factors. The adoption of carbohydrate diet, synthetic clothing, certain sexual practices (oral and anal), intrauterine devices and the use of hormonal contraceptives are some others additional factors (Sobel, 1985; Mardh, Novikova *et al.*, 2003). Here, the availability of glycogen in the vaginal environment, due to the high levels of female hormones, especially progesterone, serves as an excellent carbon source for growth and germination of yeast (Sobel, 1990).

Considering the vaginal microbiota, the lactobacilli act as a defensive barrier to the VVC, once they compete for nutrients, undertake a process of co-aggregation, reduce the adhesion of fungi to vaginal epithelium and produce substances that inhibit the germination

of filamentous fungi (Ziarrusta, 2002). *C. albicans* is considered as a model of fungal virulence factors (Chaffin, Lopez-Ribot *et al.*, 1998; Haynes, 2001; Shin, Kee *et al.*, 2002; Naglik, Rodgers *et al.*, 2003; Tavanti, Pardini *et al.*, 2004; Medrano, Brilhante *et al.*, 2006; Shinobu, Ogatta *et al.*, 2007).

In view of its ability to form biofilms, fungal cells initially adhere to surfaces through specific host factors (fibronectin and fibrinogen) and nonspecific ones (hydrophobic and electrostatic forces from the cell surface) (Donlan e Costerton, 2002; Ramage, Saville *et al.*, 2005). In biofilms, organisms are involved in a dense matrix of polysaccharides, which can interfere with the mechanisms of protection against attacks generated by the environment, nutrient availability, metabolic cooperation and acquisition of new genetic traits (Douglas, 2002). In VVC, this event was detected specially in carriage of intrauterine devices (IUDs) and contraceptive vaginal rings (Douglas, 2003; Camacho, Consolaro *et al.*, 2007).

The ability of pathogens to acquire iron is extremely important for their survival and ability to produce infection. Several fungi, specially *C. albicans* (Pendrak, Chao *et al.*, 2004; Pendrak, Yan *et al.*, 2004a; b), produce proteins, enzymes and haemolysins for intracellular iron acquisition (Manns, Mosser, Buckey, 1994; Watanabe, Takano *et al.*, 1999; Luo, Samaranayake *et al.*, 2001). In addition, the hydrolytic enzymes, phospholipase and proteinase, involved in nutritional and metabolic processes of micro-organisms are related to the degradation and invasion of host cells during infection (Van Burik e Magee, 2001). The maintenance or spread of fungal infections is conditioned on the ability of fungi to survive under different temperatures, that the human body present (Mccusker, Clemons

et al., 1994). However, under extreme ones (39 to 42 ° C), few groups of fungi can grow, so, they are considered thermo-tolerant and therefore more virulent (Almeida, Scully, 2002).

Several agents are available for the treatment of vulvovaginal candidiasis. Antifungal agents commercially available for the treatment of VVC include the following: imidazole antifungals (eg, butoconazole, clotrimazole, miconazole), triazole antifungals (eg, fluconazole, terconazole), and polyene antifungals (eg, nystatin) (Antonopoulou, Aoun *et al.*, 2009; Liu, Fan *et al.*, 2009). Nevertheless, this treatment has been done empirically, since the laboratory diagnosis and evaluation of antimicrobial susceptibility have been rarely required by physicians (Sobel, Zervos *et al.*, 2003; Richter, Galask *et al.*, 2005). The frequent contact to drugs, especially azoles, has increased the occurrence of resistant fungal species, especially *C. krusei* and *C. glabrata* (Pádua, Guilhermentti, Svidzinski, 2003).

Advances in molecular biology in the last two decades have allowed the development of rapid molecular genotyping techniques for clinical and epidemiological analyses. Among the current molecular techniques for the genotyping of yeast strains, PCR fingerprinting and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, are in wide use. Both genotyping methods have high discriminatory powers and reproducibility; they require little starting material and are rapid and simple to perform (Guarro, Gene *et al.*, 1999).

The aim of this study was identify and differentiate *Candida sp* from adult women with or without clinical symptoms to VVC by phenotypic and genotypic methods,

including analysis of virulence factors and antimicrobial susceptibility considering its relation with genetic patterns.

MATERIAL AND METHODS

This study involved 313 women with or without clinical symptoms of VVC, who visited the Obstetric and Gynecology Service in a teaching Hospital, State - SP. Informed consent was obtained from each patient that participated in the study: exclusion criteria included pregnancy, AIDS and diabetes. The information on each woman allowed categorizing in groups according to demographics aspects, clinical status (infection/colonization/ recurrence), adoption of treatment and symptoms to vulvovaginal candidiasis (VVC). VVC were defined as following: presence vaginal *Candida* species, plus signs and symptoms: abnormal vaginal itching or discharge, vaginal erythema or edema.

The vaginal fluid was collected by swab and followed for direct examination and fungal culture. Yeasts were identified by germ tube test, chlamydospore test, CHROMagar, and carbohydrate assimilation assays.

Phospholipase activity assays were performed, according to Price *et al.*, 1982; proteinase (Ruchel, Debernardis *et al.*, 1992); amylase and gelatinase (Lacaz, 2002), haemolysin (Luo, Samaranayake *et al.*, 2001); biofilm (Shin, Kee *et al.*, 2002; Jin, Yip *et al.*, 2003) and thermotolerance at 39 / 42° C according to the methodology described by Llanos (2006). Each isolate was tested in duplicate.

In vitro antifungal activities of fluconazole (SIGMA), itraconazole (SIGMA), cetoconazole (SIGMA) and amphotericin B (SIGMA) were performed by microdilution

according CLSI recommendation, including interpretative breakpoint presented in (**Table 1**), for each clinical isolate and ATCC strains (*C. albicans* 64548 and *C. glabrata* 2001).

The *Candida sp* strains were grown in broth, harvested, and the DNA extracted using the method outlined in Bolano (2001).

All the isolates prior classified as *C. albicans* by phenotypic analysis, were submitted to genetic investigation by RFLP to differentiate *C. dubliniensis*, as protocol described by Trost (2004). Oligonucleotide *primers* for polymerase chain reactions (PCR) were obtained and designed to amplify the internal transcribed spacer regions 1 (ITS1) and 2 (ITS2). *Primer 1* bind to 18 S rDNA and *primer 2* to 25/28S rDNA, representing highly conserved regions of DNA: *primer1*(5'-GTCAAACCTGGTCATTTA-3');*primer2*(5'-TTCTTTTCCTCCGCTTATTGA- 3'). Restriction digests were set up with 12 µl of PCR products and 1 U of the enzyme (*MwoI*, New England Biolabs®, EUA), incubated for 2h at 60° C. Restriction fragments were separated by electrophoresis in 2% agarose gels, including DNA Ladder Fermentas 100 pb. The gels were stained with ethidium bromide and analysed by KODAK Gel Logic 2200 System. The restriction length polymorphism of PCR products show fragments with 141, 184 e 261 pb to *C. albicans* and 264 e 325pb to *C. dubliniensis*.

The genotyping of *C. albicans* strains were performed by PCR according to the protocol described by Sugita (2002). The reaction occurred with two primers designed for the identification of genotypes recognized as A, B and C; one spans the intron site in the 26S of rRNA gene:CaLSU-F (5'GTTAATCCATTCATGCGCGTCAC-3') and CaLSU-R (5'TTTCTGCCAGTGCTCTG-3').

The oligonucleotides B14 (5'- GATCCAGTCC-3') to *C. albicans* strains, and OPE - 18 (5' – GGACTGCAGA – 3') to other *Candida* species were used the RAPD-PCR reaction. Usually 40 ng of total DNA were added to a 25 µl reaction containing 2.5 µl of 10 X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂), 4 µl of dNTP mix (1.25 mM each dNTP), 0.5 µl (50pmol) of primer, 0.5% Tween 20 and 1.0 unit of *Taq* DNA polymerase (Fermentas), and the DNA (1 µl-40ng) was used in the reaction. Cycle conditions were 94°C for 1 min, 40°C for 1 min, 72 °C for 2 min, 45 cycles and a final extension at 72 °C for 10 min, in a Gene Amp® PCR Systems 9700 thermocycler. PCR products were size separated in agarose (1.5%)/1XTBE gel electrophoresis for 30 min at 100 V, 2:30min at 50V, stained with 0.5 µg/ml ethidium bromide for 10 min.

The analysis of results of RAPD was assessed by dendrogram (GEL COMPAR II versão 4.5 Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) according to similarity of band patterns. The Dice metric was the statistical methods chosen to calculate the similarity coefficients of sample pairs (UPGMA). Dendrograms based on a pairwise distance matrix of the DNA samples were generated By UPGMA: it was considered the tolerance of 2% to compare bands (Soll, 2000).

For all the variables found, the Fisher's Exact Test was used for statistical analysis. Samples were classified as identical (correlation of 100%); highly related samples (90%); moderately related samples (80%) and unrelated samples (< 70%).

The study was approved by the Ethics Committee of the Medicine University from São José do Rio Preto, written consent was obtained from all the women.

RESULTS

After informed consent assigned of three hundred and twelve patients, the clinical specimens had been collected from a total of 138 women with symptomatic indications (infection) and 174 without symptoms (colonization). In this study, the main complaint of symptomatic patients was: soreness (68%), discharge (65%) and vaginal itchy (61%). The first one was associated to positive culture in 57 patients, which the majority originated from infection.

The positively detected in laboratory tests occurred by direct examination in 35,5% (111) and by culture 40% (125). For this last one, 81 samples were obtained from infection, and 45 from colonization. One patient had mixed infection, with two *Candida* species: *C. albicans* and *C. glabrata*. Differently, with 41% of patients was observed clinical suspicious of VVC (over two symptoms), and negatively for laboratory tests.

C. albicans strains occurred in 84,9% (107) of the cases, followed by non albicans: *C. glabrata* 5,5% (7), *C. parapsilosis* 3,75% (4), *C. tropicalis* 1,6% (2), and others, in the lower frequency with 0,8% (1) each one, *C. guilliermondii*, *C. catenulada*, *C. dubliniensis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, and the algae *Prototheca wickerhamii*. Considering asymptomatic group as origin of non albicans strains, (11) five revealed history of recurrence. In view of the age, it was observed that non-albicans candida occurred in 50% of the older women (over 34).

Given this microbial diversity and the high prevalence of some, the phenotypic and genotypic analysis included *C. albicans* (72/35) and *C. glabrata* (2/5), from symptomatic and asymptomatic carriages, respectively.

About 70% of the patients (88) had history of recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC), and, associated with *C. albicans* originating from infection and colonization, 57 e 21 samples, respectively (p=0,0622). This specie, in association with recurrences and sexual practices, showed that, 45% of them were originated from women which adopted vaginal and oral practices. Regarding the association between RVVC and *C. glabrata*, in the present data it was found only one strain, originated from infection, and two, from colonization.

Antifungal drug susceptibility testing of yeasts from symptomatic patients: In the present study, all the strains of the *C. albicans* (72) exhibited susceptibility for amphotericin B (MIC ranged from 0,03 to 0,5µg/mL). For ketoconazole, 96% (69) were susceptible (MIC from 0,03 to 0,125µg/mL); one, sensible dose dependent (MIC 0,25 µg/mL) and 3% (2) resistant (MIC 8 to 16µg/mL). For itraconazole, 92% (66) were susceptible (MIC 0,03 to 0,125µg/mL); 5,5% (4) sensible dose dependent (MIC 0,25 to 0,5µg/mL) and 3% (2) resistant (MIC 1 to 16µg/mL). All the strains, except one 97% (71), were susceptible to fluconazole (MIC 0,025 to 8µg/mL). This exception showed resistance with MIC of 64µg/mL.

C. glabrata strains showed susceptibility for amphotericin B 100%, but resistance to azole antifungal drugs (e.g. fluconazole, ketoconazole and itraconazole).

Antifungal drug susceptibility testing of yeasts from asymptomatic patients: considering *C. albicans* strains, no resistance was detected to Anfotericina B and to fluconazole, however one strain, for this last one, was sensible dose dependent (MIC 16µg/mL). For ketoconazol 94,1% (33) were susceptible (MIC 0,03 to 0,125µg/mL); 2,9% (1) sensible dose dependent (MIC 0,25µg/mL), and 2,9% (1) resistant (MIC 4µg/mL).

Susceptibility to itraconazole (MIC 0,03 to 0,125 μ g/mL), was observed in 88,2% (31) and, 11,7% (4) sensible dose dependent (MIC 0,25 to 0,5 μ g/mL).

Interestingly, all *C. glabrata* strains exhibited susceptibility to amphotericin B (MIC 0,06 to 0,25 μ g/mL). In contrast, resistance was observed for ketoconazole and itraconazole (MIC 2 to 16 μ g/mL), in 80% (4) and 60% (3), respectively. Once more, this same phenotype appeared to fluconazole in 60%(3), but now with higher MIC values (64 to 128 μ g/mL). The dose dependent susceptibility occurred in two isolates for itraconazole (MIC 5 μ g/mL) and one for fluconazole 32 μ g/mL.

Virulence determinants: several virulence factors were detected for *C. albicans* and *C. glabrata* (**Table 2**). Considering *C. albicans* from symptomatic and asymptomatic groups, biofilm and haemolysin production was detected, with significant statistical difference ($p=0,06$) and ($p=0,0021$), respectively. For others virulence determinants the results showed a statistically insignificant difference. Nevertheless, the compared analysis between *C. albicans* e *C. glabrata*, revealed statistical significant differences: for proteinase (p 0,0156), phospholipase (p 0,0005), haemolysin (p 0,0003), gelatinase (p 0,018), amylase ($p < 0,005$) and biofilm production (p 0,003). In addition, considering thermotolerance test, no difference significant was observed.

All the strains of *C. albicans* obtained from symptomatic women showed high prevalence of the A genotype 83,5% (61), followed by B 13,5% (10) and C 3% (2); to the asymptomatic group, 79,5% (27), 17,5% (6), 0,35%(1), respectively (**Figure 1**). Upon statistical analysis, the association among antimicrobial resistance, virulence and the genotypes, showed no significant statistical difference.

The RAPD genotyping assay that was applied to study the genotypic characteristics of *C. albicans*, using one decameric primer, revealed 64 profiles which were used to construct the dendrogram, (**Figure 2**). The genetic similarity among the samples led to the formation of two main interdependent *clusters*, which presented similarity coefficient of 28%. Subsequent analysis of these *clusters* demonstrated the existence of 4 subgroups with similarity rates from 39 to 80%. Ten *clusters* with similarity rate of 80% were found (31 isolates), in addition of 17 *clusters* with total genetic identity (61 samples). The clonal nature analysis for the *clusters*, with high similarity (over 80%), showed that 8 were composed exclusively by strains from infections; 10 from both colonization and infection, and just 1 from colonization.

Among 107 isolates of *C. albicans*, considering the susceptibility antimicrobial, only ten presented with congruent phenotypic and genotypic profiles.

Considering individual genetic patterns among the isolates, the greatest and smallest number of bands found was 9 and 2 (from infection), and 7 and 3 (from colonization), respectively. These fragments had molecular weights ranging from 350 to 5000 bp (**Figure 3**). Only one monomorphic band (510 pb) were found in 100% of *C. albicans*.

Based on the genetic identity profile and genotype analysis, there was a main *cluster* of genotype B that grouped 8 samples of *C. albicans* with 100% of identity among them, and another 8, with lower similar pattern (88%). Once more, those categorized as genotype A formed 11 clusters (100%) with 43 samples. Differently, the genotype C was randomly distributed without any specific clonal formation.

Presently, the association between genetic similarity patterns and virulence factors was found in 61 strains (clusters with 100% of identity) and in 31 (similarity ranging from 80% to 99%), (**Table 3**).

It could be observed that *C. albicans* resistance strains neither from RVVC or VVC were no clustered together on the dendrogram analysis.

Considering *C. glabrata* strains (7), it was not found any cluster with total genetic similarity. In spite of, cluster with highest genetic identity profile (90%), included two isolates, one from infection and the other from colonization. For colonization group, tree samples integrated one cluster with 80% of genetic identity, (**Figure 4**).

DISCUSSION

This study was undertaken because of lacking of epidemiological data on this subject in our country. The diagnosis and therapies for treating vulvovaginal candidiasis cases often depends on estimates of individual and personal experience.

Several clinical manifestations of vulvovaginal candidiasis has been described: pruritus, hyperemia, vaginal discomfort and leucorrhea, burning soreness and abnormal vaginal discharge,(Moreira e Paula, 2006). Soreness and vulval itching has been reported as the most important complaint in women with VVC; however, it can also be present in other vaginitis (Ahmad e Khan, 2009). In fact, in the present study, as well as in Sobel 1998, they were the main complaints especially in infection strains; high concentration of yeast in vulvar epithelium leads to these symptoms due to the metabolites of fungus. In contrast, as detected here, pruritus was observed in women with negative culture; this might be due to another cause, such as individual patterns of immune response (Lopes Consolaro, Aline Albertoni *et al.*, 2004; Owen e Clenney, 2004).

Microscopic study for yeast was less affectivity them culture. As described previously (Jindal, Gill *et al.*, 2007), the difference in the sensitivity of direct microscopy may be due to variations in the inoculum. Therefore, if the microscopy failures, the diagnosis based on culture of vaginal secretions, increases the sensitivity; hence, the necessity to recommend this procedure to patients, even before the adoption of the antifungal therapy. In addition, when facing negative laboratory tests in symptomatic women, it is essential to consider either another etiology than fungus, or a previous antifungal treatment which leads to the inhibitory action.

Today, the use of chromogenic media is recommended, in order to establish a rapid presumptive diagnosis for groups of yeast, commonly associated with human infections (Boatto, Moraes, 2007; Andriolli, 2009). In fact, the usage of Chrom agar Candida (DIFCO) adopted in this analysis, with 3 days of incubation allowed detecting one case of VVC of multiple etiologies.

C. albicans is the most prevalent etiologic agent in vulvovaginitis, and the occurrence has been ranging from 47 to 74.5% (Ahmad e Khan, 2009; Andrioli, 2009; Giusiano, Rojas, Toma-Vanacore, Mangiaterra, 2009). *C. albicans* strains, in the present study, were detected in higher percentage (85%), in accordance with others studies (Mendling e Seebacher, 2003; Rosa e Rumel, 2004).

Our data, as with other investigations (Boatto e Moraes, 2007; Holanda, 2007; Andriolli, 2009), showed the emerging of non-albicans species for both VVC as for the control group (19), namely: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. catenulada*, *C. dubliniensis* and *C. guilliermondii*. These species can remain in the vaginal mucosa as colonized strain during the interval periods of occurrence of VVC, even under antifungal

therapy which does not fully eradicate them. Its higher occurrence among elderly patients might be considered here due to drastic changes in hormonal balance observed during the menstrual cycle, menopause or after estrogen treatment. Furthermore, in older age the immune response could be weak 12: (Okungbowa, Isikhuemhen *et al.*, 2003; Galle e Gianinni, 2004). Therefore, non albicans species should be considered in clinical practice, especially in such abnormal conditions. Although less frequent, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces cerevisiae*, are considered as etiology of VVC, here detected and in some studies (McCullough, Clemons *et al.*, 1998; Dan, Kaneti *et al.*, 2003; Buscemi, Arechavala *et al.*, 2004; Lopes Consolaro, Aline Albertoni *et al.*, 2004; Ferrazza, 2005; Jackson, Mullings *et al.*, 2005) which changes, in part, the epidemiological nature. These agents appear as potential pathogen, since there is less sensitivity to azole derivatives (Savini, Catavittello *et al.*, 2008). In fact, the isolate from the present investigation showed dose-dependent sensitivity to fluconazole. Therefore, further studies must be performed with higher number of samples for more specific results.

Our data corroborate with other studies that showed *C. glabrata*, as second main pathogen of VVC (Suárez e Fernández, 2003; Ahmad e Khan, 2009; Giusiano, Rojas, Toma-Vanacore, Mangiaterra, 2009), and associated with elevated MIC levels for the azoles, the most commonly prescribed class of antifungal drugs. This event occurs here, even without diabetic women; this population may experience higher risks of infection by this species (Spinillo, Pizzoli *et al.*, 1993; Spinillo, Michelone *et al.*, 1994; Okungbowa, Isikhuemhen *et al.*, 2003). The eradication of *C. albicans* by antifungal therapy, has led to the selection of fungal species more resistant, and this is considered one of the causes of higher persistence of *C. glabrata* in some pathologies or as asymptomatic carriage.

C. dubliniensis, is a new, recently described species of yeast, first described in HIV patients with oral candidiasis (Sullivan e Coleman, 1998). Since then, infections by this yeast have been widely reported, including vaginal disorders (Odds, Van Nuffel *et al.*, 1998; Pruthi, Al-Janabi *et al.*, 2003; Acikgoz, Sancak *et al.*, 2004). According to these reports, the present study, relates this species, although sporadic as etiology of VVC. Recently, it is estimated that 2% of the yeasts identified as *C. albicans* are actually *C. dubliniensis*, because this species shares many phenotypic and biochemical characteristics. The definitive identification of *C. dubliniensis* is still a problem to routine laboratories that need improve the diagnosis.

Recurring vulvovaginal candidiasis (RVVC) is a common vaginal discharge affecting 5% of all women at least once in their life; this event has *C. albicans* as the main etiology and here, the results were in concordance, particularly with those originated from infections. The transmission of *Candida sp* and sexual behavior are linked to recurrent vulvovaginal candidiasis (Boatto e Moraes, 2007). In addition, it is reported that, in 20% of cases of VVC, the yeast can be originated from intestinal tract, oral cavity, perineum of sexual partners (Fidel e Sobel, 1996; Mendling e Seebacher, 2003; Rosa e Rumel, 2004). At this way, in the present, 45% of patients adopted vaginal and oral practices, which is believed to be one way for acquisition of fungus among partners. (Spinillo, Carratta *et al.*, 1992; Sobel, Faro *et al.*, 1998; Bailey, Benato *et al.*, 2008).

The relation between resistance profiles presented by pathogenic yeast and relapses has been frequently observed in clinical practice. This study aimed to evaluate the profile of susceptibility to antifungal drugs, commonly elected as treatment of VVC, and here, most of them showed high *in vitro* activity against the isolates of *C. albicans*. Frequently, the

sensitivity patterns are higher when *C. albicans* colonizes the vaginal mucosa, since in this status, antifungal therapy is not indicated for its eradication.(Richter, Galask *et al.*, 2005; Sobel, 2007; Shahid e Sobel, 2009). All strains originated from women submitted to previous antifungal treatment, showed lower sensibility or resistance to azoles, data also found in other studies (Pirota e Garland, 2006; Jindal, Gill *et al.*, 2007; Mohanty, Xess *et al.*, 2007). These drugs, often adopted as a single dose, might eliminate the symptoms, but are not capable of producing neither clinical nor microbiological cure.

As reported in this work, *C. glabrata* resistant to azoles occurred in 50%, among women with previous exposure to these drugs. It is known that such drugs promote selective pressure on several species, especially for the non albicans, which has high resistance levels (Richter, Galask *et al.*, 2005). Although, detected in fewer cases, it was seen concomitant resistance patterns to fluconazole, itraconazole and ketoconazole. This suggests the occurrence of crossed resistance, event described by other researchers (Pirota e Garland, 2006; Boatto e Moraes, 2007).

Most women were infected (71) or colonized (34) by *C. albicans* highly sensible to fluconazole, emphasizing the limited action of this fungistatic agent for controlling the yeast in the vaginal mucosa, in spite of the clinical success of azoles. This event suggests that other factors besides antimicrobial action are involved with either eradication or maintenance of the yeast on the epithelium.

Many authors have discussed main differences in virulence of *C. albicans* originated from distinct clinical specimens (Richardson, Kearns *et al.*, 1982; Wingard, Dick *et al.*, 1982). However, little is known about this species in vaginal mucosa during the infection and colonization episodes. As already noted, pathogenesis of *C. albicans* is

regulated by various virulence factors, among these, the production of extracellular hydrolytic enzymes (phospholipase, proteinase). Even so, the production is not limited for this species, once its presence was observed in *C. glabrata*, *C. tropicalis*, among others (Ghannoum, 2000; Ombrella, Racca, Ramos, 2008). Corroborating with these studies, regarding secreted proteinase, similar percentual values were found: *C. albicans* (76%) e *C. glabrata* (28,5%). As reported before (Van Burik e Magee, 2001; Oksuz, Sahin *et al.*, 2007), *C. albicans* is known to secrete phospholipases, and here, a large number of *C. albicans* strains produced this enzyme. These differences in percentage are due to various conditions related to either parasite or the host: concerning the first one, the combined synthesis of multiple virulence factors following very slight environmental modifications (Cutler, 1991); about the latter, for example, the nature of the immune response, distinctive anatomical origins of the infection or colonization (blood, oral, urogenital and fecal mucosa, etc), and the infection stage (Basu, Gugnani *et al.*, 2003; Oksuz, Sahin *et al.*, 2007). Comparing *C. albicans* and non albicans, originated from both symptomatic and asymptomatic women in face of high potential virulence factors, it was noted a larger tendency to the first towards pathogenesis ($p=0,8$).

In this investigation, corroborating with other researches (Shimizu, 1988; Kumar, 2009), the synthesis of gelatinase was observed in 98% of isolates of *C. albicans* and 71.5% of *C. glabrata*, but neither related with the variables studied, which demonstrate its limited value as epidemiological marker.

Amylase was produced by *C. glabrata*, but the results were discordant with those published by Tsuyoshi (2005), for the majority of the isolates, except one, presented this

phenotype. However, its rare occurrence in *C. albicans*, is in agreement with the results presented by Rosa, Pereira, Rosa, Hofling (2000).

The hemolytic activity is associated with the ability of pathogens to acquire intracellular iron from the host cell (Manns, Mosser, Buckley, 1994). In this study, haemolysin was highly produced *C. albicans* (83%), corroborating previous studies (Shinobu, Ogatta *et al.*, 2007; Rörig, Colacite, Abegg, 2009). In contrast, here, as well as in other studies (Luo, Samaranayake *et al.*, 2001; Rörig, Colacite, Abegg, 2009) lower levels of this protein were noted in *Candida non albicans*. In fact, only a single *C. glabrata*, originated from a symptomatic patient, produced such protein seen in blood agar surface. The culture established with different blood types (sheep or human) can hinder the production of haemolysin, especially for the group *non albicans*, usually considered less virulent.

The ability of adhesion to substrates is an important parameter for pathogenesis of various infectious diseases (Shin, Kee *et al.*, 2002; Laffey e Butler, 2005). In the present investigation, considering the prevalent species (*C. albicans*), derived from symptomatic patients, the biofilm was detected in several samples (high producer), as in studies of Gasparetto, Negri, Paula, Svidzinski (2005) and Pruthi (2003). Considering *C. glabrata*, this unusual event occurred only in isolates from symptomatic women. Although this species is considered a lesser producer of biofilm (Gasparetto, Negri, Paula, Svidzinski 2005), in the present study, they produced concurrently other virulence factors, which may have contributed to the symptoms.

Temperature extremes of growth are closely related with enzymatic machinery of various microorganisms, including fungi, and its relationship with disease has been

discussed by several authors (De Llanos, Fernandez-Espinar *et al.*, 2006; Rörig, Colacite, Abegg, 2009). The analysis of this parameter presented here, in *C. albicans* and *C. glabrata*, showed thermotolerance, but no correlation with the variables in both groups.

Given the many limitations of phenotyping methods, molecular biology methodology have been adapted for use as molecular identification. Recent advances in the use of molecular DNA analysis have facilitated the development of identification systems at a species level (Dembry, Vazquez *et al.*, 1994; Williams, Wilson *et al.*, 1995; Barchiesi, Di Francesco *et al.*, 1997; Del Castillo, Bikandi *et al.*, 1997; Díaz-Guerra, Martínez-Suárez *et al.*, 1997; Taylor, Geiser *et al.*, 1999).

This investigation, in according to Shinobu (2007), showed the genotyping A as prevalent. Although statistical analysis did not reveal significant differences, considering higher casuistic for both groups, this result could be expected. In fact genotyping A is considered more virulent, could be responsible for cases of infection. Among others genotyping it was not possible to correlate with virulence factors because of rare cases.

Here, it was studied the patterns of strain relatedness among pathogenic yeasts from within and among groups of women, to determine whether there were significant associations between genotype and host condition, virulence and antimicrobial susceptibility. Unique genotypes were identified in 64 samples by random amplified polymorphic DNA analysis. Genetic similarities among groups of strains were calculated and compared. It was found no significant difference in the patterns of relatedness of strains from vagina, regardless of host conditions. The yeast of all two host groups had similar species and genotypic diversities. Furthermore, a multiple host can be colonized or infected

with unique or multiple genotypes of the same species, indicating dynamic processes of yeast on women, as was previously reported by (Xu, Boyd *et al.*, 1999).

It was noticed that although all those cases occurred from 2006 to 2009, there was epidemiological link noted for 61 cases (symptomatic and asymptomatic). Also, the isolates recovered exhibited equal genetically patterns and susceptibility profiles for 11 isolates. In according to virulence factors, there were no specific patterns related among them. It is possible that genes encoding virulence factors are located in another position of genome, or upon exposure to different environmental signals could be a key mechanism of pathogenicity. . If such is the case, profiles of gene expression and in vitro modulation of virulence under different microenvironmental conditions should be investigated in parallel with genotypes in future studies aimed at understanding the pathobiology of *C. albicans*.

In a clonal model of development, different profiles of a unique polymorphic marker may be associated with variations in pathogenicity, whether or not this polymorphic marker is physically close to the genes involved in pathogenic mechanisms.

The authors wish to thank Jose Antônio Cordeiro for statistical analysis of this article, Prof. Dr. Arnaldo Colombo for offer the program Gel Compar and contruction of dendrogram; Prof Dr. Maurício Lacerda Nogueira by technical support.

REFERÊNCIAS

ACIKGOZ, Z. C. *et al.* Prevalence of *Candida dubliniensis* among the stored vaginal *Candida* isolates in a Turkish hospital. *Mycoses*. v. 47, n. 9-10, p. 393-396, 2004.

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, n. 1, p. 68-71, 2009.

ALMEIDA, O. P.; SCULLY, C. Fungal infections of the mouth. *Braz J Oral Sci* . April/June v.1, n. 1, p.19-26, 2002.

ANDRIOLI, J. L. *et al.* Frequencia de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. *Rev Bras Ginecol Obstet*. v. 31, n. 6, p. 300-4, Jun 2009.

ANTONOPOULOU, S. *et al.* Fenticonazole Activity Measured by the Methods of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and CLSI against 260 *Candida* Vulvovaginitis Isolates from Two European Regions and Annotations on the Prevalent Genotypes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* .v. 53, n. 5, p. 2181-2184, 2009.

BAILEY, J. *et al.* Vulvovaginal candidiasis in women who have sex with women. *Sex Transm Dis*. v. 35, n. 6, p. 533-6, Jun 2008.

BARCHIESI, F. *et al.* Genotypic identification of sequential *Candida albicans* isolates from AIDS patients by polymerase chain reaction techniques. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. v. 16, n. 8, p. 601-5, Aug 1997.

BAROUSSE, M. M. *et al.* Vaginal yeast colonisation, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescents. *Sexually Transmitted Infections*. v. 80, n. 1, p. 48-53, 2004.

BASU, S. *et al.* Distribution of *Candida* species in different clinical sources in Delhi, India, and proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* isolates. *Rev Iberoam Micol.* v. 20, n. 4, p. 137-40, Dec 2003.

BOATTO, H. F, MORAES, M. S. *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. v. 29. n. 2. *Rev. Bras. de Ginecol. Obstet.* 2007. p. 80-84.

BUSCEMI, L., ARECHAVALA, A, NEGRONI, R. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis, en pacientes del hospital de infecciosas Francisco J. Muñiz. *Rev Iberoam Micol.* v. 21, n. 4, p. 177-81, Dec 2004.

CAMACHO, D. P. *et al.* Vaginal yeast adherence to the combined contraceptive vaginal ring (CCVR). *Contraception*. v. 76, n. 6, p. 439-443, 2007.

CHAFFIN, W. L. *et al.* Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function, and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 62, n. 1, p. 130-+, 1998.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A2: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. Pennsylvania, 2002.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M44P: Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast. Pennsylvania, 2003.

CORRIGAN, E. M. *et al.* Cellular immunity in recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clinical and Experimental Immunology*. v. 111, n. 3, p. 574-578, 1998.

CORSELLO, S. *et al.* An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. v. 110, n. 1, p. 66-72, 2003.

CUTLER, J. E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*. v. 45, p. 187-218, 1991.

DAN, M. *et al.* Vaginitis in a gynecologic practice in Israel: causes and risk factors. *Isr Med Assoc J*. v. 5, n. 9, p. 629-32, Sep 2003.

DE LLANOS, R. *et al.* A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. v. 90, n. 3, p. 221-231, 2006.

DEL CASTILLO, L. *et al.* Comparison of morphotypic and genotypic methods for strain delineation in *Candida*. *Mycoses*. v. 40, n. 11-12, p. 445-50, Dec 1997.

DEMBRY, L. *et al.* DNA analysis in the study of the epidemiology of nosocomial candidiasis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. v. 15, n. 1, p. 48-53, Jan 1994.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 15, n. 2, p. 167-+, 2002.

DOUGLAS, L. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol*. v. 19, n. 3, p. 139-43, Sep 2002.

DOUGLAS, L. J. Candida biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*. v. 11, n. 1, p. 30-36, 2003.

DÍAZ-GUERRA, T. *et al.* Comparison of four molecular typing methods for evaluating genetic diversity among *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive patients with oral candidiasis. *J Clin Microbiol*. v. 35, n. 4, p. 856-61, Apr 1997.

EDWARDS, L. The diagnosis and treatment of infectious vaginitis. *Dermatol Ther*. v. 17, n. 1, p. 102-10, 2004.

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

FERRAZZA, M. H. S. H., *et al.* Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*. v. 27. n. 2..2005.

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

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

GALLE, L. C, GIANINNI, M. J. S. M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. *J. Bras. Patol. Med. Lab*.v. 40. n. 4. 2004. p. 229-236.

GASPARETTO, A, NEGRI, M. F. N, PAULA, C. R, SVIDZINSKI, T. I. E. Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária. *Acta Sci. Health Sci*. v. 27. n. 1. 2005.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* v. 13, n. 1, p. 122-43, table of contents, Jan 2000.

GIUSIANO, G, ROJAS, F, TOMA-VANACORE, S, MANGIATERRA, M. Frecuencia y perfil antifúngico de especies de *Candida spp.* aisladas de exudados vaginales de niñas premenárquicas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* v. 27, n. 7, p. 428, Aug-Sep 2009.

GUARRO, J. *et al.* Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews.* v. 12, n. 3, p. 454-+, 1999.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. *Trends in Microbiology.* v. 9, n. 12, p. 591-596, 2001.

HOLANDA, A. A. R., *et al.* Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. *Rev. Bras.Ginecol. Obstet.* v. 29. n. 1. 2007.

JACKSON, S. T. *et al.* The epidemiology of mycotic vulvovaginitis and the use of antifungal agents in suspected mycotic vulvovaginitis and its implications for clinical practice. *West Indian Med J.* v. 54, n. 3, p. 192-5, Jun 2005.

JIN, Y. *et al.* Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 41, n. 7, p. 2961-2967, 2003.

JINDAL, N. *et al.* An epidemiological study of vulvovaginal candidiasis in women of childbearing age. *Indian J Med Microbiol.* v. 25, n. 2, p. 175-6, Apr 2007.

KUMAR, V. G., *et al.* Phospholipase C, proteinase and hemolytic activities of *Candida spp.* isolated from pulmonary tuberculosis patients. *Journal of Medical Mycology.* v. 19, 2009.

LACAZ, C. S. *et al.* *Tratado de Micologia Médica*. São Paulo: SARVIER, 2002. 1104 pp.

LAFHEY, S. F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*. v. 151, n. Pt 4, p. 1073-81, Apr 2005.

LIU, X. P. *et al.* Antifungal susceptibility and genotypes of *Candida albicans* strains from patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*. v. 52, n. 1, p. 24-28, 2009.

LOPES CONSOLARO, M. *et al.* Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. *Rev Iberoam Micol.* v. 21, n. 4, p. 202-5, Dec 2004.

LUO, G. *et al.* *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 39, n. 8, p. 2971-2974, 2001.

MANNS, J. M, MOSSER, D. M, BUCKLEY, H. R. Production of a Hemolytic Factor by *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. v. 62, n. 11, p. 5154-5156, 1994.

MARDH, P. A. *et al.* Colonisation of extragenital sites by *Candida* in women with recurrent vulvovaginal candidosis. *Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. v. 110, n. 10, p. 934-937, 2003.

MARRAZZO, J. Vulvovaginal candidiasis - Over the counter treatment doesn't seem to lead to resistance. *British Medical Journal*. v. 326, n. 7397, p. 993-994, 2003.

MCCULLOUGH, M. *et al.* Epidemiological investigation of vaginal *Saccharomyces cerevisiae* isolates by a genotypic method. *J Clin Microbiol.* v. 36, n. 2, p. 557-62, Feb 1998.

MCCUSKER, J. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* virulence phenotype as determined with CD-1 mice is associated with the ability to grow at 42 degrees C and form pseudohyphae. *Infect Immun.* v. 62, n. 12, p. 5447-55, Dec 1994.

MEDRANO, D. *et al.* Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* v. 48, n. 1, p. 17-20, 2006 Jan-Feb 2006.

MENDLING, W.; SEEBACHER, C. Guideline vulvovaginal candidosis: Guideline of the German Dermatological Society, the German Speaking Mycological Society and the Working Group for Infections and Infectimmunology of the German Society for Gynecology and Obstetrics. *Mycoses.* v. 46, n. 9-10, p. 365-369, 2003.

MOHANTY, S. *et al.* Prevalence & susceptibility to fluconazole of *Candida* species causing vulvovaginitis. *Indian Journal of Medical Research.* v. 126, n. 3, p. 216-219, 2007.

MOREIRA, D.; PAULA, C. R. Vulvovaginal candidiasis. *International Journal of Gynecology & Obstetrics.* v. 92, n. 3, p. 266-267, 2006.

NAGLIK, J. R. *et al.* Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *Journal of Infectious Diseases.* v. 188, n. 3, p. 469-479, 2003.

NARDIN, M. Prevalencia de la candidiasis vulvovaginal y su relación con algunos factores de riesgo. *Rev Argent Microbiol.* 2000.

ODDS, F. C. *et al.* Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 36, n. 10, p. 2869-2873, 1998.

OKSUZ, S. *et al.* Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn J Infect Dis.* v. 60, n. 5, p. 280-3, Sep 2007.

OKUNGBOWA, F. *et al.* The distribution frequency of *Candida* species in the genitourinary tract among symptomatic individuals in Nigerian cities. *Rev Iberoam Micol.* v. 20, n. 2, p. 60-3, Jun 2003.

OMBRELLA, A. M, RACCA, L, RAMOS, L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. *Rev Iberoam Micol.* v. 25, n. 1, p. 12-6, Mar 2008.

OWEN, M.; CLENNEY, T. Management of vaginitis. *Am Fam Physician.* v. 70, n. 11, p. 2125-32, Dec 2004.

PATEL, D. *et al.* Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol.* v. 190, n. 3, p. 644-53, Mar 2004.

PENDRAK, M. L. *et al.* Heme oxygenase in *Candida albicans* is regulated by hemoglobin and is necessary for metabolism of exogenous heme and hemoglobin to alpha-biliverdin. *Journal of Biological Chemistry.* v. 279, n. 5, p. 3426-3433, 2004.

_____. Hemoglobin regulates expression of an activator of mating-type locus alpha genes in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell.* v. 3, n. 3, p. 764-775, 2004a.

_____. Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* v. 426, n. 2, p. 148-156, 2004b.

PICHOVÁ, I. *et al.* Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem.* v. 268, n. 9, p. 2669-77, May 2001.

PIROTTA, M. V.; GARLAND, S. M. Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 44, n. 9, p. 3213-3217, 2006.

PRUTHI, V. *et al.* Characterization of biofilm formed on intrauterine devices. *Indian J Med Microbiol.* v. 21, n. 3, p. 161-5, 2003 Jul-Sep 2003.

PÁDUA, R. A. F., GUILHERMENTTI, E, SVIDZINSKI, T. I. E. In vitro activity of antifungal agents on yeasts isolated from vaginal secretion. *Acta Sci. Health Sci.* v. 25. n. 1. p. 51-4. 2003.

RAMAGE, G. *et al.* *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell.* v. 4, n. 4, p. 633-638, 2005.

RICHARDSON, M. D. *et al.* Differentiation of extracellular from ingested *Candida albicans* blastospores in phagocytosis tests by staining with fluorescein-labelled concanavalin A. *J Immunol Methods.* v. 52, n. 2, p. 241-4, Jul 30 1982.

RICHTER, S. S. *et al.* Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 43, n. 5, p. 2155-2162, 2005.

ROSA,E.A.R, PEREIRA, C. V, ROSA, R. T, HOFLING, J. F. Grouping oral *Candida* species by multilocus enzyme electrophoresis. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* v.50, p.1343-1349, 2000.

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

RUCHEL, R. *et al.* CANDIDA ACID PROTEINASES. *Journal of Medical and Veterinary Mycology.* v. 30, p. 123-132, 1992.

RYLANDER, E. *et al.* Vulvovaginal candida in a young sexually active population: prevalence and association with oro-genital sex and frequent pain at intercourse. *Sexually Transmitted Infections.* v. 80, n. 1, p. 54-57, 2004.

RÖRIG, K. C. O., COLACITE, J, ABEGG, M. A. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero Candida. *Rev. Soc. Bras. Med.* v. 42. n. 2, p. 225-7, 2009.

SAVINI, V. *et al.* Two cases of vaginitis caused by itraconazole-resistant *Saccharomyces cerevisiae* and a review of recently published studies. *Mycopathologia.* v. 166, n. 1, p. 47-50, Jul 2008.

SCHALLER, M. Candida albicans--interactions with the mucosa and the immune system. *J Dtsch Dermatol Ges.* v. 4, n. 4, p. 328-36; quiz 337-8, Apr 2006.

SHAHID, Z.; SOBEL, J. Reduced fluconazole susceptibility of *Candida albicans* isolates in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: effects of long-term fluconazole therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* v. 64, n. 3, p. 354-6, Jul 2009.

SHIMIZU, M. T. Enzimas histolíticas produzidas por leveduras do gênero *Candida*. v. 19. n. 4: *Rev. Microbiol.* p. 442-5, 1988.

SHIN, J. H. *et al.* Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: Comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 40, n. 4, p. 1244-1248, 2002.

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*. v. 38, p. 467-471, 2007.

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

SOBEL, J. D. Epidemiology and Pathogenesis of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. v. 152, n. 7, p. 924-935, 1985.

_____. VAGINITIS IN ADULT WOMEN. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. v. 17, n. 4, p. 851-879, 1990.

SOBEL, J. D. *et al.* Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. v. 178, n. 2, p. 203-211, 1998.

_____. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated *Candida* Vaginitis: Clinical implications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 47, n. 1, p. 34-38, 2003.

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

SPINILLO, A. *et al.* Recurrent vaginal candidiasis. Results of a cohort study of sexual transmission and intestinal reservoir. *J Reprod Med*. v. 37, n. 4, p. 343-7, Apr 1992.

_____. Clinical and microbiological characteristics of symptomatic vulvovaginal candidiasis in HIV-seropositive women. *Genitourin Med*. v. 70, n. 4, p. 268-72, Aug 1994.

_____. Epidemiologic characteristics of women with idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol*. v. 81, n. 5 (Pt 1), p. 721-7, May 1993.

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 36, n. 2, p. 329-334, 1998.

SUÁREZ, V. L, FERNÁNDEZ, A. C. In vitro susceptibility of vaginal isolates of *Candida* vs clotrimazole and nystatin. *Rev Cubana Med Trop*. v. 55, n. 3, p. 138-45, 2003 Sep-Dec 2003.

TAVANTI, A. *et al.* Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (SAP1-10) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 42, n. 10, p. 4726-4734, 2004.

TAYLOR, J. *et al.* The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin Microbiol Rev*. v. 12, n. 1, p. 126-46, Jan 1999.

US, E.; CENGIZ, S. Prevalence and phenotypic evaluation of *Candida dubliniensis* in pregnant women with vulvovaginal candidosis in a university hospital in Ankara. *Mycoses*. v. 50, n. 1, p. 13-20, Jan 2007.

VAN BURIK, J. A. H.; MAGEE, P. T. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annual Review of Microbiology*. v. 55, p. 743-772, 2001.

WATANABE, T. *et al.* Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology-Uk*. v. 145, p. 689-694, 1999.

WILLIAMS, D. *et al.* Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol*. v. 33, n. 9, p. 2476-9, Sep 1995.

WINGARD, J. R. *et al.* Differences in virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* in mice. *Infect Immun*. v. 37, n. 2, p. 833-6, Aug 1982.

XU, J. P. *et al.* Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 37, n. 12, p. 3835-3843, 1999.

ZIARRUSTA, G. B. Vulvovaginitis Candidiásica. *Rev. Iberoam Micol.* v. 19. p. 22-4. 2002.

Molecular and phenotypic characterization of *Candida sp* strains from vaginal fluid adults women

FIGURES

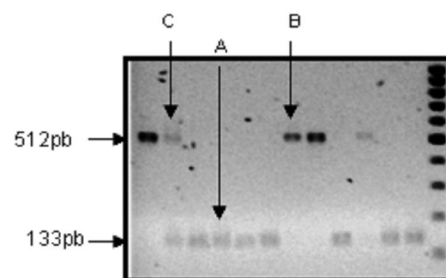


Figure 1: Electrophoresis of the DNA band of three genotypes of *C. albicans*: genotype A (133pb), B (512pb) and C (133 and 512pb).

Molecular and phenotypic characterization of *Candida sp* strains from vaginal fluid adults women

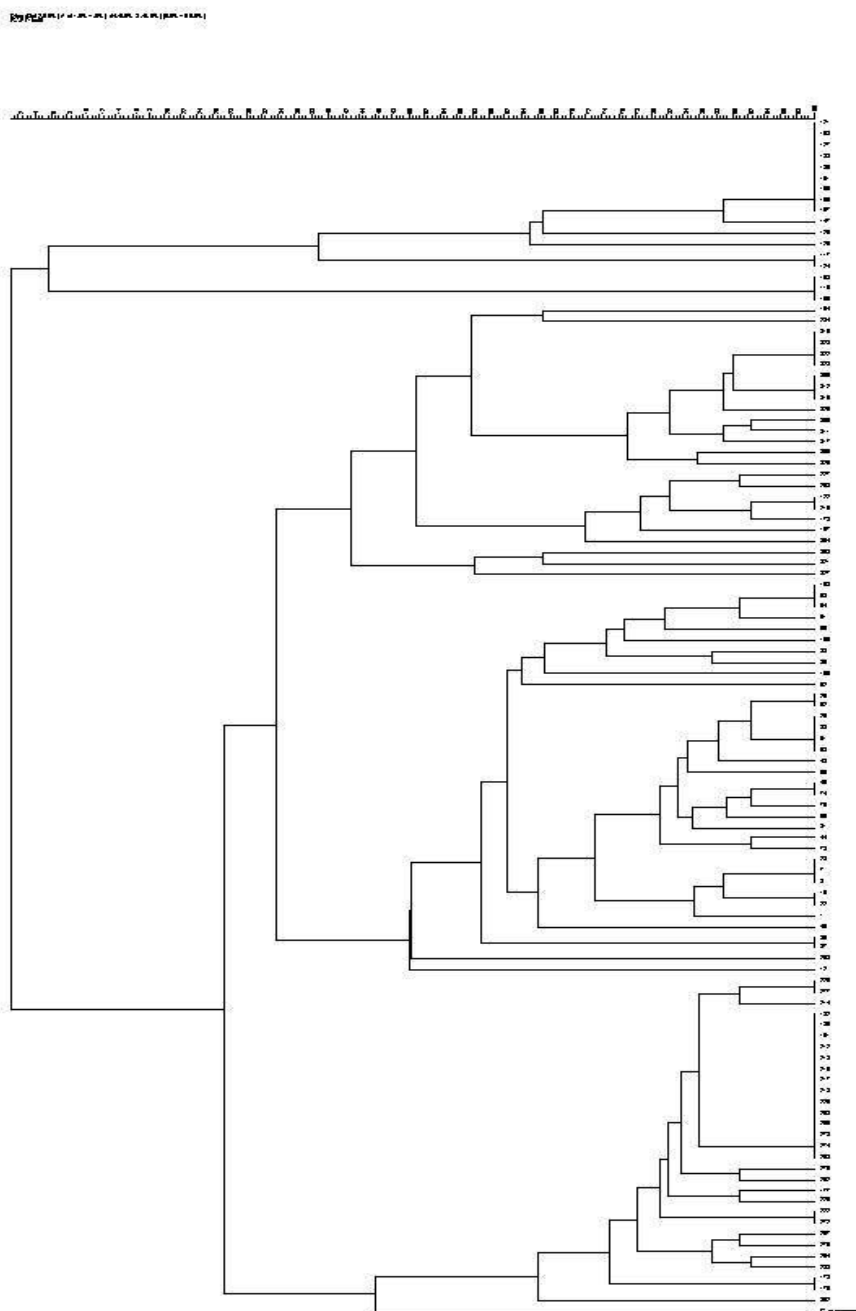


Figure 2: Dendrogram for all 107 isolates of *C. albicans* patients, generated from RAPD obtained with primer B-14.

Molecular and phenotypic characterization of *Candida sp* strains from vaginal fluid adults women

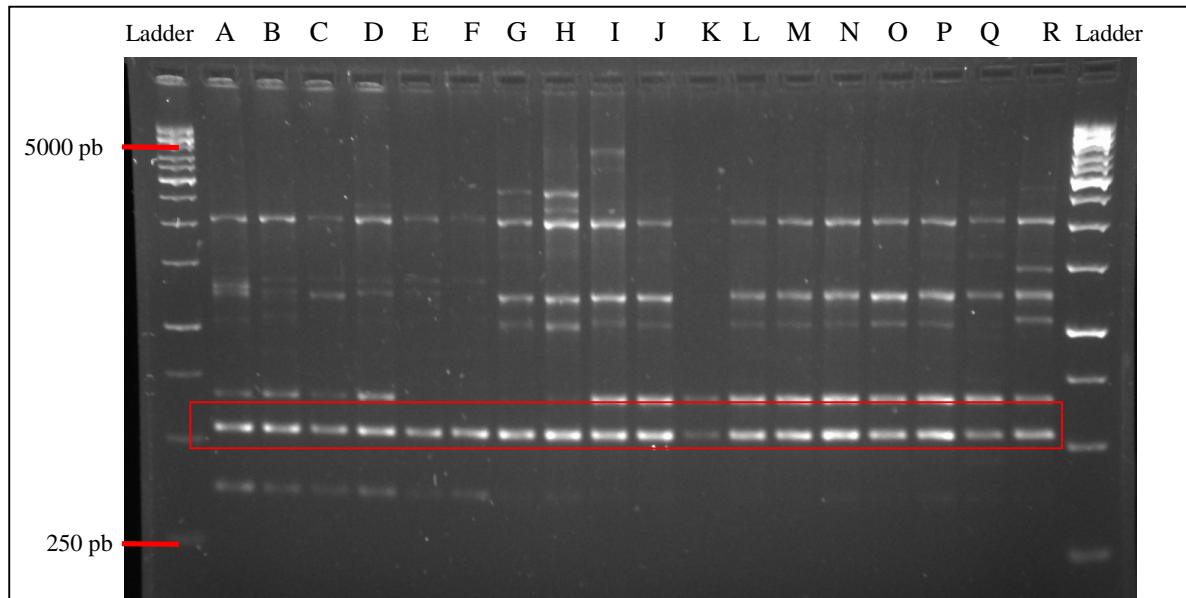


Figure 3: Electrophoretic separation of RAPD-PCR products obtained with primer B14 of *C. albicans*. Molecular size markers 1 kb DNA . Hallmark monomorphic band.

Molecular and phenotypic characterization of *Candida sp* strains from vaginal fluid adults women

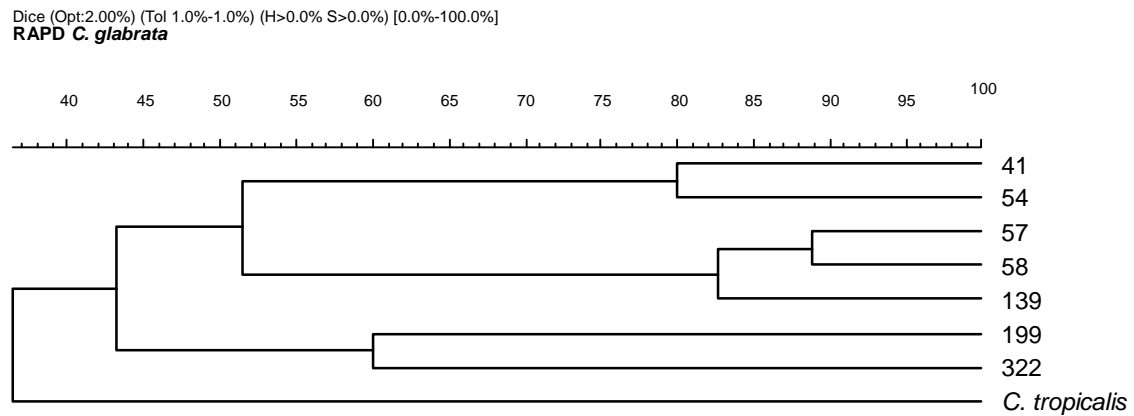


Figure: 4 Dendrogram for all 7 isolates of *C. glabrata* from patients with or without symptoms, generated from RAPD obtained with primer OPE-18.

Molecular and phenotypic characterization of *Candida sp* strains from vaginal fluid adults women

Table 1: Values of interpretative breakpoint for antifungal drugs: MIC($\mu\text{g/mL}$)

Drugs	Sensible (S)	Dose-dependent Susceptible (DDS)	Resistent (R)	References
Fluconazole	≤ 8	16-32	≥ 64	CLSI, 2002
Itraconazole	$\leq 0,125$	0,25-0,5	≥ 1	CLSI, 2002
Ketoconazole	$\leq 0,125$	0,25-0,5	≥ 1	Pádua, 2003
Amphotericin B	< 1		> 1	CLSI, 2002

MIC – Minimum inhibitory concentration

Molecular and phenotypic characterization of *Candida sp* strains from vaginal fluid adults women

Table 2: Virulence factors of *C. albicans* and *C. glabrata*

Species	Proteinase		Phospholipase		Gelatinase		Amylase		Haemolysin		Biofilm strong		Biofilm weak		Termotolerance 39°C		Termotolerance 42°C	
	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A
<i>C. albicans</i> n = 107	55	26	48	25	71	34	1	0	60	29	55	20	47	13	72	35	71	35
<i>C. glabrata</i> n = 7	1	1	0	0	2	4	1	5	1	0	1	0	1	0	2	5	2	5

S = Symptomatic.

A = Asymptomatic

Molecular and phenotypic characterization of *Candida sp* strains from vaginal fluid adults women

Table 3. Number of samples by combined analysis of high similarity among clusters by RAPD and virulence factors of *C. albicans* strains

Virulence factors	Clusters100%	Clusters 80 – 99%
Phospholipase	42	21
Proteinase	42	27
Gelatinase	60	29
Amylase	1	0
Haemolisin	52	23
Thermotolerance at 39°C	61	30
Thermotolerance at 42°C	61	29
Biofilm (strong producers)	42	25
Biofilm (weak producers)	18	5

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A colonização e infecção da mucosa vaginal por espécies de *Candida sp* é fato, sendo *C. albicans* a espécie prevalente.

C. albicans e *C. glabrata* são consideradas espécies fúngicas envolvidas com casos de recorrência para candidíase vulvovaginal.

Os sintomas mais frequentes relacionados à CVV são pruridos, dispareunia, corrimento, disúria e hiperemia vaginal. Nossos dados confirmam a sintomatologia da literatura.

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

A capacidade de produzir proteinase, hemolisina, fosfolipase, biofilme, gelatinase esteve presente nos isolados de *C. albicans*.

O fenótipo de elevação aos azólicos foi um evento raro para *C. albicans* e frequente para *C. glabrata*.

Os padrões genéticos obtidos pelo RAPD (único primer) não mostram correlação com resposta fenotípica.

O genótipo A é considerado prevalente para *C. albicans* isoladas de vulvovaginite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências

- 1 - Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. Int J Gynaecol Obstet. 2000 Dec;71 Suppl 1:S21-7.
- 2 - Mendling W, Seebacher C. Guideline vulvovaginal candidosis: guideline of the German Dermatological Society, the German Speaking Mycological Society and the Working Group for Infections and Infectimmunology of the German Society for Gynecology and Obstetrics. Mycoses. 2003; 46(9-10):365-9.
- 3 - Rosa MIda, Rumel D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 2004; Feb. 26(1): 65-70.
- 4 - Schaller M. *Candida albicans*-interactions with the mucosa and the immune system. J Dtsch Dermatol Ges. 2006 Apr;4(4):328-36.
- 5 - Corrigan EM, Clancy RL, Dunkley ML, Evers FM, Beagley KW. Cellular immunity in recurrent vulvovaginal candidiasis. Clin Exp Immunol. 1998 Mar;111(3):574-8.
- 6 -Corsello S, Spinillo A, Osnengo G, Penna C, Guaschino S, Beltrame A, Blasi N, Festa A. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003 Sep 10;110(1):66-72.

7 - Rylander E, Berglund AL, Krassny C, Petrini B. Vulvovaginal *Candida* in a young sexually active population: prevalence and association with oro-genital sex and frequent pain at intercourse. *Sex Transm Infect.* 2004 Feb;80(1):54-7.

8 - Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet.* 2007 Jun 9;369(9577):1961-71.

9 - Barousse MM, Van Der Pol BJ, Fortenberry D, Orr D, Fidel PL Jr. Vaginal yeast colonisation, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescents. *Sex Transm Infect.* 2004 Feb;80(1):48-53.

10 - Mårdh PA, Novikova N, Stukalova E. Colonisation of extragenital sites by *Candida* in women with recurrent vulvovaginal candidosis. *BJOG.* 2003 Oct;110(10):934-7.

11 - Marrazzo J. Vulvovaginal candidiasis. *BMJ.* 2003 May 10;326(7397):993-4.

12 - Patel DA, Gillespie B, Sobel JD, Leaman D, Nyirjesy P, Weitz MV, Foxman B. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Mar;190(3):644-53.

13 - Ziarrusta GB. Vulvovaginitis candidiásica. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 22-24.

14 - Nyirjesy P. Chronic vulvovaginal candidiasis. *Am Fam Physician.* 2001 Feb 15;63(4):697-702.

15 - Holanda AARde, Fernandes ACS, Bezerra CM, Ferreira MAF, Holanda MRRde, Holanda JCP et al . Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 2007 Jan; 29(1): 3-9.

16 - Sobel JD. Vaginitis in adult women. Obstet Gynecol Clin North Am. 1990 Dec;17(4):851-79.

17 - Edwards L. The diagnosis and treatment of infectious vaginitis. Dermatol Ther. 2004;17(1):102-10.

18 - Pichová I, Pavlícková L, Dostál J, Dolejší E, Hrusková-Heidingsfeldová O, Weber J, Ruml T, Soucek M. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. Eur J Biochem. 2001 May;268(9):2669-77.

19 - Lopes Consolaro ME, Aline Albertoni T, Shizue Yoshida C, Mazucheli J, Peralta RM, Estivalet Svidzinski TI. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. Rev Iberoam Micol. 2004 Dec;21(4):202-5.

20 - Acikgoz ZC, Sancak B, Gamberzade S, Misirlioglu M. Prevalence of *Candida dubliniensis* among the stored vaginal *Candida* isolates in a Turkish hospital. Mycoses. 2004 Oct;47(9-10):393-6.

21 - Us E, Cengiz SA. Prevalence and phenotypic evaluation of *Candida dubliniensis* in pregnant women with vulvovaginal candidosis in a university hospital in Ankara. Mycoses. 2007 Jan;50(1):13-20.

22 - Fernandes CE, Machado RB. Aspectos etiopatogênicos, diagnósticos e terapêuticos da candidíase vulvovaginal. *RBM ginecol obstet.* 1996; 7:100-4.

23 - Sobel JD. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol.* 1985 Aug 1;152(7 Pt 2):924-35.

24 - Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Mar;62(1):130-80.

25 - Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2001 Dec;9(12):591-6.

26 - Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr;40(4):1244-8.

27 - Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, Agabian N, Challacombe SJ. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis.* 2003 Aug 1;188(3):469-79.

28 - Tavanti A, Pardini G, Campa D, Davini P, Lupetti A, Senesi S. Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (SAP1-10) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. *J Clin Microbiol.* 2004 Oct;42(10):4726-34.

29 - Medrano DJ, Brilhante RS, Cordeiro Rde A, Rocha MF, Rabenhorst SH, Sidrim JJ. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006 Jan-Feb;48(1):17-20.

30 - Shinobu CS, Ogatta SFY, Bizerra F, Furlaneto L, Peralta RM, Svidzinski TIE et al . Lack of association between genotypes and virulence factors in *C. albicans* strains isolated from vaginal secretion. Braz. J. Microbiol. 2007 Sep ; 38(3): 467-471.

31 - Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002 Apr;15(2):167-93.

32 - Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. Eukaryot Cell. 2005 Apr;4(4):633-8.

33 - Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. Rev Iberoam Micol. 2002 Sep;19(3):139-43.

34 - Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 2003 Jan;11(1):30-6.

35 - Camacho DP, Consolaro ME, Patussi EV, Donatti L, Gasparetto A, Svidzinski TI. Vaginal yeast adherence to the combined contraceptive vaginal ring (CCVR). Contraception. 2007 Dec;76(6):439-43.

36 - Pendrak ML, Yan SS, Roberts DD. Hemoglobin regulates expression of an activator of mating-type locus alpha genes in *Candida albicans*. Eukaryot Cell. 2004 Jun;3(3):764-75.

37 - Pendrak ML, Yan SS, Roberts DD. Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. Arch Biochem Biophys. 2004 Jun 15;426(2):148-56.

38 - Pendrak ML, Chao MP, Yan SS, Roberts DD. Heme oxygenase in *Candida albicans* is regulated by hemoglobin and is necessary for metabolism of exogenous heme and hemoglobin to alpha-biliverdin. J Biol Chem. 2004 Jan 30;279(5):3426-33.

39 - Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. Infect Immun. 1994 Nov;62(11):5154-6.

40- Watanabe T, Takano M, Murakami M, Tanaka H, Matsuhisa A, Nakao N, Mikami T, Suzuki M, Matsumoto T. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. Microbiology. 1999 Mar;145 (Pt 3):689-94.

41 - Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. J Clin Microbiol. 2001 Aug;39(8):2971-4.

42- McCusker JH, Clemons KV, Stevens DA, Davis RW. Genetic characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. Genetics. 1994 Apr;136(4):1261-9.

43- Almeida OP, Scully C. Fungal infections of the mouth. Braz J Oral Sci. 2002; 1: 19-26.

44 - Sobel JD, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, Nyirjesy P, Heine MW, Willems J, Panzer H. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from

women with complicated *Candida* vaginitis: clinical implications. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Jan;47(1):34-8.

45 - 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 May;43(5):2155-62.

46 - Pádua RAFde, Guilhermetti E, Svidzinski TIE. *In vitro* activity of antifungal agents on yeasts isolated from vaginal secretion. *Acta scientiarum. Health sciences.* 2003 jan.-jun; 25(1):514.

47 – Arechavala AI, Bianchi MH, Robles AM, Santiso G, Negroni R. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 24: 305-8.

48 - Liu XP, Fan SR, Bai FY, Li J, Liao QP. Antifungal susceptibility and genotypes of *Candida albicans* strains from patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycoses.* 2009 Jan;52(1):24-8. Epub 2008 May 21.

49 - Antonopoulou S, Aoun M, Alexopoulos EC, Baka S, Logothetis E, Kalambokas T, Zannos A, Papadias K, Grigoriou O, Kouskouni E, Velegraki A. Fenticonazole activity measured by the methods of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and CLSI against 260 *Candida* vulvovaginitis isolates from two European regions and annotations on the prevalent genotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 May;53(5):2181-4. Epub 2009 Feb 17.

50 - Ferrazza MSHS, Maluf MLF, Consolaro MEL, Shinobu CS, 1. Svidzinski TIE, Batista MR. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com

candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet. 2005;27(2):58-3.

51 - Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev. 1999 Jul;12(3):454-500.

52 - Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. J Med Microbiol. 2005 Mar;54(Pt 3):249-58.

53 - Odds FC, Bougnoux ME, Shaw DJ, Bain JM, Davidson AD, Diogo D, Jacobsen MD, Lecomte M, Li SY, Tavanti A, Maiden MC, Gow NA, d'Enfert C. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. Eukaryot Cell. 2007 Jun;6(6):1041-52. Epub 2007 Apr 6.

54 - Fan SR, Bai FY, Liao QP, Liu ZH, Li J, Liu XP. Genotype distribution of *Candida albicans* strains associated with different conditions of vulvovaginal candidiasis, as revealed by microsatellite typing. Sex Transm Infect. 2008 Apr;84(2):103-6. Epub 2007 Oct 30.

ANEXO 1**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
TERMO DE PARTICIPAÇÃO E CONSENTIMENTO**

Você é convidado a participar da pesquisa “INVESTIGAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL EM PACIENTES DO NOROESTE PAULISTA”. Este projeto, coordenado pela pesquisadora Profª Drª Margarete Teresa Gottardo de Almeida, vai avaliar a distribuição de leveduras isoladas da mucosa genital de mulheres sintomáticas ou não a candidíase vulvovaginal (CVV) e conhecer o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos utilizados na prática clínica. Caso concorde, faremos coleta da secreção vaginal com “swab”, sem que haja nenhum risco para você e sua saúde e pedimos, ainda, que responda algumas perguntas em anexo.

As informações serão mantidas em sigilo e o seu nome nunca será divulgado. Você não terá nenhuma despesa com a pesquisa. Durante a pesquisa você poderá tirar qualquer dúvida a respeito do trabalho, e se necessário entrar em contato conosco pelo telefone (17) 3201-5700 (ramal 5843).

Caso tenha questões sobre esse acordo ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida, você poderá entrar em contato com a Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (17) 3201-(5700).

São José do Rio Preto, ____/____/____

Nome do sujeito da pesquisa:

Assinatura:

Endereço:

Telefone:

Pesquisador responsável:

Profª Drª Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Laboratório de Microbiologia - FAMERP

Fone: (17)3201-5700 ramal 5843

Av. Brigadeiro Faria Lima,5416 Vila São Pedro – CEP 15090-000

ANEXO II

“INVESTIGAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL EM PACIENTES DO NOROESTE PAULISTA”

Questionário N° _____

Dados Pessoais

Paciente Iniciais _____ Idade: _____

Naturalidade: _____ Procedência: _____

Profissão: _____ Estado Civil: _____

Cor: _____ Etnia: _____

Escolaridade Não alfabetizada

Peso: _____

 até 4 anos

Altura: _____

 de 5 a 8 anos

IMC: _____

 de 9 a 11 anos Mais de 12 anos de estudo**Quadro clínico** Paciente assintomática Paciente sintomática Corrimento Ardência Vaginal Corrimento branco e flocoso Prurido vulvar Hiperemia vulvar Dispaurenia Fissuras vulvares Disúria externa Hiperemia vaginal**Investigação Epidemiológica**

1 - Você menstrua ?

 Sim Não

2 - Tipo de ciclo menstrual nos últimos seis meses?

 Regular, intervalo de 25 a 35 dias Irregular

3 – Tipo de absorvente utilizado?

 Interno externo

4- Tipo de roupa íntima?

 Algodão lycra Outro

5- Utiliza algum método anticoncepcional?

 Sim Não

